

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.223.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 14 марта 2017 г. №3

О присуждении Долгих Вячеславу Васильевичу, гражданину РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Биохимические и структурно-функциональные адаптации энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному паразитизму» по специальности 03.02.11 – паразитология принята к защите 22 ноября 2016 г., протокол № 7 диссертационным советом Д 002.223.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1, № 105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Долгих Вячеслав Васильевич 1966 года рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Особенности углеводного и энергетического обмена микроспоридий *Nosema grylli* и их патогенного воздействия на организм насекомого-хозяина» защитил в 1997 году в диссертационном совете, созданном на базе Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по специальности 03.02.05 - энтомология. Работает ведущим научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». Диссертация выполнена в лаборатории микробиологической защиты растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений».

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор, Исси Ирма Викторовна, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», лаборатория микробиологической защиты растений, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Гранович Андрей Игоревич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных,

Мордвинов Вячеслав Алексеевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярных механизмов патологических процессов,

Иешко Евгений Павлович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, заведующий лабораторией паразитологии животных и растений, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, в своем положительном заключении, подписанном Крюковым Вадимом Юрьевичем, доктором биологических наук, заведующим лабораторией экологической паразитологии, указала, что 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.

Соискатель имеет 70 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 57 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, 26. Объем работ по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях,

составляет 17 печатных листов. Авторский вклад в опубликованные в соавторстве научные работы составляет не менее 65 %.

Наиболее значительные научные статьи по теме диссертации:

Dolgikh, V.V. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the intracellular stages of the microsporidian *Nosema grylli* // **V.V. Dolgikh** / Protistology. - 2000. - V. 1. - P. 87-91.

Долгих, В.В. Особенности энергетического обмена микроспоридии *Nosema grylli* при внутриклеточном развитии // **В.В. Долгих, П.Б. Семенов, М.В. Григорьев** / Паразитология. - 2002. - Т. 36, вып. 6. - С. 493-501.

Долгих, В.В. Особенности катаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *Nosema grylli* // **В.В. Долгих, П.Б. Семенов** / Паразитология. - 2003. - Т. 37, вып. 4. - С. 333-342.

Dolgikh, V.V. Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli* // **V.V. Dolgikh, P.B. Semenov, A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko** / Protist. - 2005. - V. 156, N. 1. - P. 77-87.

Dolgikh, V.V. Intracellular transport of secretory proteins in microsporidia occurs in the absence of small, coat-dependent vesicles / **V.V. Dolgikh, G.V. Beznoussenko, P.B. Semenov, Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov** // Folia parasitologica. - 2005. - V.52. - P. 2A.

Dolgikh, V.V. Pyruvate-converting activity in the spores of the microsporidian genus *Paranosema (Antonosporea)* // **V.V. Dolgikh, R.I. Al-Shekhadat** / FEMS Microbiol. Lett. - 2006. - V. 259, N. 1. - P. 142-146.

Долгих, В.В. Особенности гликозилирования белков в спорах микроспоридии *Paranosema (Antonosporea) grylli* // **В.В. Долгих, П.Б. Семенов, Г.В. Безнусенко** / Цитология. - 2007. - Т. 49, вып. 7. - С. 607-613.

Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function // **G.V. Beznoussenko, V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, P.B. Semenov, Y.S. Tokarev, A. Trucco, M. Micaroni, D. Di Giandomenico, P. Auinger, I.V. Senderskiy, S.O. Skarlato, E.S. Snigireskaya, Y.Y.**

Komissarchik, M. Pavelka, M.A. De Matteis, A. Luini, Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov / J. Cell Sci. - 2007. - V. 120. - P. 1288-1298.

Dolgikh, V.V. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonospora) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells // **V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, A.M. Naumov, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, G.V. Beznoussenko** / FEMS Microbiol. Lett. - 2009. - V. 293, N. 2. - P.285-291.

Долгих, В.В. Анализ экспрессии генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *Paranosema (Antonospora) locustae* // **В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, Г.В. Безнусенко** / Цитология. - 2010. - Т. 52, вып. 1. - С. 5-11.

Долгих, В.В. Уникальные особенности энергетического обмена микроспоридий, как результат длительной адаптации к внутриклеточному развитию // **В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, А.М. Наумов** / Паразитология. - 2011. - Т. 45, вып. 2. - С. 147-157.

Dolgikh, V.V. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora (Paranosema) locustae* spores: mitosomes retain their role in microsporidial energy metabolism // **V.V. Dolgikh, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, A.M. Naumov, G.V. Beznoussenko** / Eukaryot. Cell. - 2011. - V. 10, N. 4. - P.588- 593.

Долгих, В.В. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства Hsp70 в изучении секретома внутриклеточных паразитов // **В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, С.А. Тимофеев, А.М. Наумов** / Паразитология. - 2012. - Т.46, вып. 6. - С. 479-492.

