

## ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертационной работе Долгих Вячеслава Васильевича

**«Биохимические и структурно-функциональные адаптации энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному паразитизму»**, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 - паразитология.

Рукопись диссертации Вячеслава Васильевича Долгих представляет результат многолетней работы по исследованию взаимодействий в паразитарной системе, объединяющей микроспоридий и их хозяев членистоногих. Стоит подчеркнуть, что с точки зрения постановки задач, их выполнения, с точки зрения общей идеологии исследования – перед нами истинно «паразитологическая» работа. Разнообразные аспекты строения и функционирования внутриклеточных стадий и спор микроспоридий исследуются, обсуждаются в контексте взаимодействия с клетками, особями хозяина. Именно с этой точки зрения обретают значимость многочисленные особенности микроспоридий, обнаруженные автором в ходе исследования. Именно это придает целостность, можно сказать гармоничность всей работе.

Работа не только существенно расширяет наши представления о механизмах, обеспечивающих внутриклеточный паразитизм, но также касается общебиологических вопросов структурной организации эукариотной клетки, пластичности ее метаболических путей. В этом смысле актуальность и фундаментальная значимость исследования выходит далеко за рамки паразитологической проблематики. И это также важно подчеркнуть, поскольку речь идет о докторской диссертации, которая по определению должна характеризоваться высоким уровнем обобщений и обозначать новое направление исследований. Сами микроспоридии, а также многие виды их хозяев относятся к категории значимых с хозяйственной и медицинской точки зрения объектов. Очевидно, что глубокие знания об этих паразитарных системах позволяют без труда обосновывать и практическую значимость работы. Наконец, еще один аспект практической значимости работы весьма близок мне лично как преподавателю университета. Представленная работа дает богатый материал для общебиологических дисциплин и курсов паразитологической направленности. Более того, частично, материалы работы уже используются нами в университетских курсах.

Исследования метаболических и структурно-функциональных аспектов внутриклеточного паразитизма стало возможным лишь в последние годы в связи с развитием методической базы. Представленная работа может служить образцом того как широкий арсенал современных возможностей позволяет решать паразитологические задачи. Одно перечисление основных использованных в работе методов впечатляет. Это оригинальные методы выделения внутриклеточных стадий паразитов и концентрации спор, ультраструктурный анализ, электронная томография, иммунофлюоресцентная и иммуноэлектронная микроскопия, хроматографические и энзимологические методы определения активности ферментов, методы работы с геномной ДНК, включая различные варианты амплификации, рестрикционный анализ, клонирование, секвенирование, биоинформационный анализ, анализ транскриптомов, исследование экспрессии отдельных генов при помощи методов генетической инженерии с последующей идентификацией продуктов иммуноблоттингом, анализ гетерологической экспрессии – вот далеко не полный список тех «инструментов», которые используются в работе.

И здесь необходимо отметить, что методические изыски в данной работе ни в одном случае не являются «точкой фокусировки». В «методически нагруженных» работах часто авторам не удается избежать того, что результаты, полученные самыми современными методами, демонстрируются как самоцель; биологический смысл результатов отходит на второй план. В работе В.В. Долгих выбор того или иного метода во всех случаях точно подчинен цели исследования того или иного аспекта взаимодействия паразитов и их хозяев. Обсуждение этих аспектов во всех частях работы, как и должно быть, стоит на первом месте, а весь методический арсенал получения данных обозначает только этапы формирования этого нового знания. Иными словами – работа – удачный пример сочетания методической продвинутой с пониманием биологического смысла.

Заканчивая разговор о методической части, отмечу, что немаловажную роль в успехе работы имел, во-первых, выбор удобной лабораторной модели, включающей два вида микроспоридий рода *Paranosema* и их хозяев – *Gryllus bimaculatus* и *Locusta migratoria*. Во-вторых – наличие геномных данных, в том числе данных полногеномного секвенирования отдельных видов микроспоридий. Анализ молекулярных аспектов взаимодействия паразит-хозяин без этих предпосылок был бы невозможен.

Диссертация изложена на 294 страницах текста и включает введение, в котором достаточно лаконично обозначена цель и задачи исследования, а также 4 защищаемых положения, 5 глав, заключение, выводы, список литературы из 291 публикации (254 на иностранных языках). Работа включает 11 таблиц и 56 рисунков, четко иллюстрирующих полученные результаты.

Структура построения отдельных глав напоминает отдельные законченные новеллы. Описание собственных результатов и их обсуждение предваряется в каждом случае кратким суммированием имевшихся до начала работы результатов, постановкой частной задачи и конкретным описанием методических подходов к ее решению. Следует признать, что такое, на первый взгляд «нестандартное» построение основных глав, на мой взгляд, оказывается вполне оправданным. Его логика определяется необходимостью описания конкретных методических путей решения задачи каждой главы. Методический поиск становится фактически частью результатов исследования.

В каждой главе мы находим значимые результаты, каждый из которых, вероятно, мог бы послужить основой создания работы достаточно высокого уровня. Остановлюсь лишь на тех результатах, которые, как мне представляется, вносят наиболее существенный вклад в наше понимание морфо-функциональных особенностей микроспоридий вообще и их взаимодействия с хозяевами в частности.

