

**ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ  
И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИСиЭЖ СО РАН)**

630091, г. Новосибирск, ул.Фрунзе - 11  
Для телеграмм: г. Новосибирск, 91, Зоология  
тел./факс: (383)2170973  
E-mail: office@eco.nsc.ru

От 16.02.2017 № 15341- 2141/26

На № \_\_\_\_\_

«Утверждаю»

Директор ФГБУН Институт  
систематики и экологии  
животных СО РАН

проф. С.О.Н. В.В.Глулов



**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН на  
диссертационную работу Долгих Вячеслава Васильевича  
«Биохимические и структурно-функциональные адаптации  
энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к  
внутриклеточному паразитизму», представленную на соискание ученой  
степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 -  
паразитология.**

Микроспориидии - тип одноклеточных эукариотических микроорганизмов, представленных облигатными внутриклеточными паразитами животных и человека. Длительная и глубокая адаптация микроспоридий к развитию в клетке другого организма и их широкое распространение, преимущественно среди насекомых и других членистоногих, определяют значительный научный и практический интерес к группе, проявленный многими лабораториями разных стран. Однако к началу выполнения данной работы метаболические и структурно-функциональные особенности микроспоридий, а также молекулярные аспекты их взаимоотношений с животными-хозяевами оставались почти не изученными. В связи с этим актуальность выполненной В.В. Долгих многолетней работы и обобщающей её результаты диссертации вполне очевидна. Новизна полученных результатов, положений и выводов, представленных в диссертации, также не вызывает сомнений. Полученные диссертантом данные представляют интерес для широкого круга специалистов, работающих в таких областях как паразитология, протистология, клеточная биология, патология насекомых, защита растений, ветеринария и медицина.

Для достижения основной цели диссертации и успешного решения поставленных в работе задач диссертант использовал обширный набор методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии, иммунохимии, иммуноцитохимии, подробно описанных в первой главе диссертации. Многие из этих методов впервые использованы для изучения микроспоридий. В этой главе также подробно описаны основные объекты

исследования - микроспоридии *Paranosema grylli* и *Paranosema locustae*, паразитирующие в жировом теле двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* и перелетной саранчи *Locustae migratoria* соответственно. Выбор паразитов прямокрылых рода *Paranosema* в качестве объектов исследования достаточно убедительно обоснован.

На первом этапе исследований В.В. Долгих получены биохимические доказательства прямого использования микроспоридиями АТФ клетки хозяина для обеспечения энергией процессов мерогонии и спорогонии паразита. Это позволило диссертанту впервые предположить присутствие в цитоплазматической мембране паразитов уникальных АТФ/АДФ-переносчиков, сходных с транспортерами внутриклеточных бактерий родов *Chlamydia* и *Rickettsia*. Выдвинутая В.В. Долгих в 1999 году гипотеза через 2 года была подтверждена зарубежными исследователями - в геноме микроспоридии человека *Encephalitozoon cuniculi* были обнаружены 4 гена АТФ/АДФ- транспортеров пластидно-бактериального типа, способных импортировать АТФ из цитоплазмы клетки хозяина. С целью показать, что пластидно-бактериальные АТФ/АДФ-переносчики присутствуют у всех видов микроспоридий, диссертант использовал метод ПЦР с вырожденными праймерами и обнаружил два гомологичных гена в геноме микроспоридии *Paranosema grylli*, филогенетически удаленной от *Encephalitozoon cuniculi*. В 2004 году полноразмерная копия одного из генов депонирована в генбанке, а его транскрипционная активность в спорах и стадиях микроспоридий доказана методом ПЦР с обратной транскрипцией. Позднее, присутствие АТФ/АДФ-переносчиков у всех изученных видов микроспоридий было подтверждено в ходе расшифровки их геномов различными научными группами.

