

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Новожилова Юрия Капитоновича на диссертационную работу **Юлии Яновны Соколовой «Биология клетки и биоразнообразие микроспоридий»**, представленную в диссертационный совет диссертационного совета Д 002.223.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 – «Паразитология»

На современном этапе все более очевидным становится необходимость интеграции молекулярно-филогенетических и морфологических подходов в изучении филогении различных групп организмов. Построенные, прежде всего на основании мультигенного анализа, филогении грибов и простейших нуждаются в адекватной морфологической и биологической интерпретации.

Диссертационная работа Юлии Яновны посвящена малоизученным и сложным вопросам структурно-функциональной адаптации, филогении и систематики высокоспециализированных внутриклеточных паразитов – микроспоридий. Роль микроспоридий в изучении эволюции эукариот и паразито-хозяйных систем, а также в изучении физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот трудно переоценить.

Итогом длительной коэволюции микроспоридий и многоклеточных хозяев, прежде всего членистоногих, стало развитие множества адаптаций к внутриклеточному образу жизни и для проникновения в клетку хозяина.

Результаты последних молекулярно-филогенетических исследований указывают на их положение либо в пределах супертаксона Holomycota, куда также входят грибы (Fungi), либо в составе клады Arhelida-Rozellomycota-Microsporidia (ARM клады).

В представленной диссертации дается много новых для науки результатов, выводов и обобщений. В частности впервые на основании глубокого и всестороннего осмысления имеющихся в литературе, а также полученных автором данных показано влияние микроспоридий на индукцию и регуляцию апоптоза зараженных клеток хозяина через подавление митохондриального сигнального пути апоптоза.

При изучении ультраструктурной организации ряда видов микроспоридий впервые были выявлены особенности морфологии различных органелл, а также прослежены их гомологии. Показано, что аппарат Гольджи микроспоридий, особенно на ранних стадиях жизненного цикла, напоминает тубуло-везикулярные кластеры диких штаммов дрожжей, что согласуется с концепцией родства микроспоридий и грибов.

Результаты работы имеют не только теоретическое значение, но и важны для практики. Автором впервые показана роль микроспоридиоза в синдроме иммунодефицитов, в частности у ВИЧ инфицированных пациентов. Это подтверждает необходимость диагностики и лечения микроспоридиозов, которые в России не проводятся.

Изучение микроспоридий паразитирующих на некоторых важных для человека насекомых и ракообразных, позволило разработать целый ряд методов диагностики инфекций. Это важно как для экологии, так и для целей разработки использования микроспоридий в борьбе против вредных насекомых.

Таким образом, теоретическая и практическая значимость, новизна и актуальность проведенных Юлией Яновной исследований не вызывает сомнений.

Диссертационная работа построена по стандартной схеме, состоит из введения, 5 глав с описанием объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, а также четырех приложений и списка сокращений.

Материалы диссертации изложены на 278 страницах, работа очень хорошо иллюстрирована 53 сложными рисунками и содержит 16 таблиц, наглядно демонстрирующих полученные

результаты. Список использованной литературы очень обширен, включает 484 литературных источника

Результаты работы изложены в диссертации и автореферате ясно, несмотря на чрезвычайную сложность и разнообразие изучаемых вопросов.

Во **введении** дается краткая характеристика микроспоридий, отмечаются наиболее значимые направления их исследований и подходы. Подчеркивается необходимость комплексного подхода для изучения филогении и систематики микроспоридий, с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов. Описывается актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования. Подчеркивается, что роль микроспоридий в глобальных естественных биоценозах, таких как биоценоз мирового океана и тропического леса, существенно недооценена. Кроме того крайне маленький геном позволяет использовать микроспоридии как модельные объекты в решении различных вопросов биологии клетки.

Особое значение в работе автор уделяет филогении и систематике отдельных малоизученных групп микроспоридий, таких как мечниковеллиды, относящихся к базальной группе микроспоридий, а также филогении многих родов микроспоридий, паразитирующих на членистоногих, рептилиях, рыбах и млекопитающих.

Исходя из этого сформулированы цель и задачи исследования, направленные на выявление эволюционных адаптации структур клетки микроспоридий, анализ филогенических связей различных таксонов, изучение многообразных морфофункциональных аспектов биологии клеток микроспоридий. Специальный раздел диссертации посвящен изучению морфологических и физиологических адаптаций микроспоридий к внутриклеточному паразитизму в различных паразито-хозяйных системах с участием представителей различных групп многоклеточных. Этот раздел диссертации направлен на выяснение различных механизмов патогенеза микроспоридий, таких как способность регулировать апоптоз клеток хозяина.

