

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Карпова Сергея Алексеевича на диссертационную работу Юлии Яновны Соколовой «Биология клетки и биоразнообразие микроспоридий», представленную в диссертационный совет Д 002.223.01 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 – паразитология

Микроспоридии – высоко специализированная группа внутриклеточных паразитов, которые паразитируют на многоклеточных животных, а также некоторых протистах. Вызывая микроспориозы вредных насекомых, они регулируют их численность в природе и в этом отношении важны с практической точки зрения. Особенно интересны микроспоридии поражающие грегарин, а также близкие к ним паразиты амёб, дающие на филогенетическом древе самые базальные ветви. Их исследования проливают свет на происхождение микроспоридий и их родственные связи с грибами. Поэтому представленная диссертационная работа Соколовой Ю.Я. является исключительно актуальной с практической и теоретической точек зрения. Диссертация посвящена изучению биологии клетки микроспоридий, а также их генетическому и морфологическому разнообразию – крайне сложным задачам, учитывая высокую конкуренцию в исследованиях этих важных для человека паразитов.

Диссертационная работа состоит из основного текста и небольшого приложения. Она построена по стандартной схеме, ее объем и структура приведены в полностью отражающем содержание диссертации автореферате, поэтому я не буду здесь повторять ее содержание.

Во введении детально расписаны актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования и с этим трудно не согласиться.

Большое место в диссертации занимают работы по разнообразию микроспоридий (описаны 12 новых видов и 6 новых родов), однако диссертант решает и другие фундаментальные проблемы клеточной биологии микроспоридий (структура и функции аппарата Гольджи и взаимодействие паразита и хозяина – эксперименты по ингибированию апоптоза клеток хозяина при заражении). Это, безусловно, весомый вклад диссертанта в науку не только микроспоридий, но и паразитологии и клеточной биологии эукариот в целом.

Результаты работы диссертанта хорошо известны научной общественности в нашей

стране и за рубежом. Они представлены на многих отечественных и международных научных конференциях и съездах, по теме диссертации опубликовано 68 работ. Из них 4 главы в коллективных монографиях, опубликованных ведущими издательствами мира, а большинство статей вышло в рейтинговых журналах *J. Eukaryot. Microbiol.* и *J. Invertebr. Pathol.*, что свидетельствует о высоком уровне исследований диссертанта.

Поэтому лично у меня не возникает сомнений в ее ведущем личном участии на всех этапах работы от постановки цели и задач до заключительных теоретических обобщений.

Цель работы, с моей точки зрения, следовало бы сформулировать четче – как обобщение результатов собственных почти тридцатилетних исследований автора по разнообразию и клеточной биологии микроспоридий.

В первой главе (обзор литературы) представлен полноценный обзор по клеточной биологии, эволюции и биоразнообразию микроспоридий на русском языке, впервые после обзора И.В. Исси и В.Н. Воронина, 2007, опубликованном во втором томе Протистов, а не с обзора Исси 1987 года, как указано диссертантом. В этой главе вся самая последняя информация по животрепещущим вопросам строения клетки микроспоридий на разных стадиях жизненного цикла, которые затем раскрываются в основном тексте диссертации, детальное обсуждение их филогении и положения в системе эукариот с историей этого вопроса. Я прочитал эту главу с большим интересом.

Из главы «**Материалы и методы исследований**» следует, что Ю.Я. Соколова владеет всеми необходимыми методами клеточной биологии, с самых первых этапов исследований (сбор материала) до биохимических и молекулярно-биологических, включающих геномные и транскриптомные методы анализа. Именно такой комплексный подход с использованием разнообразных методов клеточной биологии позволил автору получить аргументированные результаты по ключевым проблемам биологии микроспоридий.

Результаты собственных исследований диссертанта многочисленны. Они изложены в трех главах: разнообразие низших и высших микроспоридий (глава 3), особенности аппарата Гольджи у микроспоридий (гл. 4) и модуляция апоптоза клетки хозяина (гл. 5).

В третьей главе, говоря о разнообразии микроспоридий на основе собственных исследований ультраструктуры 20 видов и обзора литературных данных, диссертант справедливо включает в них мечниковеллид и розелломикот (*Paramicrosporidium*).

Сравнительно-ультраструктурный анализ инвазивного аппарата показал структурную гомологию инвазионной трубки парамикроспоридий, манубриума мечниковеллид и полярной трубки высших микроспоридий. В целом трудно не согласиться с таким заключением, однако геномный анализ парамикроспоридия не выявил характерных для полярной трубки высших микроспоридий белков РТР1, РТР2 и РТР3. Поэтому, строго говоря, о гомологии, предполагающей единство происхождения этих структур, рассуждать преждевременно.

