

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу **Ганюковой Анны Игоревны** «**Симбионт-содержащие трипаносоматиды: жизненные циклы, разнообразие симбиотических ассоциаций, филогения**», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17. Паразитология (биологические науки)

Тема диссертации, бесспорно, актуальна и находится в русле современных исследований. Во-первых, изучение самих трипаносоматид, как существенной в практическом отношении группы паразитических протистов, имеет большую важность. Трипаносоматиды являются одними из наиболее важных паразитов из-за их воздействия на здоровье человека, животных и растений. Заболевания, связанные с этими возбудителями, проявляются в основном среди бедных и уязвимых групп населения, где социальные, экологические и биологические факторы модулируют заболеваемость и географическое распространение. При этом, большинство трипаносоматид имеет моноксенный жизненный цикл и их распространение ограничивается беспозвоночными хозяевами. Представители, патогенные для человека, позвоночных животных и растений, имеют беспозвоночных переносчиков, которые облегчают их передачу (т. е. имеют диксенный жизненный цикл). Вызывает определенную тревогу, что все чаще возникают случаи, когда моноксенные трипаносоматиды, обитающие в насекомых, вызывают оппортунистические инфекции у человека.

Во-вторых, чрезвычайно актуальным является изучение симбиотических взаимоотношений между микроорганизмами. К настоящему времени достигнут значительный прогресс в понимании геномов/транскриптомов/протеомов, эволюционных взаимоотношений и разнообразия отдельных представителей. Тем не менее, для подавляющего большинства микробных эукариот, независимо от среды их обитания, мы практически ничего не знаем об их взаимодействии с другими микроорганизмами. Однако, микробные взаимодействия, по всей видимости, лежат в основе организации всех живых систем. Микробные взаимодействия и симбиозы, как эфемерные, так и постоянные, требуют пристального изучения, поскольку они несут важные эволюционные, физиологические и экологические последствия. Как справедливо отмечает автор диссертационного исследования, одним из важных факторов, расширяющих адаптивный потенциал паразитов и открывающих новые перспективы в их борьбе за ресурсы, является их способность вступать в симбиотические отношения с прокариотными микроорганизмами.

В этой связи, тема рецензируемой работы приобретает особую актуальность и важность. Диссертационная работа отличается новизной, поскольку это первое широкомасштабное исследование разнообразия симбиотических ассоциаций трипаносоматид с прокариотными эндосимбионтами на севере Евразии с оценкой роли таких ассоциаций в эволюции Trypanosomatidae. В работе использован комплекс современных микроскопических и молекулярно-генетических методов. В результате исследований уточнены современные представления о разнообразии симбиотических ассоциаций трипаносоматид с прокариотами, выявлены и изучены неизвестные ранее новые формы таких симбиотических ассоциаций на севере Евразии, что имеет и прикладное значение.

Работа состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и списка литературы. Изложена на 110 страницах, содержит 21 рисунок и 19 таблиц. Список литературы включает 189 наименований, из которых 16 на русском языке, и 173 – на иностранных. Диссертация производит целостное впечатление.

Во **введении** диссертантом показана актуальность исследования, новизна, степень разработанности, сформулированы цели и задачи. Охарактеризована теоретическая и практическая значимость работы. Кратко показана методология исследований. Сформулированы положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** «Обзор литературных данных» приводится характеристика семейства Trypanosomatidae, схема ультратонкой организации их клеток, подробно разбирается история изучения трипаносоматид, что представляет отдельный интерес. Дается классификация морфотипов трипаносоматид и диагностические признаки родов. Разбирается современная система трипаносоматид, которая была пересмотрена с началом применения молекулярно-биологических методов. Подчеркивается, что систематика трипаносоматид до сих пор несовершенна и находится в разработке. Далее автор подробно останавливается на истории изучения именно симбионтсодержащих трипаносоматид. Дается характеристика разнообразия основных таксонов. Отмечаются особенности геномов бактериальных симбионтов трипаносоматид, и особенности морфологии самих симбионтсодержащих трипаносоматид. Отдельно следует отметить важнейшие разделы, посвященные метаболической кооперации трипаносоматид и бактериальных симбионтов и описанию влияния эндосимбионтов на клетки жгутиконосцев. Из них становится понятно, как именно симбиотические отношения с прокариотными микроорганизмами расширяют адаптивный потенциал паразитов и повышают их успешность в освоении новых хозяев. В целом, нужно заметить, что раздел «Обзор литературных данных» написан исчерпывающе и дает полное представление о проблематике проведенного исследования.