Отмечается личный вклад автора, принимавшего участие на всех этапах работы на протяжении трех десятилетий, начиная от формулирования проблемы, постановки цели и задач до обработки и интерпретации полученных данных.

Результаты работы прошли достаточную апробацию в научном сообществе. Автором по теме диссертации опубликовано 68 научных работ, из них 62 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, 2 статьи в других научных изданиях, входящих в перечень ВАК. Результаты работы доложены и опубликованы в материалах более 30 научных конференций, съездов, симпозиумов, как в России, так и за рубежом.

В **первой главе** диссертации «БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ, ФИЛОГЕНИЯ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ МИКРОСПОРИДИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)» подробно проанализированы результаты работ посвященных вопросам биологии, жизненных циклов, морфологии, систематики и филогении микроспоридий.

Видно, что автор в совершенстве владеет современной научной литературой. Особенно ценно то, что автор ясно показывает наиболее спорные вопросы филогении микроспоридий, а также детально разбирает все наиболее сложно интерпретируемые особенности морфофункциональных адаптаций микроспоридий к внутриклеточному паразитизму.

Следует подчеркнуть, что комплексный подход, примененный автором в анализе филогений микроспоридий, включает самые современные молекулярно-генетические и цитологические методы. Это ценная составляющая работы.

В частности, подробно освещаются такие загадочные особенности микроспоридий, как наличие мейоза, полового процесса и проблема пloidности ядер диплокариона в группах с отсутствием чередования поколений. Показано, что мейоз в той или иной форме, с различной частотой и степенью завершенности присутствует также у видов, считавшихся ранее асексуальными. Автор обоснованно делает заключение, что состояние индивидуальных ядер

микроспоридий может варьировать от гаплоидного до диплоидного, а диплокарионов – от диплоидного до тетраплоидного в зависимости от видовой принадлежности и фазы жизненного цикла.

В главе рассматриваются различные аспекты филогении микроспоридий, их родственные отношения с другими простейшими и грибами. Дается подробный исторический экскурс, начиная с «архезойного» этапа, когда микроспоридий относили к сборному таксону Archezoa и, заканчивая последними полигенными и геномными исследованиями, в которых убедительно показано родство микроспоридий с грибами.

Автор подробно останавливается на особенностях методического и методологического аппарата филогенетических исследований. В частности детально разбирает «подводные камни» алгоритмов и параметров, которые значительно повлияли на филогенетические построения, например «артефакт взаимного притяжения длинных ветвей».

Прочтение данной главы не оставляет сомнения, что Юлия Яновна отлично ориентируется в современных филогениях эукариот и микроспоридий, а также хорошо представляет себе ограничения и возможности методов молекулярных филогений.

Результаты анализа работ по филогении микроспоридий сведены в очень информативную и понятную даже неспециалисту Таблицу 1.1 и рисунки 1-2, 1-3, в которых в сжатом виде рассмотрены гипотезы о положении типа Microsporidia на древе эукариот и их родственных связях.

Из анализа данных проведенных автором видно, что во многом топология филогений микроспоридий будет зависеть от объема и границ Holomycota, куда в настоящее время относятся собственно грибы (Fungi), афелиды (Aphelidea), розеллы (Rozellomycota) и микроспоридии (Microsporidia). Наверняка в ближайшем будущем вопрос о положении микроспоридий и их родственных связях будет пересматриваться по мере накопления данных, а также включения в филогенетический анализ новых таксонов и использования новых подходов и методов для построения филогений.

Во **второй главе «ОБЪЕКТЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ»**, дается перечисление изученных автором микроспоридий (более 30 видов), относящихся как к базальной группе «низших» микроспоридий – мечниковеллид (, так и к «высшим микроспоридиям», являющихся паразитами 13 надродовых таксонов животных. Вся информация об объектах исследований внесена в сжатом виде в таблицу 2.1. Даны описания как природных паразитно-хозяйных систем с участием различных многоклеточных, так и экспериментальных с участием насекомых с подробным описанием методов заражения насекомых, получения спор микроспоридий и т.д. Также описаны методы получения клеточных экспериментальных систем с использованием клеток моноцитарной лейкемии человека ТНР-1.