На следующем этапе исследования В.В. Долгих впервые удалось показать, что при внутриклеточном развитии микроспоридии не только поглощают готовую АТФ из клетки хозяина, но и выключают собственный метаболизм. Для этого им осуществлена гетерологичная экспрессия в бактериях *Escherichia coli* десяти генов *P. locustae*, кодирующих метаболические ферменты и белки, не участвующие в обменных процессах. Получение антител к рекомбинантным белкам и иммуноблоттинг показали специфичное накопление пяти метаболических ферментов в зрелых спорах микроспоридий, но не в мерогональных и спорогональных стадиях внутриклеточного развития. Напротив, в тех же самых пробах спор и стадий наблюдалось примерно одинаковое содержание трех шаперонов семейства Hsp70 и двух белков, участвующих во внутриклеточном транспорте. Через год после публикации этих данных специфичное накопление метаболических ферментов в спорах паразитов было подтверждено британскими исследователями при изучении микроспоридии *Trachipleistophora hominis*. Результаты описанных выше экспериментов по изучению особенностей энергетического обмена микроспоридий при внутриклеточном развитии приведены во второй главе диссертации.

Одним из наиболее интересных результатов исследования энергетического метаболизма в спорах микроспоридий, описанных в главе 3, следует признать иммунолокализацию обоих компонентов альтернативной дыхательной цепи (митохондриальной глицерол-3-фосфат дегидрогеназы и альтернативной оксидазы) на внутренней мембране митосом - рудиментов митохондрий. Благодаря этим исследованиям В.В. Долгих не только удалось доказать участие этих редуцированных органелл в энергетическом обмене микроспоридий, но и предложить его схему, обеспечивающую положительный выход АТФ. Большой интерес представляют и оригинальные данные о накоплении редуцированной пируватдегидрогеназы - митохондриального белка у других эукариот, в цитоплазме спор микроспоридий. Полученные результаты позволили диссертанту предположить, что основная роль фермента может быть связана с биосинтезом ацетил-КоА в нуклео-цитозольном компартменте спор. Вполне логично, что ацетил-КоА может быть необходим для ацетилирования гистонов и других белков при запуске транскрипционной активности хроматина и активации спор.

Особо следует остановиться на результатах, полученных диссертантом при изучении морфо-функциональных особенностей секреторного аппарата микроспоридий (глава 4). С использованием разнообразных методов ультраструктурного анализа В.В. Долгих показано, что комплекс Гольджи микроспоридий представляет собой непрерывную тубулярную сеть, соединяющую цистерны эндоплазматического ретикулума с цитоплазматической мембраной и формирующимся полярным филаментом. Установлено, что непрерывность секреторного пути микроспоридий сопровождается отсутствием изолированных транспортных везикул в клетках паразита на протяжении всего жизненного цикла. Только через шесть лет после опубликования этих данных в *Journal of Cell Science*, сходные результаты были получены американскими коллегами в ходе трехмерной томографической реконструкции комплекса Гольджи в спороплазмах микроспоридии *Anncaliia algerae*. Следует отметить, что отсутствие транспортных везикул у микроспоридий представляет значительный интерес для специалистов в области изучения общих вопросов внутриклеточного транспорта. Изучение микроспоридий показало, что несмотря на важную роль изолированных везикул, существуют примеры внутриклеточного транспорта без их участия.

Направление исследований в рамках последней, пятой главы диссертации автор логично обосновал, исходя из ранее полученных результатов. Главы 2 и 3 свидетельствуют о значительной редукции собственного метаболического аппарата микроспоридий и их глубокой зависимости от обменных процессов хозяина. В главе 4 показано наличие у микроспоридий хорошо развитого, структурно уникального секреторного аппарата. На основании этого В.В. Долгих предположил, что микроспоридии способны воздействовать на зараженную клетку с помощью разнообразных секреторируемых белков. Данная гипотеза полностью подтверждена

представленными в диссертации экспериментальными данными. В ходе исследования осуществлена гетерологичная экспрессия в бактериях нескольких функционально различных белков *P. locustae*, обладающих секреторным сигнальным пептидом, и с помощью антител к рекомбинантным продуктам показана их секреция в зараженную клетку хозяина. Наиболее интересным результатом этого исследования следует признать накопление секретируемой гексокиназы паразита в ядрах зараженных клеток насекомого-хозяина. Полученные данные впервые показали возможность участия белков микроспоридий в управлении транскрипционной активностью генов хозяина. Интересный результат получен диссертантом и в ходе гетерологичной экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris* двух белков *P. locustae*, содержащих обогащенные лейцином повторы. Оказалось, что филогенетически близкие к микроспоридиям грибы распознают оба белка как секретируемые, выделяя их во внешнюю среду. Все это открывает широкие перспективы для дальнейших исследований молекулярных инструментов патогенного воздействия микроспоридий на зараженную клетку и организм хозяина.