В **Главе 2** «Материалы и методы» описаны сборы материала (сбор и вскрытие насекомых), методы культивирования трипаносоматид, в т.ч. получение аксеничных культур. Описаны применяемые методы световой, флуоресцентной и электронной микроскопии. Охарактеризованы методы выделения геномной ДНК, постановки ПЦР, очистки фрагментов амплифицированных генов из ПЦР-смеси и секвенирование. Описана методология филогенетического анализа. Разбираются эксперименты с заражением насекомых, в т.ч. культивирование насекомых.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» посвящена результатам исследований автора. Приведены результаты поиска новых симбионт-содержащих видов в коллекции банка культур и архивных препаратов ЗИН РАН. Исследована морфология (в т.ч. ультраструктура) жгутиконосцев рода *Wallacemonas* в культуре. Показано, что исследованные 4 штамма (*W. ravinae*, *W. collosoma*, *W. rigidus* и штамм WSD) не имеют бактериальных эндосимбионтов. Приведены результаты поиска симбионт-содержащих изолятов трипаносоматид в природных популяциях хозяев на севере России, в результате которого удалось обнаружить 4 изолята симбионт-содержащих трипаносоматид на севере Евразии. Исследуется морфология и ультраструктура клеток в культуре. Приводятся результаты морфометрии и филогенетических построений на основании последовательностей генов 18S рРНК. Обосновываются новые виды. В частности, новый вид *Phytomonas borealis* оказался первым симбионт-содержащим представителем подсемейства Phytomonadinae. В специальном подразделе разбираются жизненные циклы симбионт-содержащих трипаносоматид. Эти исследования отличаются особой оригинальностью, поскольку для достижения поставленной цели по исследованию жизненных циклов была проведена серия экспериментальных заражений насекомых. Для меня описание экспериментов выглядит логичным, при этом замечу, что я не обладаю необходимыми компетенциями в области энтомологии, чтобы дать экспертную оценку экспериментальным подходам, применяемым в данном разделе.

Завершает диссертационную работу весьма вдумчивое и логичное заключение, а также емкие выводы, закономерно вытекающие из результатов проведенных исследований.

Как и во всяком комплексном исследовании, в представленной работе можно отметить и ряд недостатков. К недостаткам работы отношу следующее:

- 1) Во введении было бы не лишним упомянуть, как именно симбионты влияют на метаболизм, клеточные циклы, и колонизацию кишечника насекомого-хозяина. Эти вопросы разбираются в обзоре литературы, но краткая характеристика этих явлений

напрашивается и во введении, во избежание голословности и для более полного обоснования научной важности диссертации.

- 2) В диссертации часто используются термины «фаунистические работы», «фаунистические исследования». Хотя сам термин «фауна» не применим к протистам, он характеризует животных.
- 3) Не совсем удачно сформулированы «цели и задачи». Цель следовало бы сформулировать одну (более широкую), и несколько задач, направленных на достижение данной цели. Получилось, что в диссертации сформулированы 2 цели и 4 задачи, частично дублирующих эти цели.
- 4) В описании научной новизны работы присутствует фраза «Для решения этой проблемы мы планируем изучение биоразнообразия трипаносоматид». Более уместным было бы «мы запланировали изучение, или мы изучили» (т.е. это уже сделано в диссертации, а не запланировано).
- 5) Формулировка, что «Кинетопластиды вкупе с эвгленовыми жгутиконосцами формируют монофилетический таксон Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981, emend. Simpson 1997), входящий в супергруппу Excavata (Cavalier-Smith 2002, emend. Simpson 2003) (Roger, Simpson, 2009)» не точна. Современные исследования показывают, что экскаваты не монофилетичны, и данная супергруппа сохранилась в настоящее время лишь номинально. А в состав Euglenozoa, помимо эвгленид и кинетопластид, входят еще диплонемиды и симбионтиды.
- 6) В главе 1.1 «Общая характеристика семейства Trypanosomatidae» сказано, что «Локомоторный аппарат представлен одним направленным вперёд жгутиком, который может быть свободным, либо прикреплённым к мембране клетки». Это может ввести в заблуждение неподготовленного читателя. Как направленный вперед жгутик может быть прикреплен к мембране клетки? А как обстоят дела с кинетосомами, сколько их? Здесь следовало бы дать более подробную характеристику жгутиковых аппаратов трипаносоматид, или не касаться этого вопроса вовсе.
- 7) Рисунок 1.3. «Филогенетическое дерево». В подписи к рисунку сказано, что «значения менее 0.5 или 50% соответственно заменены черными кругами. Масштабная линейка обозначает количество замен на сайте. По: Kostygov et al., 2020». По идее, все должно быть наоборот: значения БОЛЕЕ 0.5 или 50% обычно заменяются черными кругами. Замен чего, на каком сайте? Обычно пишут «нуклеотидных замен на сайт». К сожалению, обратившись к статье Kostygov et al., 2020 (<https://doi.org/10.1098/rsob.200407>) я не нашел там данного дерева. А в списке литературы диссертации не нашел самой ссылки Kostygov et al., 2020.