Арсенал методов, использованных в диссертации, впечатляет. Детально описаны методы и методология морфологических исследований с использованием световой, электронной микроскопии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, электронной томографии, ультраструктурной цитохимии и гистохимических методов, а также методы биохимии и молекулярно-генетического анализа. Некоторые из них использованы при изучении микроспоридий впервые. Например, для изучения полиморфных жизненных циклов автором впервые применены метод лазерной микродиссекции с последующим анализом нуклеотидных последовательностей, а также метод иммобилизации ДНК микроспоридий человека на бумажных носителях. Автором использованы специальные методические подходы трансмиссионной электронной микроскопии, для доказательства непрерывности секреторного пути микроспоридий и отсутствия везикул, а также иммуноэлектронная микроскопия на срезах тканей и др.

Следует подчеркнуть, что разнообразие методов вполне оправдано и обусловлено крайне сложными задачами исследований. Очевидно, что методы были использованы оптимально и целенаправленно, с пониманием их возможностей и ограничений.

В **третьей главе – «ЦИТОЛОГИЯ, ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ И ФИЛОГЕНИЯ МИКРОСПОРИДИЙ, ПАЗАСТИРУЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ И**

ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУППАХ ХОЗЯЕВ» подробно описана ультраструктура «низших» микроспоридий-мечниковеллид (*Rudimicrosporea*, *Metchnikovellidae*) на примере двух видов рода *Metchnikovella* и особенности строения «низших» микроспоридий. В главе дается подробный анализ эволюции аппарата экстрезии мечниковеллид, а также описание их морфологии в свете геномных данных. Автором впервые на модельных видах проведен ультраструктурный и молекулярно-генетический анализ ряда таксонов, что позволило выявить и ранее неизвестные филогенетические связи. Например, исследование ультраструктурной организации и молекулярной филогении микроспоридии *Apotasora heleios*, паразитирующих в окуневых рыбах и креветках, позволило выявить отдельную кладу, объединяющую близкородственные, но морфологически различные виды микроспоридий, распространенных в Старом и Новом свете.

Впервые описывается ультраструктура многих видов микроспоридий, в частности *Metchnikovella incurvata*, гиперпаразита грегарин, обитающих в кишечнике полихет.

Ультраструктурные признаки мечниковелид сведены в общую таблицу, в которой хорошо видны сходства и различия таксонов. В главе также затрагиваются вопросы «скрытого разнообразия» микроспоридий, которое было выявлено в метагеноме почв некоторых тропических биомов.

Значительная часть главы посвящена ультраструктуре, особенности внутриклеточного развития и филогенетическим связям микроспоридий трех отрядов насекомых (прямокрылых, чешуекрылых и перепончатокрылых). Полученные автором данные подробно описаны и проиллюстрированы великолепными фотографиями различных стадий жизненного цикла, а также оригинальными рисунками для интерпретации сложных полиморфных жизненных циклов ряда изученных видов.

Итогом главы стал анализ основных морфо-функциональных адаптаций микроспоридий. Автор относит к ним диверсификацию путей передачи инфекции для избегания перорального пути заражения, биохимические адаптации к широкой тканевой специфичности, вплоть до способности развиваться в ядре клетке хозяина, а также повышенную способность к расселению за счет формирования тонкостенных спор с короткими полярными филаментами. Дается вывод о том, что микроспоридии насекомых, из клады *Nosema bombycis* могут служить естественной моделью для изучения видообразования микроспоридий.

Особый раздел главы посвящен микроспоридиям рептилий и человека. На основании результатов изучения ультраструктуры, патогенеза и секвенирования участка рибосомального гена (ITS-МСрДНК) автором был описан новый вид *Encerphalitozoon rogoanae*, что безусловно является важным вкладом в систематику микроспоридий, особенно с учетом редкости таких находок.

Что касается полученных автором данных о микроспоридиозах ВИЧ инфицированных больных в России, то эти результаты, безусловно, важны как в теоретическом, так и практическом значении, прежде всего для разработки методов диагностики микроспоридиоза у людей с ослабленной иммунной системой. Так в ходе данного исследования впервые испытан метод иммобилизации ДНК микроспоридий человека на бумажных носителях для сбора, архивирования и молекулярного анализа.