Senderskiy, I.V. Secretion of *Antonospora (Paranosema) locustae* proteins into infected cells suggests an active role of microsporidia in the control of host programs and metabolic processes // **I.V. Senderskiy, S.A. Timofeev, E.V. Seliverstova, O.A. Pavlova, V.V. Dolgikh** / PLoS One. - 2014. - V. 9, N. 4. - P. e93585.

Тимофеев, С.А. Взаимоотношения микроспоридий с зараженной клеткой // **С.А. Тимофеев, Ю.С. Токарев, А.В. Симакова, А.А. Царев, В.В. Долгих** / Цитология. - 2016. - Т. 58, вып. 8. - С. 594-601.

На диссертацию и автореферат отзывы прислали:

1. Профессор Иржи Вавра (Jiří Vávra), Карлов университет в Праге (Charles University, Prague), институт паразитологии Чешской академии наук, Чехия;
2. к.б.н. Ю.Я. Соколова, университет штата Луизиана, США, ФГБУН Институт цитологии РАН;
3. профессор, д.б.н. Я.Ю. Комиссарчик и д.б.н. Е.С. Снигиревская, ФГБУН Институт цитологии РАН;
4. профессор, д.б.н. Ш.Р. Ибрагимов, Институт зоологии НАН Азербайджана, Научный Центр «Азербайджанская Национальная Энциклопедия», Азербайджан;
5. д.б.н. А.В. Симакова, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;
6. профессор, д.б.н. Ю.К. Новожилов, ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН;
7. к.б.н. Исмаилов В.Я. и к.б.н. Пушня М.В. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений»;
8. к.б.н. Белостоцкая Г.Б., ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН;
9. к.х.н. Рогожин Е. А., ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
10. д.б.н., профессор, академик НАН Республики Казахстан Сагитов А.О., Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жиембаева;
11. чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор Банин В.В., ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»;
12. чл.-корр. РАН, д.м.н. Галагудза М.М., Институт экспериментальной медицины ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России;
13. д.б.н., профессор Юдин А.Л. и к.б.н. Насонова Е.С., ФГБУН Институт цитологии РАН;
14. д.б.н., профессор Хлебович В.В., ФГБУН Зоологический институт РАН;
15. д.б.н. Алиева И.Б., Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова;
16. д.м.н. Соловьев А.И. и к.б.н., доцент Адоева Е.Я., ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ;
17. к.б.н. Батуева М.Д., ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН.

Всего поступило 17 отзывов из 16 организаций. Все отзывы положительные. Отзывы подписали 2 члена-корреспондента РАН, 11 докторов и 8 кандидатов наук. Из них 11 отзывов без замечаний и 6 отзывов содержат замечания, пожелания и уточняющие вопросы. Отзыв проф. Ш.Р. Ибрагимова - не указано в какие годы были проведены исследования, результаты которых легли в основу диссертации. Отзыв проф. Ю.К. Новожилова - из выводов не очень ясно автор впервые обнаружил и описал способность микроспоридий поглощать готовую АТФ клетки хозяина с помощью специфичных белков-переносчиков или это явление было уже известно ранее. Отзыв к.б.н. Ю.Я. Соколовой - уникальность строения секреторной системы микроспоридий диссертантом несколько преувеличена: в клетках некоторых грибов она также организована в виде тубулярных сетей. Отзыв к.х.н. Е.А. Рогожина – в автореферате нет описания биологии и особенностей паразитизма изучаемых микроспоридий на их хозяевах; не указан количественный выход рекомбинантных продуктов при их гетерологичной экспрессии; не совсем понятно процедуры очистки чего – спор и клеток паразита или ферментов имеется ввиду при рассмотрении таблицы 1; одинакова ли была нагрузка при разделении методом ТСХ липидов контрольного и зараженного жирового тела сверчков; небольшая протяженность участков аминокислотных последовательностей пластидно- бактериальных переносчиков, представленных на рис. 3 автореферата и использованных для подбора вырожденных праймеров, низкий уровень их идентичности с трудом позволяют назвать эти участки консервативными; проводилось ли определение химической структуры углеводных остатков гликозилированных белков, идентифицированных в зараженном жировом теле сверчков с помощью лектина WGA; каким образом расположены повторы в С-концевой области альфа/бета-гидролазы *Paranosema locustae*, не являются ли остатки пролина, которыми богаты эти повторы, остатками оксипролина, изучалась ли гидролаза на присутствие гликозидных связей; почему при исследовании LRR-белков микроспоридий были выбраны именно эти молекулы и какой научный результат может нести данное исследование. Отзыв проф. В.В. Хлебович - хотелось бы узнать, согласится ли

