

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Пчелина Ивана Михайловича на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика дерматофитов рода *Trichophyton* — возбудителей онихомикоза», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология.

Актуальность темы исследования обусловлена практической значимостью объекта исследований – грибов рода *Trichophyton* – возбудителей кожных заболеваний человека и животных и недостаточной изученностью систематики этого рода, которая в последние десятилетия подвергается постоянному пересмотру в связи с бурным развитием молекулярной биологии и биоинформатики. В настоящее время существует потребность в актуализации данных по разнообразию дерматофитов, циркулирующих на территории России, что может быть использовано для развития методов диагностики и эпидемиологического анализа.

Определение таксономической принадлежности возбудителя болезни, кроме теоретического, несомненно, имеет и практическое значение, так как часто коррелирует с патогенностью и устойчивостью к лекарственным средствам. В частности, различия в минимальной концентрации антибиотика, необходимой для подавления видимого роста микроорганизма *in vitro*, также зависят от вида патогена.

В задачи диссертанта входило изучение генетического разнообразия грибов рода *Trichophyton* методами генотипирования изолятов и последующего анализа их генетического родства.

Научная новизна и значимость исследования

В диссертации Пчелина И.М. представлены результаты, обладающие научной новизной и имеющие практическую значимость.

- Впервые выявлены генотипы грибов комплекса *T. mentagrophytes* / *T. interdigitale*, обладающие ограниченным географическим распространением.
- Показано, что популяция *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга имеет клональную структуру и представлена двумя генетическими линиями.
- Проведено сравнение разрешающей способности двух методов типирования изолятов *T. rubrum*.
- Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных NCBI GenBank

Достоверность полученных результатов определяется использованием проверенных методик исследований, апробацией результатов эксперимента на научно-

практических конференциях и публикацией научных статей в центральных журналах, освещающих с достаточной полнотой содержание диссертации.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертация состоит из четырех глав, выводов, практических рекомендаций, заключения, списка сокращений и списка литературы.

Обзор литературы «Морфологические и физиологические особенности представителей рода *Trichophyton*» затрагивает вопросы генетического разнообразия и классификации грибов рода *Trichophyton*. Наиболее интересной, на мой взгляд, является проблема вида, механизмов видообразования и биологических особенностей грибов рода *Trichophyton* определяющих структуру популяции и вида патогена. Автор описал математические подходы для анализа генетического родства изолятов патогена на основе их генотипирования, а также основные современные молекулярные методы анализа геномов и отдельных локусов.

В качестве замечания следует отметить, что следует избегать жаргонов и не совсем понятных выражений типа «вид мог быть получен от одного типа спаривания» (стр. 12), вероятно, подразумевалось «от изолятов одного типа спаривания» или «эрозия филогенетического сигнала» (стр. 19).

Вторая глава диссертации посвящена материалам и методам. В работе использован комплекс современных молекулярно-генетических методов (ПЦР с электрофоретической детекцией результатов, секвенирование ДНК по Сэнгеру и полногеномное секвенирование) и методы биоинформатики. В исследование были включены записи базы данных Генбанка и результаты изучения морфологии колоний трихофитонов. Обработка данных была проведена как стандартными программами, предназначенными для построения филогенетических деревьев, так и самостоятельно написанным программным кодом, представленным в десяти приложениях к диссертации.

В третьей главе изложены основные результаты исследования, которые относятся к разнообразию и географическому распространению изолятов *Trichophyton mentagrophytes* и *T. interdigitale* с различными генотипами (=полиморфизмами) региона ITS, а также к выявлению двух генетических линий в структуре популяции *T. rubrum*. Они изложены в разделах 3.3 и 3.5, соответственно. Раздел 3.3 начинается с достаточно подробного описания алгоритма работы программного кода, написанного диссертантом для анализа географического распространения генотипов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. На последовательностях из базы данных Генбанка *in silico* было проведено изучение разнообразия и распространения генотипов ITS *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale*. В результате было выявлено десять наиболее часто встречающихся генотипов *Trichophyton*

mentagrophytes и *T. interdigitale*. Был сделан вывод о том, что генотипы "FM986750", "KT285210" и "MF926358" распространены на территории Европы, генотипы "KT192500", "KU315316" и "KU496915" — в Азии и Океании. Генотипы "JX122216", "FM986691", "AF170453" и "KP132819" распространены глобально.