В завершении главы автор делает ряд важных теоретических обобщений о происхождении и филогенетических связях микроспоридий, паразитирующих у теплокровных животных. По мнению автора лишь небольшое число микроспоридий ракообразных перешли к паразитированию человека через пищевые цепи, тогда как большая часть паразитов человека, ведут свое происхождение или родственны микроспоридиям насекомых или гиперпаразитам млекопитающих, преадаптированным к высоким температурам. Завершается глава заключением, с описанием основных трендов морфологической эволюции ряда органелл микроспоридий. Автор выделяет основные причины становления микроспоридий, как внутриклеточных паразитов. Это

усовершенствование способа заражения клетки с помощью аппарата экстррузии, а также способность модулировать клеточный цикл хозяина и развиваться в фагоцитирующих клетках.

Соответственно из этих выводов в диссертации логически и закономерно вытекают два других крупных аспекта – изучение аппарата Гольджи микроспоридий, как основной органеллы ответственной за внутриклеточный транспорт, а также исследование модуляции апоптоза клеток хозяина микроспоридиями. Им посвящены четвертая и пятая главы диссертации соответственно.

В главе 4 «АППАРАТ ГОЛЬДЖИ И СЕКРЕТОРНЫЙ ТРАНСПОРТ МИКРОСПОРИДИЙ» дан сравнительно-цитологический анализ этой важнейшей органеллы эукариотической клетки. Автором проанализирован значительный пласт литературы по строению, функционированию и морфологической эволюции аппарата Гольджи эукариот в контексте их филогении. Подчеркивается, что у микроспоридий отсутствует «стековая» организация аппарата Гольджи. Изучена и дана детальная реконструкция тубулярных сетей микроспоридий гомологов аппарата Гольджи, а также их модификация в ходе клеточного цикла. Представлены морфофункциональные доказательства функций тубулярных сетей в разных стадиях жизненного цикла нескольких модельных видов микроспоридий. С помощью ультрацитохимических методов показано пространственный и временной аспекты морфогенеза аппарата Гольджи у микроспоридий, что в свою очередь открывает новые возможности для интерпретации многих данных, накопленных цитологией по внутриклеточному транспорту.

В этой главе автор выходит далеко за рамки классической морфологии клетки и затрагивает также сложнейшие вопросы биологии клетки, как гликолиз белков полярной трубки и клеточной стенки тубулярной сети. С помощью целого ряда современных цитохимических методов, а также электронно-микроскопической томографии автором было показано, что гликозилирование белков начинается в тубулярной сети споробластов, а тубулярная сеть микроспоридий соответствует цис-Гольджи компартменту. В главе также дается анализ геномных и протеомных данных выполненных другими исследователями. Обобщая свои результаты и данные литературы Юлия Яновна делает два основных вывода. Во-первых, микроспоридии используют те же базовые механизмы секреторного транспорта, которые характерны для клеток дрожжей, однако это происходит при значительной редукции отдельных элементов внутриклеточного транспорта. Эти данные поддерживают заключения молекулярных филогенетиков о родстве микроспоридий и грибов.

Во-вторых, анализ репертуара генов микроспоридий, вовлечённых во внутриклеточный транспорт, свидетельствует о минимальной роли окаймлённых пузырьков.

Особый раздел главы относится к возможности использования микроспоридий как естественных экспериментальных систем для изучения секреторного транспорта. В этой главе, автор демонстрирует незаурядные способности к обобщению научной информации, полученной в исследованиях широкого спектра эукариот и охватывающих различные направления исследований в протистологии, микологии, морфологии и биологии клетки.

В главе 5 «МОДУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА КЛЕТКИ ХОЗЯИНА КАК МЕХАНИЗМ ПАТОГЕНЕЗА МИКРОСПОРИДИЙ» раскрывается одна из наиболее поразительных особенностей биологии микроспоридий, которая объясняет их способность к внутриклеточному паразитированию у животных с развитой системой клеточного иммунитета с участием макрофагов. На основании оригинальных пионерных исследований автор делает вывод о способности микроспоридий манипулировать секреторной активностью и биохимическими путями фагоцитарных клеток, включая подавление апоптоза в макрофагах. Этот вывод крайне важен как для теории эволюции паразито-хозяинных систем, так и для медицинской биологии. Данная часть работы основана не только на ультраструктурных методах с целью изучения морфологических аспектов проникновения микроспоридий в иммунные клетки, но также на результатах количественного ПЦР в

реальном времени с реакцией обратной транскрипции. Автором убедительно показано, что изученные виды по-разному воздействуют на экспрессию генов связанную с апоптозом. В таблице 5-2 приводится список из 42 генов, связанных с апоптозом, демонстрирующих изменение уровня экспрессии в экспериментальных группах макрофагов, обработанных спорами микроспоридий. В данной главе автор намечает ряд направлений для дальнейших исследований прежде всего для вскрытия механизмов влияния микроспоридий на биохимические аспекты апоптозного каскада клеток разных хозяев.

