

ОТЗЫВ
на автореферат диссертационной работы
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».

Диссертационная работа В.В. Долгих является логическим обобщением цикла его работ, посвященных крайне актуальной теме, много лет находящейся в центре внимания зоологов, микробиологов и паразитологов - исследованию взаимодействий внутриклеточных паразитов и клеток-хозяев. Поскольку объект исследования автора – микроспоридии - являются филогенетически близкими к грибам облигатными внутриклеточными паразитами и включают в круг своих хозяев представителей практически всех типов животного царства (от простейших до приматов включительно), трудно переоценить как теоретическую, так и практическую значимость представленной работы.

подавляющее большинство видов микроспоридий развивается в членистоногих, главным образом в насекомых. Вместе с тем, микроспоридии являются возбудителями опасных заболеваний мидий, промысловых видов рыб и теплокровных домашних животных. Однако особая актуальность темы обусловлена тем, что в последние годы все возрастающее число видов микроспоридий описываются как возбудители серьезных заболеваний у людей с различными формами иммунодефицита, вызванных вирусом СПИД и действием иммунодепрессантов.

Основная цель работы - изучение метаболических и структурно-функциональных аспектов адаптации энтомопатогенных микроспоридий

рода *Paranosema* к внутриклеточному развитию и молекулярных механизмов патогенного воздействия этих паразитов на организм насекомого-хозяина.

Несмотря на длительную историю изучения и множество опубликованных другими исследователями работ, автор внес существенный вклад в развитие теории взаимоотношений паразитов и клеток-хозяев. На момент начала его собственных исследований не были исследованы не только молекулярные механизмы, лежащих в основе патогенного воздействия микроспоридий рода *Paranosema* на организм хозяина, но ничего не было известно о биохимических и структурно-функциональных особенностях адаптации микроспоридий к внутриклеточному развитию. Малоисследованными оставались метаболизм микроспоридий, их взаимодействие с обменными процессами хозяина, а также механизмы, обеспечивающие формирование уникальной, сложноустроенной споры микроспоридий, позволяющие ей выживать во внешней среде и быстро активироваться.

В своих исследованиях, представленных в диссертационной работе, В.В. Долгих впервые продемонстрировал способность микроспоридий поглощать готовую АТФ клетки хозяина с помощью специфичных белков-переносчиков и показал, что наличие у микроспоридий генов, кодирующих пластидно-бактериальный тип АТФ/АДФ-транслоказ, является универсальной особенностью типа. Автор показал, что использование микроспоридиями (посредством уникальных переносчиков) энергетической системы клетки-хозяина сопровождается выключением собственного метаболического аппарата, функционирующего только на стадии споры. В спорах микроспоридии *P. locustae* автор впервые выявил митосомы - рудименты митохондрий - и показал, что альтернативная дыхательная цепь расположена на внутренней мембране митосом. Автор исследовал ферментативную активность, субъединичный состав редуцированной пируватдегидрогеназы микроспоридий. Автором показана эволюционная

релокализация данного фермента и предложена схема его участия в активации спор. У микроспоридий рода *Paranosema* автором впервые показана непрерывность секреторного пути и отсутствие изолированных транспортных везикул; установлено, что минимизация аппарата гликозилирования белков является общей особенностью секреторного пути этих паразитов. Особый интерес представляет тот факт, что В.В. Долгих доказал способность микроспоридий секретировать в цитоплазму зараженной клетки функционально различные белки, потенциально способные участвовать в управлении физиологическими и молекулярно-генетическими процессами насекомого-хозяина. Автор представил данные о том, что секретируемая микроспоридиями гексокиназа накапливается в ядре зараженной клетки. Таким образом, оригинальные исследования В.В. Долгих внесли весомый вклад в понимание фундаментальных основ взаимодействия паразитических организмов и клеток хозяина.

К несомненным практическим достижениям автора следует отнести полученные им в результате клонирования белок-кодирующие последовательности 14 генов микроспоридии *P. locustae*, и созданные на их основе генетические конструкции, позволяющие осуществлять эффективную экспрессию в бактериях или дрожжевых грибах, а также специфичные антитела, полученные к рекомбинантным белкам.

В своей работе В.В. Долгих использовал широкий набор самых современных методов световой и электронной микроскопии, биохимии, молекулярной и клеточной биологии, микробиологии, иммунохимии, иммуногистохимии, иммуноцитохимии. Многие из примененных подходов впервые использованы для изучения микроспоридий. В ходе выполнения работы автором разработаны оригинальные методики избирательной экстракции белков паразита из очищенных спор, приготовления срезов для иммуноцитохимического анализа, очистки антител на полосках нитроцеллюлозы с иммобилизованным антигеном.

К несомненным плюсам работы следует отнести ультраструктурный анализ комплекса Гольджи микроспоридий, а также анализ трехмерной структуры секреторного аппарата *P. grylli* с помощью электронно-микроскопической томографии и реконструкции трехмерной структуры кластеров. Комплексное использование метода ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением, ингибирования процессов SNARE-зависимого слияния мембран в присутствии N-этилмалеимида и ингибирования процессов «раздевания» (снятия белковой оболочки) COP1-зависимых везикул с помощью тетрафлюорида алюминия (AlF₄), позволили обнаружить изолированные везикулы в клетках микроспоридий.

Следует особо отметить тщательность, с которой оформлен автореферат – в нем присутствуют рисунки очень хорошего качества, отлично иллюстрирующие полученные автором результаты и позволяющие делать выводы о сложности и фундаментальности работе в целом.

По научно-методическому уровню диссертационная работа В.В. Долгих отвечает всем требованиям, предъявляемым к современным исследованиям в области клеточной биологии и паразитологии. Результаты достоверны, а выводы обоснованы. Материалы диссертации регулярно докладывались на всероссийских съездах и конгрессах, а также международных конференциях и симпозиумах; результаты работы отражены в статьях, опубликованных в ведущих отечественных и зарубежных журналах. На основании вышеизложенного считаю, что работа В.В. Долгих «БИОХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АДАПТАЦИИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРОСПОРИДИЙ РОДА *PARANOSEMA* К ВНУТРИКЛЕТОЧНОМУ ПАРАЗИТИЗМУ» представляет собой законченный труд, открывающий перспективы для дальнейшего исследования .

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов, работа полностью соответствует требованиям,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Ведущий научный сотрудник
НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского, МГУ
доктор биологических наук,



Алиева И.Б.

05.03.2017