- 8) Стр. 28. «Симбионты стригомонадин имеют единое происхождение, которое является следствием однократного возникновения симбиотической ассоциации, имевшего место в позднем меловом периоде». Просто любопытно, как сделана данная датировка?
- 9) Стр. 29. «Это явление получило название «захват эндосимбионта» – endosymbiont capture (по аналогии с «захватом органелл» – замещением митохондрий или пластид одного вида органеллами другого). Здесь требуется пояснение на счет замещения митохондрий или ссылка на литературу.
- 10) Таблица 1.3. «Длина генома в mb» – лучше, «размер генома».
- 11) Стр. 45. «обрабатывали в сушилке с критической точкой НСР-2 (Hitachi Ltd., Токио, Япония) и после покрытия 20-нм слоем платины в устройстве для нанесения покрытия IB-5 Ion (Giko Co. Ltd., Токио, Япония) была исследована под микроскопом Tescan Mira3 LMU с напряжением 25,00 кВ». Правильно было бы «Аппарат сушки в критической точке» и «ускоряющее напряжение», предложение не согласовано.
- 12) Стр. 51. «Таким образом, филогенетическое положение жгутиконосцев рода *Wallacemonas* в настоящий момент представляется неясным, и для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных геномных исследований». – Наверное, здесь имеются в виду ФИЛОгеномные исследования?
- 13) Рис. 3.3. Подпись к рисунку. «Ветви с тройным перечёркиванием». Перечеркивание везде двойное.
- 14) Стр. 57. Ультраструктура *Angomonas deanei*. «отличительной особенностью является наличие электронно-плотной гранулы, занимающей большую часть внутреннего пространства кинетосомы». Это уникальное явление? Известно ли что-либо о природе этой электронно-плотной гранулы?
- 15) Непонятно, чем принципиально отличаются деревья на рис. 3.3 и 3.7.
- 16) Стр. 59. «концепцией дизъюнктивного распространения». Требуется литературная ссылка.
- 17) Рис. 3.12. Структуры обозначены как гликосомы. Мембраны не очень хорошо визуализируются.
- 18) При обосновании выделения нового вида *Phytomonas borealis* хотелось бы видеть анализ сравнения его морфологии с *P. nordicus* для более полной валидации описания нового таксона.
- 19) Рис. 3.16. Подписи к рисунку на русском языке не соответствуют обозначениям на рисунке английскими буквами.

20) Стр. 89. Заключение. Трудно не согласиться с рассуждениями автора что «достоверная идентификация симбионтов возможна только с применением молекулярных методов, что возможно исключительно при наличии аксеничной культуры трипаносоматид». Но при этом не следует забывать, что в настоящее время развиваются и применяются методы single-cell *omics, а также метагеномика, что позволяет частично нивелировать проблему отсутствия культур.

В работе также выявлено некоторое количество опечаток (симбионтсодержщих, ждугутиконосцев, пойменной – пойманной, щитник-хищник, сфинкрером) и неточностей в пунктуации, а также неудачные формулировки («снижение или потеря псевдогенов»). Встречается написание «бета-протеобактерии» как через дефис, так и слитно. Везде по тексту диссертации sp., spp. после названий родов выделены курсивом, хотя по правилам эти сокращения курсивом не выделяются.

В целом, перечисленные выше замечания больше относятся к проблемам изложения материала и никак не влияют на научное содержание и достоверность результатов проведенных исследований. Можно заключить, что диссертация представляет собой законченную высококвалифицированную работу. Полученные результаты представляют основу для дальнейшего изучения биоразнообразия трипаносоматид из насекомых бореальной зоны, и дальнейшего поиска и всесторонних исследований симбионтсодержащие видов трипаносоматид.

Полученные А.И. Ганюковой данные актуальны, научно значимы и имеют перспективу развития. Выводы работы обоснованы и закономерно проистекают из данных проведенного исследования. Материал в диссертации и в автореферате изложен четко и понятным языком. Основные положения работы опубликованы и прошли апробацию на научных конференциях.

Считаю, что по теоретическому обоснованию и практической значимости диссертация А.И. Ганюковой соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор безусловно заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17. Паразитология (биологические науки).

*Доктор биологических наук,
главный научный сотрудник*

лаборатории микробиологии Института биологии внутренних вод им. И.Д.
Папанина Российской академии наук
Тихоненков Денис Викторович
152742 Ярославская область, Некоузский район, пос. Борок, ИБВВ РАН
Т. (48547)24533
E-mail: tikho-denis@yandex.ru



Д.В. Тихоненков

23 января 2023 года