При чтении диссертации создается ощущение, что разнообразие данных и методов соответствуют не одной, а нескольким диссертациям. Однако, несмотря на значительный объем и разнородность результатов, автору удалось успешно объединить полученные результаты и обосновать выдвинутые в диссертации положения.

Заключение дает возможность читателю оценить все основные аспекты работы, не погружаясь в детали исследования. В нем автор ярко демонстрирует свои возможности ставить новые задачи для будущих исследований и умение акцентироваться на главном.

Выводы по результатам работы обоснованы и корректны, они полностью соответствуют поставленным задачам исследования.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Имеются небольшие редакционные замечания.

Во введении автор пишет, что «Микроспоридии широко распространены в природе: они встречаются практически во всех географических экотопах Земли и известны из представителей большинства классов Metazoa, а также некоторых инфузорий и грегариин (Anonymus, 2014; Sokolova, 2015; Stentiford et al., 2016)». Экотоп это определенная географическая единица со своими факторами физико-географической среды, поэтому уточнения этого термина эпитетом "географический" на мой взгляд избыточно.

Заключение Юлии Яновны о том, что в настоящее время принадлежность микроспоридий к «кроне» филогенетического древа и родство микроспоридий и грибов кажется мне вполне обоснованным. Однако, справедливости ради, следует отметить, что до сих пор этому вопросу даже в последних работах нет единства. Так в статье Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M. (2015) A Higher Level Classification of All Living Organisms. PLOS ONE, 10(4), e0119248, отмечено, что авторы относят розелид и микроспоридий к Protozoa (типичные фаготрофы), а не к Fungi (типичные осмотрофы).

В диссертации хотелось бы видеть более определенную позицию автора по этому вопросу.

Хотелось бы отметить, что, несмотря на очень широкий охват современной литературы, из литературного обзора выпало несколько важных работ, касающихся макросистематики и эволюции грибов, в контексте их родственных взаимоотношений с микроспоридиями, в частности работа Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., Abarenkov, K. (2018) High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. Fungal Diversity, 90(1), 135-159, а также выше упомянутая работа Ruggiero MA с соавторами 2015 года.

В целом диссертация оформлена очень аккуратно, имеются лишь немногие опечатки, в частности в таксономических названиях.

На стр. 9, 44, а также в приложении 3 название Opisthoconta надо заменить на Opisthokonta

На стр. 49, 51, 52 название Rozellomicota надо заменить на Rozellomycota

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Ю.Я. Соколовой «Биология клетки и биоразнообразие микроспоридий», представляет собой

полноценное законченное научное исследование, выполненное на высоком научном уровне с использованием огромного фактического материала. Работа включает в себя ряд теоретических положений, и имеет очень важное значение для паразитологии, цитологии, клеточной биологии, микологии, протистологии, медицины и защиты растений.

Материалы диссертационной работы Ю.Я. Соколовой могут быть использованы в вузах, в курсах паразитологии, протистологии, микологии, цитологии и биологии клетки, а также в практике защиты растений и медицины.

На основании вышеизложенного можно резюмировать, что диссертация Ю.Я. Соколовой «Биология клетки и биоразнообразие микроспоридий», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям, установленным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации (№842 от 24.09.2013 г.), и требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Соколова Юлия Яновна, несомненно, достойна присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 «Паразитология».

Доктор биологических наук по специальности 03.00.24 – «Микология», профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории систематики и географии грибов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук»

e-mail: YNovozhilov@binran.ru

197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2;

тел. +7 (812) 372-54-43;

E-mail: binadmin@binran.ru

Web-сайт: <https://www.binran.ru/contacts/>

30 сентября 2019 г.

Новожилов

Юрий Капитонович



Соколова Ю.Я.
Мас-ов Сергеевна

ОТДЕЛ КАДРОВ

Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук