

3 февраля 2017 г.

## Отзыв

на автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук  
**Вячеслава Васильевича Долгих: «Биохимические и структурно-функциональные адаптации энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному паразитизму»**

По специальности 03.02.11 – паразитология

Мне посчастливилось работать с Вячеславом Васильевичем с того самого момента, когда он переключился на работу с микроспоридиями в 1992 году и перешел на работу в ВИЗР в группу Ирмы Викторовны Исси. Мы вместе описывали микроспоридию *Paranosema grylli* из сверчка *Gryllus bimaculatus* и вводили эту паразито-хозяйинную систему в лабораторную культуру, провели много совместных исследований, отраженных в более чем 20 совместных публикациях в российских и международных журналах, и представленных на солидных форумах, вместе работали над проектом ИНТАС по изучению секреторных механизмов микроспоридий. Совместную работу со Славой я всегда воспринимала как несравненную удачу работать рядом с талантливейшим ученым-биохимиком и паразитологом, самым талантливым из всех тех, кого мне довелось знать и с кем мне довелось позже работать в России, Италии, Германии и США. После того, как наши научные пути разошлись, научная деятельность Вячеслава Долгих была постоянно в поле моего внимания, как специалиста по микроспоридиям и как ревьюера его статей. Характерные качества Вячеслава как исследователя – эрудиция ученого-биохимика, широта и оригинальность мышления, нетривиальность методических решений, легкость в освоении любых методологий, позволили выполнить серию блестящих публикаций, которые сделали Вячеслава Васильевича ведущим специалистом мирового уровня по биохимии и физиологии микроспоридий и, в целом, по внутриклеточному паразитизму. Кроме того, нельзя специально не отметить его незаурядный талант организатора исследований. Вячеслав Васильевич создал новое фундаментальное направление исследований в ВИЗР, направленное на изучение биохимии внутриклеточного паразитизма энтомопатогенных эукариот, а также при поддержке грантов РФФИ и руководства Института защиты растений организовал собственную хорошо оснащенную лабораторию и сформировал продуктивную рабочую группу учеников и последователей, работающую в авангарде мировых исследований по внутриклеточному паразитизму. И все это в России при самых нелегких обстоятельствах и в самое трудное для отечественной науки время, когда многие менее стойкие и способные исследователи для того чтобы продолжать заниматься наукой вынуждены были уезжать за границу. Без всякого преувеличения следует отметить, что Вячеслав Васильевич внес существенный вклад в развитие и организацию Российской науки, что само по себе заслуживает высочайшей оценки и присуждения ему степени Доктора биологических наук. Значимость и качество исследований, выполненных Вячеславом Васильевичем и обобщенных в докторской диссертации, подтверждены публикацией всех материалов в ведущих международных журналах, включая *Journal of Cell Science*, *FEMS Microbiology Letters*, *PLoSOne*, *Protist*, *Eukaryotic Cell*, *Journal of Eukaryotic Microbiology* и др. О высокой оценке научного вклада диссертанта мировым научным сообществом говорит также приглашение В.В.Долгих к участию в двух наиболее авторитетных коллективных монографиях по микроспоридиям, опубликованных в мире последние два десятилетия: “*The Microsporidia and Microsporidiosis*”, 1999 и “*Microsporidia: Pathogens of Opportunity*”, 2014.

Автореферат написан логично, хорошим языком и прекрасно иллюстрирован. Он в полной мере отражает содержание диссертации (с которой я также ознакомилась) и дает представление об объеме

проделанной работы, степени сложности, и уникальности, а также важности с точки зрения теоретической и практической паразитологии.

Глава 1 чрезвычайно важна: она описывает объекты исследования и разнообразные методические подходы, использованные для решения поставленных задач. Разнообразие сложнейших методов, которыми свободно владеет автор, поражает: от тонких морфологических подходов, например, метода иммунной электронной микроскопии на замороженных срезах, до получения рекомбинантных белков микроспоридий и биоинформатического анализа геномов. Основными методами, используемыми в работе, все же следует признать классические и современные биохимические подходы, которыми Вячеслав Васильевич владеет виртуозно. Специально следует отметить, что группа Долгих это, пожалуй, единственная группа в мире, которая так широко использует в своих исследованиях метод гетерологической экспрессии генов микроспоридий, причем как в *E.coli*, так и в дрожжевых системах. Методические разработки, направленные на получения рекомбинантных белков микроспоридий, также как и полученные антитела на эти белки, следует рассматривать как важнейшие практические результаты работы В.В. Долгих и его группы. Дело в том, что гетерологическая экспрессия генов, наряду с иммунолокализацией – это единственные доступные методы изучения функциональной геномики микроспоридий, у которых невозможна трансформация генома и ограничено использование системы РНК интерференции.

