

В диссертационный совет Д 002.223.01,

ФГБУН Зоологический институт Российской академии

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу **Соколовой Юлии Яновны**
«БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ И БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСПОРИДИЙ»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.02.11 – Паразитология

Микроспоридии (тип Microsporidia), группа внутриклеточных паразитических протистов, весьма важных в теоретическом и в практическом плане, они не обделены вниманием исследователей, и привлекают с каждым годом все большее внимание протистологов. Несмотря на это наши знания об этой группе далеко не полные, а с моей точки зрения и просто фрагментарные. Юлия Яновна Соколова проделала огромную и значимую работу по изучению микроспоридий, собственно, список публикаций по теме диссертации (68, не считая многочисленных тезисов докладов) более чем красноречиво говорит сам за себя.

Диссертация изложена на 287 страницах и содержит 484 литературных источника. Структура работы, представленной к защите, вполне стандартна для докторской диссертации. **Введение** содержит все основные разделы, которые рекомендованы ВАК для включения в данный тип квалификационных работ. Оно демонстрирует научную новизну и актуальность исследования, а также исчерпывающе обосновывает тему. **Цель исследования**, хотя и звучит несколько тяжеловесно, хорошо раскрывает идею работы. Задачи, обеспечивающие выполнение заявленной цели сформулированы четко и ясно, и, в дальнейшем, последовательно раскрываются в тексте диссертации. **Глава 1. «Биология клетки, филогения и происхождение микроспоридий (Обзор литературы)»** написана, как и вся работа, очень хорошим языком и позволяет читателю получить ясное представление о современном состоянии знаний относительно затрагиваемых проблем. Обзор включает глубокий анализ более 484 источников, охватывающих период по 2018 г., включительно. Отдельно следует отметить высокое качество этого обзора, который, на мой взгляд, достоин скорейшего опубликования, так как в нем не только впервые после монографической статьи И.В. Исси (1986) обобщены данные по клеточной биологии, эволюции и биоразнообразию микроспоридий, накопленные за 3 последних десятилетия, но и обсуждаются противоречивые

концепции, касающиеся функциональной морфологии клетки микроспоридий, их происхождения и эволюционных связей с другими эукариотами.

Глава 2. «Объекты и методология исследований» демонстрирует комплексный характер исследования. В ней представлены сведения, дающие полное представление об объеме использованного материала и методах исследований, выбранных для достижения поставленных задач. Юлия Яновна использовала широкий спектр методик, от рутинных (но совершенно необходимых для исследования) до самых современных молекулярных. Говоря о методической части работы, следует отметить, во-первых, широкий методологический кругозор автора, а также активное привлечение новых методов, что в свою очередь позволило получить принципиально новые результаты. Так Юлией Яновной был впервые в мире использован метод лазерной микродиссекции для изучения жизненных полиморфных циклов протистов. Благодаря использованию продвинутых методов электронной микроскопии, таких как глубокое замораживание под высоким давлением и иммунная электронная микроскопия на замороженных срезах, удалось впервые изучить уникальную структуру аппарата Гольджи микроспоридий. Достоверность полученных данных определяется воспроизводимостью всех использованных в работе методов и адекватным статистическим анализом.

Глава 3. «Цитология, жизненные циклы и филогения микроспоридий, паразитирующих в различных систематических и экологических группах хозяев». Это центральный раздел работы, состоящий из нескольких подразделов, посвященных изучению конкретных паразито-хозяинных систем. Раздел содержит принципиально новые факты и открытия. Юлией Яновной досконально изучены жизненные циклы более 30 видов микроспоридий, и с помощью молекулярно-филогенетического анализа определено их положение в системе, описано 12 новых видов и выделено 6 новых родов (*Apotasporea*, *Kneallhazia*, *Larssonia*, *Liebermannia*, *Mockfordia*, и *Paranosema*), более 30 оригинальных сиквенсов депонированы в Генбанке. Все это значительно расширяет наши представления о тонкой морфологии, биоразнообразии и филогении и этой интереснейшей группы эукариотических микробов. Описание новых родов и видов, уточнение жизненных циклов, организации и клеточной биологии, а также выяснение филогенетического положения и эволюционных связей микроспоридий имеет большую теоретическую ценность и важно для построения естественной системы микроспоридий, а также оценки роли микроспоридий в различных биологических сообществах. Заключительная часть главы завершается интереснейшим разделом,

посвященным немногочисленным микроспоридиям позвоночных и анализом тех групп видов из беспозвоночных животных, которые содержат виды микроспоридий, представляющие потенциальную опасность для людей с пониженным иммунным статусом. На основании собственных и литературных данных автор приходит к заключению, что потенциальные источники большинства микроспоридиальных инфекций человека связаны с «универсальными» паразитами насекомых с широким спектром хозяев и пре-адаптированных к высоким температурам (в частности, с паразитами комаров, личинки которых развиваются в водоемах при высокой температуре), а также с гиперпаразитами млекопитающих и их родственниками. В этом же разделе представлены данные, имеющие прикладное значение для медицины. Впервые в России под руководством Ю.Я. Соколовой в рамках международного проекта и совместно с врачами Инфекционной больницы им. Боткина, С. Петербург, были отработаны клинические методы тестирования на микроспоридиоз в условиях Российской клиники, определен уровень заражения микроспоридиями и идентифицированы виды, заражающие ВИЧ-инфицированных пациентов. Заключение по главе 3 суммирует представленный разносторонний материал, и также служит мостиком к Главам 4 и 5. Если Глава 3 представляет собой достаточно традиционное морфологическое, экологическое и таксономическое исследование группы, то Главы 4 и 5 посвящены экспериментальным исследованиям, которые по идее авторы, раскрывают механизмы успешности микроспоридий как универсальных паразитов животных. Глава 4 посвящена аппарату Гольджи и формированию комплекса органелл, обеспечивающих уникальный механизм заражения организмов и клеток-мишеней, а Главе 5 - выявлению биохимических адаптаций, которые используют микроспоридии для противодействия клеточным защитным реакциям.