На основе показанной в диссертации вариабельности клеточной организации микроспоридий автор рассуждает о видообразовании внутри отдельных групп. Ю.Я. Соколова считает, что диверсификация микроспоридий, как и других паразитов, в целом следует за диверсификацией хозяев, т.е. автор поддерживает догму, что одному виду хозяина соответствует как минимум один вид паразита. Конечно, в одном хозяине может обитать и большее число видов, паразитирующих в клетках разных тканей и органов.

Новый представитель рода *Encephalitozoon*, к которому принадлежат паразиты сельскохозяйственных животных и человека был описан автором из рептилий, что свидетельствует о большей древности рода, чем считалось ранее. В конце главы автор рассуждает о причинах эволюционной успешности высших микроспоридий по сравнению с небольшими по объему группами примитивных парамикроспоридий и прочих розеллид и афелид. Здесь надо заметить, что указанные минорные группы в основании древа опистоспоридий действительно малочисленны по количеству описанных видов, однако их изучение только начинается, а генетическое разнообразие, судя по природным сиквенсам, приближается к тысяче, что вполне сопоставимо с разнообразием высших микроспоридий.

Четвертая глава посвящена исследованиям аппарата Гольджи. Выяснение структуры и функции аппарата Гольджи у микроспоридий, по-видимому, наиболее значительная и трудоемкая часть работы в диссертации. Для этой цели были задействованы разные методы исследований: трехмерная реконструкция по серийным срезам, весьма капризные иммунологические методы и генетический анализ. В результате доказано, что у микроспоридий полностью отсутствуют гены белков эндоцитоза и соответствующие структуры. Их аппарат Гольджи существенно модифицирован: он лишен везикулярного компартмента и представлен только системой трубочек, ведущей от перинуклеарного пространства к плазматической мембране. Именно эта система участвует в восстановлении вокруг спороплазмы плазматической мембраны, утраченной при заражении клетки хозяина.

При обсуждении этого материала автор приводит другой крайний вариант аппарата Гольджи: у трофозоитов *Giardia* секреторный компартмент представлен исключительно эндосомально-лизосомальными компонентами в виде периферических гранул. Здесь можно добавить, что везикулярный путь явно доминирует и у близких опистоспоридиям хитридиомицетов. Т.е. у общего предка грибов и опистоспоридий (куда относятся микроспоридии) был, вероятно, нормальный аппарат Гольджи, сочетающий стопки цистерн с везикулярным транспортом.

В конце главы приведено очень детальное и интересное обсуждение секреторного компартмента эукариот, из которого следует, что похожие модели АГ, хотя и не в таком усеченном виде, имеются у дрожжей, зеленых водорослей, а также некоторых животных.

В качестве вопроса диссертанту: с одной стороны автор пишет, что секреторный компартмент микроспоридий на всех стадиях жизненного цикла организован в виде тубулярных сетей и он осуществляется при полном отсутствии везикул, с другой стороны, мы встречаем в этой же главе при описании второго секреторного пути микроспоридий: «(2) везикулярные кластеры меронтов и споронтов.» Как это понимать?

В пятой главе приведены эксперименты по изучению взаимодействия микроспоридий с метаболическими путями клетки хозяина, связанными с апоптозом. Было показано, что заражение живыми спорами микроспоридий ингибировало митохондриальный сигнальный путь апоптоза, который был индуцирован стауроспорином, а внесение убитых спор, напротив, стимулировало апоптоз. Однако не все эксперименты оказались столь однозначными, поэтому автор справедливо замечает в обсуждении, что это исследование – лишь начальный этап в изучении намеченной проблемы. Я бы добавил, многообещающее начало.

Выводы диссертации полностью вытекают из проделанной работы, согласуются в целом с намеченными задачами и не вызывают существенных замечаний. Разве что многословность и ненужная детализация в выводах 5, 6 и 10.

Диссертация написана хорошим языком, легко читается. Стилистических ошибок мало, но встречаются, главным образом, это жаргонизмы или прямая транслитерация английских слов.

Ниже приведены некоторые из **замечаний**, отмеченных на полях рукописи.

с.7. «известны из представителей большинства классов Metazoa, а также некоторых инфузорий и грегарин» если считать парамикроспоридия и нуклеофагу микроспоридиями, то

и в амебах.

с.10. Лишняя фраза в диссертации о приоритете баркодинга в таксономии микроспоридий: «Такой перекося – вредная тенденция, ставшая следствием не только смены приоритетов, но и утери целого пласта знаний и умений, т.к. специалисты по цитологии и биоразнообразию микроспоридий уходят, а на смену им приходят молекулярные биологи, биоинформатики, генетики и филогенетики, со своими задачами и спектром методических подходов. В результате огромный объем невосполнимой информации, накопленный предыдущими исследованиями, теряется, так как современные специалисты по «омикам» мало читают старую морфологическую литературу, предпочитая «изобретать велосипеды» в интерпретации своих геномных данных.»