Осталось неясно, сколько признаков, полиморфных сайтов ДНК, охватывает понятие «генотип ITS»? Сколько всего изолятов было генотипировано? Отмечал ли автор какую-либо связь между генотипом и патогенностью изолятов?

Работа по изучению структуры популяции *T. rubrum* на территории Санкт-Петербурга и Екатеринбурга молекулярно-генетическими методами была проведена в два этапа. На первом этапе было проведено типирование по локусам TRS-1 и TRS-2 нетранскрибируемого спейсера рДНК. На втором этапе автор применил микросателлитный анализ для 59 изолятов по 12 SSR локусам. В результате было выявлено существование двух генетических линий *T. rubrum*, которые, по всей видимости, являются клонами. Клональность двух генетических линий была подтверждена расчетом индекса ассоциации. Связь между генотипом *T. rubrum* и локализацией поражения на теле пациента отсутствовала.

В процессе изучения структуры популяции *T. rubrum* было обнаружено, что генетическая гетерогенность некоторых микросателлитных локусов у отдельных представителей двух клональных линий обусловлена генетическим полиморфизмом ядер мицелия гриба. Наряду с мутациями, ядерный полиморфизм у грибов с многоядерным мицелием вносит вклад в генетическую изменчивость и может быть предметом отдельного исследования.

В разделе 3.6. «Сравнение разрешающей способности методов типирования штаммов *T. rubrum*» получен ожидаемый результат, зависящий от числа признаков, используемых для анализа внутривидовой изменчивости.

Выводы соответствуют поставленной цели и задачам, но в то же время вызывают ряд вопросов.

К выводу №2: Как диссертант интерпретирует разделение большой выборки изолятов на 10 генотипов? Если 4 генотипа относятся к глобальным, то можно ли рассматривать остальные генотипы, как специфичные для конкретных географических популяций?

К выводу №4: Насколько генетически различаются между собой две клональные линии *T. rubrum*?

«...ПЦР по локусу TRS-1» — это жаргон.

К выводу №5: Что такое «вторичные повторы нетранскрибируемого спейсера рДНК»? Тот же вопрос к подписи к рис. 11 (стр. 76) «Результат амплификации локусов вторичных повторов TRS-1 и TRS-2 нетранскрибируемого спейсера рДНК».

В целом диссертация Пчелина Ивана Михайловича актуальна, основана на большом экспериментальном материале, полученном лично автором и в соавторстве со своими коллегами с использованием комплекса современных молекулярно-генетических и биоинформационных методов. Результаты работы опубликованы в 7 публикациях: из них 5 — в ведущих зарубежных журналах по проблемам микозов, относимых к наукометрическим базам данных Web of Science & Scopus, причем в 4-х Пчелин И.М. является первым автором. Особо следует отметить вклад автора в создание программ для обработки данных секвенирования и фрагментного анализа, подробно изложенных в десяти приложениях к диссертации.

Полученные автором результаты отличаются новизной и послужат основанием для дальнейших исследований в области биологии и генетики дерматофитов. Также несомненно и практическое значение работы: полученное знание о биогеографических паттернах распространения генотипов *T. mentagrophytes* и *T. interdigitale* может быть использовано для проведения эпидемиологических исследований.

Диссертация Пчелина Ивана Михайловича на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика дерматофитов рода *Trichophyton* — возбудителей онихомикоза» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Пчелин Иван Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружено.

Член диссертационного совета

Доктор биологических наук,

Ведущий научный сотрудник

Мироненко Н.В.

Дата: 10 мая 2023г.

Подпись руки

Мироненко Н.В.

Удостоверяю

Секретарь
директора

Н.Н. Камшалева