Глава 4. «Аппарат Гольджи и секреторный транспорт микроспоридий».

Работа по изучению аппарата Гольджи микроспоридий является пионерской и несомненно представляет интерес для цитологов и клеточных биологов, что доказывает ее публикация основной части этого исследования в *Journal of Cell Science*. Впервые изучена специфическая организация «минимальной» секреторной системы микроспоридий, на базе которой сформировались основные компоненты аппарата экстрюзии. На примере микроспоридий впервые показано, что секреторная система эукариотной клетки может функционировать в отсутствие системы везикулярного транспорта. Юлия Яновна показала, что клетка микроспоридий представляют собой модель минимальной секреторной системы эукариотической

клетки, перспективной для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. «Минимализация» секреторного транспорта, выраженная, в частности, в элиминации эндосомального пути, O-гликозилирования и везикулярного транспорта сочетается с гипертрофией транс-компартамента Гольджи и его трансформации в органеллу клетки, наделенную необычными функциями. Я очень надеюсь, что эти уникальные исследования в области секреторного транспорта микроспоридий будут продолжены.

Глава 5. «Модуляция апоптоза как механизм патогенеза микроспоридий»:

Сравнительное изучение влияния заражения двумя видами микроспоридий (*Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma coveae*) на индукцию апоптоза в макрофагах и экспрессию генов, ответственных за регуляцию апоптоза, было проведено впервые и показало подавление митохондриального сигнального пути апоптоза обоими видами. Эти исследования имеют важное теоретическое значение для понимания как механизмов патогенеза микроспоридиоза, как и для изучения многообразия ответных реакций макрофагов на инфекцию. Впервые на клеточной системе с 2 видами микроспоридий, патогенными для человека, методом количественного ПЦР с обратной транскрипцией проанализирована экспрессия 84 генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, выявлены пути модуляции клеточного цикла микроспоридиями, и показана способность ингибировать митохондриальный сигнальный путь апоптоза.

Заключение удачно суммирует изложенный в диссертации материал и логично подводит к **Выводам**. Всего представлено 10 выводов, два последних разделены на подразделы. По сути выводы логично следуют из полученных в ходе исследования результатов. Они полностью отвечают главной цели исследования и содержат решения всех поставленных задач.

Иллюстрации, значительная часть которых вынесена в «Приложение», выполнены качественно и снабжены информативными подписями. Всего диссертация содержит более 200 индивидуальных рисунков и 16 таблиц. Основные материалы диссертации полностью отражены в 68 рецензируемых журналах, 64 из которых входят в систему цитирования Scopus WOS. Ю. Я. Соколова автор 5 крупных обзоров и соавтор 4 коллективных монографий, посвященных микроспоридиям. Материалы, использованные при написании диссертации, были также представлены на 35 международных и Российских научных конференциях, и опубликованы в виде тезисов в материалах этих конференций.

У меня есть ряд замечаний и вопросов.

Глава 3. Юлия Яновна часто упоминает термин «микроспоридиология». Все-таки такого термина пока не существует и его использование оправдано лишь в редких случаях и обязательно в кавычках.

Глава 4. По этой главе у меня возник следующий вопрос по поводу созревания и механизма «выстреливания» полярной трубки. Автор постоянно упоминает уникальность этого процесса, и в то же время, описывая его механизм в Материалах и методах говорится о конкретных физиологических механизмах (Са-зависимом процессе, кальциевых каналах и роли кальмодулина как медиатора), весьма напоминающих таковые при выбросе, например, экструсом инфузорий. Так в чем же принципиальное различие процесса выброса полярной трубки микроспоридий и, например, трихоцист парамеции?

Глава 5. Здесь мне не совсем понятно, на чем основан вывод об универсальности подобного механизма патогенеза. Ведь, как следует из текста диссертации (последняя часть главы 3), микроспоридии млекопитающих, это лишь небольшая и крайне aberrantная группа. Возможно, такой механизм патогенеза, и не столь универсален, а характерен лишь для паразитов клеток млекопитающих?

Выводы. По форме, формулировки 1го и 10 го выводов, на мой взгляд не слишком удачны, так как звучат скорее как констатации полученных данных.

Стилистические опечатки, орфографические ошибки, а также некоторые замечания по структуре работы были исправлены в соответствии с моими замечаниями, как рецензента предварительного варианта диссертации Юлии Яновны. Представленный к защите вариант хорошо выверен и практически не содержит опечаток.

Резюмируя все выше изложенное, считаю, что диссертация Ю.Я. Соколовой является научно-квалификационной работой, в которой на основании самостоятельных исследований автора разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение. Работа полностью соответствует «Положению о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017), утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени доктора наук.

Профессор каф. зоологии беспозвоночных

Биологического факультета

Санкт-Петербургского Государственного Университета



д.б.н Г.С.Слюсарев

20 октября 2019

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

Г.С. Слюсарев

ЗАВЕРЯЮ



ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н.К. КОРЕЛЬСКАЯ