

## ОТЗЫВ

**На автореферат диссертации Долгих Вячеслава Васильевича на тему  
«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 Долгих В.В. посвящена детальному исследованию аспектов, обеспечивающих эффективную реализацию паразитизма на молекулярном и клеточном уровнях на примере энтомопатогенных микроспоридий *Paranosema locustae*, поражающей перелетную саранчу (*Locustae migratoria*) и *P. grylli*, паразитирующей на двупятнистом сверчке (*Gryllus bimaculatus*). В рамках представленной диссертационной работы автором был охвачен целый ряд факторов вирулентности данного паразита, обеспечивающих проникновение в организм насекомых-хозяев, их последующий метаболизм как основа функционирования инвазионного потенциала. Актуальность и научная новизна данного диссертационного исследования не вызывают никакого сомнения; они имеют высокое значение как на чисто фундаментальном, так и на прикладном уровне. С одной стороны, автором получены научные результаты, значительно расширяющие знания об особенностях функционирования данного паразита на молекулярно-генетическом и биохимическом уровнях (выявление особенностей энергетического и углеводного обмена в клетках микроспоридий, в том числе при инвазии, эффективное «использование» энергетической системы поражаемых клеток насекомого-хозяина посредством локализации и уровня активности целого комплекса ферментов, детально исследовать имеющийся пул секреторных белков и кодирующих их генов как определяющих факторов вирулентности), а с другой стороны – выявить наличие и особенности ультраструктур компонентов секреторного аппарата микроспоридий).

С точки зрения методологии работа представлена на очень высоком уровне – для ее выполнения было задействовано множество экспериментальных процедур и подходов, большинство из которых полностью находятся в тренде современных мировых научных исследований в области наук о жизни. Так, преобладающими методами, безусловно, можно считать биохимические и молекулярно-биологические, кроме того, широкое применение для выполнения данного исследования получили инструменты для световой и электронной микроскопии, что позволило визуализировать изучаемые клеточные структуры паразита с высоким разрешением, а также послужило основой для иммулокализации ряда изучаемых белков. Также особого внимания заслуживает



отработанная методика получения рекомбинантных белков методами гетерологической экспрессии в клетках прокариот (*Escherichia coli*) и эукариот (дрожжи).

Степень достоверности и апробации полученных диссертантом результатов не вызывает сомнения. Так, материалы работы опубликованы в 26 научных российских и иностранных статьях за период 1998-2016 гг., а также в виде трех профильных глав в международных коллективных монографиях, что, бесспорно, придает им особую значимость.

Важно отметить, что диссертационная работа В.В. Долгих вносит существенный вклад в развитие не только паразитологии, но и целого ряда таких дисциплин как биохимия, молекулярная биология и микробиология, цитология, молекулярная филогения и эволюционная биохимия; имеет немаловажную практическую ценность, которая может быть реализована в разработке подходов к созданию высокоспецифичных биологических способов защиты культурных растений от насекомых, а также перспективы получения инновационных лекарственных средств, направленных против микроспоририозов человека и животных.

Автореферат написан по традиционной схеме, включает в себя описание объектов и методов исследования, в достаточной степени полно проиллюстрированные результаты и их обсуждение, а также выводы в полном соответствии с заявленными в диссертации. Отличительной особенностью структуры данной работы можно считать отсутствие «Обзора литературы» в виде отдельной главы; автор предпочитает приводить краткое состояние исследований по каждому экспериментальному разделу, что, бесспорно, дает возможность читателю более эффективно оценивать экспериментальный вклад данной работы в общее направление исследований.