Глава 2 посвящена изучению особенностей энергетического обмена микроспоридий при внутриклеточном развитии. Автор не только доказывает, что внутриклеточные стадии микроспоридий включают собственный энергетический обмен. Он фактически обосновывает механизм, за счет которого АТФ клетки хозяина переносится в цитоплазму клетки паразита. Этот механизм основывается на действии АТФ/АДФ транслоказ «пластидно-бактериального типа». Этот механизм настолько необычен для эукариот, что естественно возникает вопрос о происхождении этих ферментов. В диссертации есть данные об уровне сходства генов транслоказ микроспоридий с прокариотными приблизительно в 35%. Автор обсуждает возможность приобретения этих генов путем горизонтального переноса. Впрочем, не менее воодушевляющей была бы возможность независимого эволюционного формирования этого «метаболического изыска». Здесь, как и во многих других случаях, полученные автором результаты провоцируют дискуссии на общебиологические темы.

Глава 3 представляет данные об энергетическом и углеводном обмене в спорах микроспоридий. Во-первых, хотелось бы отметить вводную часть главы, посвященную обзору данных по энергетическим системам не только микроспоридий, но и других паразитических протистов. Даже эта часть по степени обобщения может рассматриваться в качестве важного вклада в диссертацию. Сами же результаты позволяют автору предложить и обосновать схему энергетического обмена микроспоридий, использующих альтернативную дыхательную цепь для переноса электронов на кислород. Удивительным оказывается, что споры паразитов – стадии, которые, на первый взгляд должны характеризоваться полным физиологическим покоем, активно используют собственный метаболический аппарат в отличие от меронтов и споронтов.

Глава 4 посвящена исследованию системы внутриклеточного транспорта и секреции белков микроспоридий. Важный вклад в общецитологические представления вносит показанная автором особенность – тубулярность и непрерывность каналов комплекса Гольджи – от эндоплазматического ретикулума до плазмалеммы. По сути, речь идет о новых представлениях о морфо-функциональной организации комплекса Гольджи. В контексте паразитологической проблематики эта особенность строения клетки исключительно важна, в частности, для понимания формирования аппарата экстружии споры.

Материал Главы 5 направлен на прояснение молекулярных основ взаимодействия паразита с клеткой хозяина. Именно здесь вскрываются механизмы тонкого взаимодействия паразит-хозяин на уровне генома и протеома. На примере *Paranosema locustae* автор доказывает наличие сигнальных ферментных молекул (альфа/бета-гидролазы, гексокиназы и двух белков, содержащих обогащенные лейцином повторы). При этом показано, что именно ядро клетки хозяина является мишенью для секреторируемой паразитом гексокиназы. Это позволяет обсуждать механизмы «управления» паразитом транскрипционными процессами в зараженных клетках. Среди важных функций, которые могут контролироваться паразитом также регуляция иммунного ответа хозяина, контроль реализации клеточного цикла и апоптоза.

Уместно отметить, что полученные В.В. Долгих результаты не только соответствуют мировому уровню, но во многом являются приоритетными, полученными впервые и ранее зарубежных коллег. Это данные о системе переноса АТФ клетки хозяина, в том числе о ее генетической основе у микроспоридий; данные о выключении у этих паразитов своего аппарата синтеза АТФ; открытие в спорах особых органоидов – митосом, с мембранами которых связана альтернативная дыхательная цепь; описание роли пируватдегидрогеназы в спорах микроспоридий; демонстрация особой «тубулярной» структуры аппарата Гольджи. Наконец, новыми являются данные о секреторных белках микроспоридий и описание их потенциальной функциональной значимости.

Изложенный в «новеллах» материал в целом осмысливается и обсуждается в дополнительной главке «Заключение». Здесь же суммированы данные об отличиях исследованной системы от того, что известно по другим видам микроспоридий. Возможно, эволюция молекулярных механизмов взаимодействия паразит-хозяин, какими бы совершенными (и, таким образом, предполагающими общий характер реализации) они не казались, протекает особенным образом в разных группах даже таксономически близких паразитов. Однако предметное обсуждение этих вопросов относится к следующему шагу в понимании структуры и функции систем паразит-хозяин: сравнительным и эволюционным исследованиям молекулярно-генетических механизмов взаимодействия паразитов и их хозяев. А то, что время этого шага приходит с очевидностью продемонстрировала представленная работа.

Выводы диссертации сформулированы достаточно строго. Работа написана логично, ясным языком. Даже поиск опечаток в рукописи оказывается делом неблагодарным. Их почти нет.

В целом, по решению поставленных значимых проблем, тщательности экспериментальной работы, достоверности данных и уровню их обсуждения – представленная диссертация Долгих Вячеслава Васильевича «Биохимические и структурно-функциональные адаптации энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному паразитизму», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 – паразитология полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук. А сам диссертант полностью заслуживает присвоения ему искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 – паразитология.

Текст автореферата достаточно полно отражает основное содержание диссертации. Основные результаты обнародованы в многочисленных публикациях автора (26 статей в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК РФ, а также трех международных коллективных монографиях) по теме диссертации.

Профессор, заведующий кафедрой  
Зоологии беспозвоночных  
Санкт-Петербургского  
государственного университета,  
доктор биологических наук

А.И.Гранович

23.02.2017

199034, Санкт-Петербург,  
Университетская наб. 7/9,  
тел. 8921951 76 83  
e-mail: a.granovich@spbu.ru

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

А. И. Грановича

ЗАВЕРЯЮ



НАЧАЛЬНИКА  
ДРОВ СЛБГУ  
КОРЕЛЬСКАЯ