диссертант с моим предложением считать способность заражаться микроспоридиями еще одним диагностическим признаком царства животных. Отзыв проф. А.Л. Юдина и к.б.н. Е.С. Насоновой – каковы возможные механизмы быстрого создания осмотического давления в спорах микроспоридий, если не происходит образование свободной глюкозы из трегалозы; пробовал ли автор сравнивать уровень транскрипции изучаемых ферментов и белков в спорах и стадиях развития микроспоридий. Ответы на замечания содержатся в стенограмме заседания совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются ведущими российскими учеными в области паразитологии, биохимии паразитов и паразито-хозяйинных отношений, а также молекулярных механизмов патологических процессов, вызванных различными инвазиями, и имеют научные труды в данной области исследований в рецензируемых научных изданиях. ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН – одно из наиболее авторитетных учреждений РФ в области биологии, имеющее в своем составе две очень сильных, хорошо известных в стране и за рубежом паразитологических лаборатории – экологической паразитологии и патологии насекомых.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны представления о длительной эволюционной адаптации микроспоридий – обширной группы облигатных внутриклеточных паразитов, к развитию внутри клеток эукариот;

предложены гипотеза о способности микроспоридий поглощать готовую АТФ клетки хозяина с помощью уникальных молекул-переносчиков, а также общая схема энергетического обмена в спорах микроспоридий; **доказаны** метаболическая зависимость микроспоридий от хозяина, минимизация функционального аппарата клетки микроспоридий и приобретение ими уникальных физиологических, биохимических, молекулярных и ультраструктурных особенностей; **введены** понятие авезикулярного (лишенного

изолированных транспортных везикул) комплекса Гольджи микроспоридий и представление о сложном характере взаимоотношений этих паразитов с зараженной клеткой хозяина.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказан уникальный характер взаимоотношений микроспоридий с зараженной клеткой хозяина, обусловленный приобретением паразитами целого ряда уникальных структурно-функциональных особенностей.

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использованы

комплекс современных биохимических, молекулярно-биологических, цитологических и иммунохимических методов лабораторных исследований, а также данные расшифровки геномов различных видов микроспоридий; **изложены** физиологические, метаболические и структурно-функциональные особенности энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema*, позволяющие экстраполировать полученные данные на других представителей группы; **раскрыты** противоречия между важной ролью транспортных везикул во внутриклеточном транспорте, их отсутствием в клетках микроспоридий и относительно высокой транскрипционной активностью генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках паразита, требующие дальнейших исследований; **изучены** особенности энергетического обмена микроспоридий, особенности взаимоотношений паразитов с метаболической системой хозяина, способность микроспоридий управлять зараженной клеткой с помощью секретируемых белков, структурно-функциональные особенности секреторного аппарата микроспоридий; **проведена модернизация** представлений о глубине адаптации этой группы микроорганизмов к внутриклеточному паразитизму и сложности их взаимоотношений с зараженной клеткой и организмом хозяина в целом.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в педагогическую практику университетские курсы с использованием данных диссертационной работы; **определены** белки-мишени,

перспективные для разработки новых средств борьбы с микроспоридиями человека и полезных животных; **создана** теоретическая основа особой стратегии применения биопрепаратов на основе спор микроспоридий в области защиты растений, **представлены** рекомендации по использованию секретлируемых паразитами белков для разработки новых систем иммунодиагностики микроспоридиозов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

экспериментальные работы выполнены на разработанных ранее и хорошо зарекомендовавших себя экспериментальных моделях с помощью оборудования и программ, сертифицированных для лабораторных исследований: спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Россия), ДНК-амплификатора «Герцик» (ДНК-технологии, Россия), электрофоретического оборудования для разделения нуклеиновых кислот (Хеликон, Россия), разделения и блоттинга белков (Bio-Rad, США), флуоресцентного микроскопа AxioImager M1 (Carl Zeiss, Германия), электронных микроскопов Tecnaï и 20 Tecnaï 12 EM (FEI/Philips Electron Optics, Нидерланды), пакета программ DNASTAR® Lasergene 5.05 для молекулярной биологии, пакета программ IMOD для трехмерной и томографической реконструкции серийных и оптических срезов, серверов SignalP, TargetP, SIG-Pred, PrediSi и Signal-3D для поиска сигнальных пептидов в составе белков и сервера ТМНММ для предсказания в их составе гидрофобных трансмембранных доменов; **теория** об уникальных биохимических и структурно-функциональных адаптациях энтомопатогенных микроспоридий к внутриклеточному паразитизму не противоречит фактическим данным, накопленным в мировой литературе по микроспоридиям и другим группам внутриклеточных паразитов; **идея базируется** на тщательном обобщении и оценке всех современных сведений по биохимии, молекулярной биологии, ультраструктуре микроспоридий и об их взаимоотношениях с зараженной клеткой хозяина; **использованы** обширные результаты исследовательской работы для углубленного сравнительного анализа собственных данных и данных, полученных другими авторами; **установлено** качественное совпадение и научная новизна результатов автора по сравнению с