Однако в качестве некоторых замечаний по работе следует отметить следующие:

1. В тексте автореферата не приведено даже краткого описания биологии и особенностей паразитизма изучаемых видов микроспориридий на их хозяевах.
2. В работе в разделах по гетерологической экспрессии рекомбинантных белков в прокариотической и эукариотической системах автор не указывает количественный выход продукта (как правило, в мг на литр бактериальной/дрожжевой культуры). Данный параметр является очень важным при характеристике результатов получения различных полипептидов методами микробиологического синтеза и преимущественным образом определяет его эффективность.
3. В таблице 1 автореферата (стр. 15) автор приводит сравнение значений активности ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах и стадиях внутриклеточного развития *P. gryll*. По каким причинам для определения активности в разных стадиях паразита была использована различная схема очистки ферментов, включающая в себя

разное число стадий? Известно, что общая (и удельная) активность ферментов снижается с усложнением схемы выделения за счет потерь и деактивации белков. Проводилось ли определение активности каждого из представленных ферментов на каждой стадии их очистки?

4. На рисунке 1 автореферата (стр. 15) приведено разделение липидов жирового тела контрольной (не зараженной) и зараженной *P. grylli* группы сверчков. Одиноковая ли была взята нагрузка жирового тела для разделения? Каким образом проявляли липиды на ТСХ после разделения? Очевидно, что даже при визуальном анализе количественное содержание траацилглицеридов в контроле в десятки раз превышает таковое у зараженных насекомых.

5. На рисунке 3 автореферата (стр. 17) автором приводится участок выравнивания транслированных аминокислотных последовательностей известных плазмидно-бактериальных переносчиков, которые были использованы для подбора вырожденных праймеров и последующей ПЦР-амплификации. Со строгой точки зрения, данные участки сложно назвать консервативными по причине их очень небольшой протяженности (в случае прямого вырожденного праймера только 5 аминокислотных остатков), а также низкого уровня идентичности и наличия консервативных замен аминокислотных остатков. В подавляющем большинстве случаев результат такого эксперимента оказывается негативным.

6. Рисунок 12 «Поиск N-гликозилированных белков в спорах *P. grylli*.» (стр. 27 автореферата). Проводилось ли определение химической принадлежности углеводных остатков гликозилированных белков, которые были идентифицированы в зараженном *P. grylli* жировом теле сверчка путем инкубирования с конъюгатом «лектин WGA-пероксидаза хрена»?

7. Раздел «Роль альфа/бета гидролазы *P. locustae* во взаимоотношениях с зараженной клеткой» (стр. 29 автореферата) – поясните, пожалуйста, каким образом были расположены характерные копии (от 3 до 8) на С-концевых участках транслированной последовательности фермента? А также есть ли данные о том, что остатки аминокислоты пролин, которыми богаты соответствующие последовательности, на самом деле не являются гидроксипролином – аминокислотой, которая является продуктом посттрансляционной модификации пролина? Изучался ли данный фермент на предмет содержания гликозидных связей?

8. Раздел «Секретируемые LRR-белки микроспоридии *P. locustae*» - объясните, пожалуйста, более детально по каким причинам для исследования были выбраны именно эти молекулы? Известно, что многие белки с LRR выполняют сигнальные функции и



часто ассоциированы с цитоплазматической мембраной и мембранами отдельных клеточных компартментов? Рисунок 16 «Иммуноблоттинг с антителами к LRR-белкам *P. locustae*» (стр. 33 автореферата) – чем можно объяснить такую низкую специфичность (аффинность) полученных антител к белкам данной группы, что обеспечивает визуализацию целого набора молекул в широком диапазоне молекулярных масс (20-105 кДа)? Какой научный результат, по мнению автора, может нести данное исследование? Возможен ли биосинтез большого числа разноразмерных гомологичных белков LLR, объединенных одним мультигенным семейством?

В завершении хотелось бы отметить, что ряд приведенных замечаний носит преимущественным образом уточняющий характер и в целом не снижают научную значимость выполненного диссертационного исследования, которое полностью соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а его автор, Долгих Вячеслав Васильевич ему искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности «03.02.11 – паразитология».

Рогожин Евгений Александрович,  
кандидат химических наук,  
научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов  
и нейрорегуляторов Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Телефон: +7-963-697-57-97  
E-mail: [rea21@list.ru](mailto:rea21@list.ru)



03.03.2017 г.