В качестве замечания следует отметить недостаточный масштаб обсуждения некоторых из полученных результатов. Например, при обосновании целесообразности поиска альтернативной дыхательной цепи в спорах *P. locustae* (глава 3) автор упоминает об отсутствии гена альтернативной оксидазы у микроспоридий, относящихся к наземной филогенетической кладе Terresporidia. Из статьи, опубликованной в 2011 году в журнале *Eukaryotic Cell*, мы узнаем, что диссертант связывает потерю альтернативной оксидазы с переходом этой группы микроспоридий к паразитированию на наземных хозяевах и предлагает красивую гипотезу о значительном увеличении в их спорах пула убихинонов, выступающих конечными акцепторами электронов. К сожалению, в диссертации эти рассуждения отсутствуют. Более подробным могло бы быть и сравнительное обсуждение особенностей структуры секреторного аппарата у различных эукариотических организмов, включая грибы и простейших. Высказанные пожелания ни в коей мере не снижают научную ценность этой работы.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа В.В. Долгих выполнена на высоком научном уровне. Диссертантом впервые получен ряд принципиально новых для науки результатов, на основании которых сформулированы полностью обоснованные выводы.

Практическая значимость работы во многом связана с тем, что диссертанту удалось впервые показать - собственный метаболический аппарат микроспоридий не играет важной роли при внутриклеточном развитии этих паразитов, в отличие от мембранных переносчиков, обеспечивающих эксплуатацию зараженной клетки хозяина. Автор справедливо обратил внимание, что именно эти белки следует изучать в первую очередь как мишени при разработке новых методов терапии микроспоридиозов полезных животных и человека. Кроме того, на примере

прямого использования микроспоридиями АТФ зараженной клетки диссертант показал крайнюю степень зависимости микроспоридий от метаболизма хозяина. Это подчеркивает, что стратегия использования микроспоридий как «щадящих», не убивающих своего хозяина патогенов должна отличаться от стратегии применения других биопрепаратов.

Представленные в диссертации материалы опубликованы В.В. Долгих в 26 статьях в отечественных и международных реферируемых научных журналах из списка ВАК, а также в трех коллективных монографиях, изданных в США. Все работы соответствуют теме диссертационного исследования.

Автореферат написан логично, хорошо иллюстрирован и в полной мере отражает содержание диссертации, полностью соответствующей заявленной специальности. Актуальность поставленной научной проблемы, объем проделанной работы, разнообразие и сложность методических подходов, значимость полученных результатов, а также сформулированных выводов и защищаемых положений полностью соответствуют требованиям, предъявляемым ВАК РФ к докторским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук.

Отзыв составлен Заведующим лабораторией экологической паразитологии д.б.н. Крюковым Вадимом Юрьевичем

Заведующий лабораторией экологической паразитологии  
Крюков Вадим Юрьевич

Адрес:

лаборатория патологии насекомых

ФГБУ Институт

систематики и экологии

животных СО РАН

г.Новосибирск, Фрунзе – 11.

Тел.: +79137948560

[krukoff@mail.ru](mailto:krukoff@mail.ru)

Отзыв рассмотрен и утверждён на заседании межлабораторного семинара ИСЭЖ СО РАН, 15.02.2017, протокол заседания № 2.19

Учёный секретарь,  
к.б.н.

Адрес: ФГБУ Институт  
систематики и экологии

животных СО РАН

г.Новосибирск, Фрунзе – 11.

Тел.: +7(382)2170973

[office@eco.nsc.ru](mailto:office@eco.nsc.ru)

[www.eco.nsc.ru](http://www.eco.nsc.ru)



О.Г.Березина