Главы 2-5 посвящены изложению оригинальных результатов, которые принципиально продвинули научное сообщество в понимании механизмов паразитизма микроспоридий. На примере микроспоридий рода *Paranosema*, паразитирующих в прямокрылых насекомых, удалось показать уникальные особенности энергетического и углеводного метаболизма спор и стадий микроспоридий, их секреторной системы, а также раскрыть некоторые принципиальные черты взаимодействия с клеткой хозяина. Не имея возможности детально останавливаться на всех результатах, для каждого из которых применимо наречие «впервые», я хочу остановиться на двух, наиболее важных, на мой взгляд, открытиях, сделанных диссертантом. Это, во первых, идея, высказанная впервые Вячеславом в 1999 году на основе собственных экспериментальных данных, что микроспоридии могут поглощать АТФ из клетки хозяина с помощью переносчиков, сходных с транслоказами, выявленными ранее у внутриклеточных рикетсий и хламидий. Двумя годами позже в 2001г в первом отсековированном микроспоридиальном геноме действительно были выявлены гены четырех таких переносчиков. Далее диссертанту удалось амплифицировать и клонировать фрагменты генов АТФ/АДФ переносчиков *Paranosema grylli*, собрать полноразмерную копию гена одного из переносчиков (№ в Генбанке AJ868111) и продемонстрировать экспрессию этого гена в стадиях и спорах *P. grylli*. Таким образом, Вячеславом был расшифрован конкретный механизм «паразитирования на энергетических системах клетки хозяина», предсказанный Трэгером еще в 60х годах прошлого века. Второе открытие связано с выявлением в составе гликолитического фермента гексокиназы сигнального пептида, что говорит о секреции этого белка в клетку хозяина. Работами группы В.В. Долгих было показано, что этот белок транслоцируется в ядро клетки хозяина, и, видимо, играет роль транскрипционного фактора, регулирующего экспрессию генов хозяина. Таким образом, гексокиназа в спорах функционирует как фермент гликолиза, а в пролиферативных внутриклеточных стадиях берет на себя функции регулятора транскрипции. Это чрезвычайно многообещающая находка для изучения генетических механизмов патогенности микроспоридий, которое активно продолжается в лаборатории Долгих.

Также мне хочется отметить, что несмотря на гигантский объем экспериментальных данных и разнообразие подходов, защищаемая диссертационная работа представляет собой удивительно цельное исследование, каждый последующий этап которого логично вытекает из предыдущего, и все вместе они раскрывают заявленную цель.

Два приведенных ниже замечания к автореферату не существенны и не снижают самого благоприятного впечатления от представленной к защите работе. (1) На мой взгляд, уникальность строения секреторной систем микроспоридий диссертантом несколько преувеличена: в клетках дрожжей и некоторых других нехитридиевых грибов секреторный аппарат организован также в виде тубулярных сетей. Это скорее подтверждает родство микроспоридий с грибами. Возможность транспорта в отсутствие везикул с помощью так называемых тубулярных карьеров и непрерывных

тубулярных путей от ЭР к ПМ, была показана и на модельных клеточных системах (см. работы лаборатории Лепинкот-Шварц). Микроспоридии уникальны тем, что у них везикулярный транспорт, по-видимому, отсутствует в принципе – и, это, безусловно, важная находка. Ну и практическая рекомендация №1 в виде пожелания «внесения спор микроспоридий в месте откладки кубышек для предотвращения роста численности перелетной саранчи» звучит несколько неожиданно в контексте диссертации. Более уместной, мне кажется, была бы рекомендация использовать разработанные методы получения рекомбинантных белков микроспоридий и наработки антител к этим белкам для диагностики микроспоридиозов, необходимой для медицины, ветеринарии, при культивировании полезных насекомых, а также для выявления микроспоридиозов в популяциях вредителей сельскохозяйственных культур.

В заключение, мне хотелось бы подчеркнуть, что автореферат диссертации удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации. Публикации соответствуют теме диссертационного исследования, а содержание работы полностью соответствует заявленной специальности. Я считаю, что работа В.В. Долгих удовлетворяет и даже превосходит требования, предъявляемые к докторской диссертации, и является весомым вкладом в науку паразитологию.

**Юлия Яновна Соколова**



Председатель секции «Microsporidia»  
Международного общества патологии беспозвоночных  
(Chair of Microsporidia Division, Society for Invertebrate Pathology)

Электронный Микроскопист Центра микроскопии Ветеринарного факультета Университета штата Луизиана в Батон Руж, США (Electron Microscopist. Microscopy Core Center, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, 1909 Skip Bertman Drive, Baton Rouge LA 70803, tel.+(225) 578 9899, e-mail: sokolova@lsu.edu)

Кандидат биологических наук, Старший научный сотрудник Лаборатории цитологии одноклеточных организмов, Институт Цитологии РАН, Тихорецкий пр., д.4, 194064, Санкт Петербург, Россия.