с.18. «Отличительным признаком представителей типа *Microsporidia* является спора,...» как минимум неточно: не спора сама по себе, а ее особенности.

с. 24. «В настоящее время выделены и охарактеризованы три белка этого семейства, PTP1 (polar tube protein 1), PTP2 и PTP3. Эти белки не гомологичны ни одному из белков, представленных в базах данных BLAST и PFAM. Между собой белки полярной трубки также демонстрируют низкую степень сходства.» - Это так, у афелид и розеллид гены таких белков отсутствуют. Однако это не обязательно свидетельствует о разном механизме заражения хозяина у этих опистоспоридий. Скорее всего, эти белки обеспечивают построение трубки значительной длины, характерной только для микроспоридий. Кстати, у парамикроспоридия их тоже нет – значит ли это, что криптомикоты не микроспоридии?

с. 27. «**Мне** удалось исследовать структуру спороплазм микроспоридии *Kneallhazia solenopsae* (Sokolova, Fuxa, 2008)». В принципе, мне импонирует указывать в тексте местоимение «я» вместо ложноскромного «мы», если автор сделал работу один и сам отвечает за результат, но в данном случае лучше писать мы.

с. 28 «Интересные данные получены при попытках кратковременного культивирования выделенных спороплазм (Scarborough, Weidner, 1985; Weidner, Trager, 1973). В обогащенной культуральной среде RMP1 1640 удалось достичь стабилизации спороплазм *Spraguea lophii* в течение нескольких часов и даже наблюдать начало деления и эндоцитозную активность.» Эндоцитозная активность микроспоридий автором отрицается в последующем тексте, но эти данные почему-то больше не обсуждаются.

С. 29. «закрытый криптомитоз» вероятно, закрытый плевромитоз, если по И.Б. Райкову. А если по Хиту, тогда просто «криптомитоз».

с. 46. «В некоторых мультигенных и геномных филогениях Aphelidea, Rozellamycota и Microsporidia образуют кладу ARM (Letcher et al., 2013), или супертаксон ранга надтипа Opisthosporidia (James et al., 2013; Karpov et al., 2013),» - путаница с цитированием: мы описали надтип Opisthosporidia в 2014 году.

с. 47 «Этот механизм (использование хитиновой клеточной стенки для генерации внутриспорового давления во время внедрения зародыша), впрочем, унаследован от грибов,» - это невозможно, поскольку у грибов не встречается, а есть только у опистоспоридий – их сестринской группы.

с.52. «Наиболее вероятно, что микроспоридии произошли от эндопаразитического организма, подобного *Rozella*, лишённого жгутиковых зооспор, но сохранившего амебодную трофическую стадию и способность к фагоцитозу, утерянную на более поздних этапах.» - у них же общий предок с розеллой. Как же он может быть безжгутиковый?

с. 91. «Цитоплазматические мостики между ядрами ДК, а также СК, вероятно, свидетельствуют о наличии кариогамии и полового процесса в жизненном цикле *M. spiralis*.» - неточность: цитоплазматические мостики свидетельствуют о кариогамии, - тогда уж кариоплазматические мостики. Кроме того, слияние ядер на стадии СК выглядит странно: им же предстоит еще дважды разделиться перед слиянием.

Часты **неправильные написания латинских названий таксонов**: Opisthoconta, Rozellamycota, *Giardia liamblia*, *Rozella allomyces*, и т.д.

Жаргонизмы: «отсеквенированы», «монотипичный род *Berwaldia* должен уйти в синонимы» - имя рода должно стать синонимом.

Транслитерация английских слов: ревьювер вместо рецензент, Ап-, даун-регуляция (гл. 5.3, 5.4, 5.5), АДП/АТП вместо АДФ/АТФ, стак цистерн вместо стопка цистерн АГ.

Стилистические ошибки: «для выявления морфологических коррелятов диверсификации микроспоридий и эволюционных адаптаций,» - в цели работы.

Слишком детально рассмотрены ранние работы по молекулярной филогении микроспоридий, которые в дальнейшем не обсуждаются и представляют лишь историческую ценность.

Стр. 48. название главы «1.2.3 Родственные связи микроспоридий внутри клады Rozellomycota- Microsporidia (RM): ультраструктура и филогения «переходных форм»: Paramicrosporidium, Nucleophaga и Mitosporidium, а также «примитивных» микроспоридий семейств Metchnikovellidae и Chytridiopsidae.».

«говорят» результаты, характеристики, наличие, реализация, отсутствие, судьбы,...
(более 35 раз)

Все приведенные замечания либо являются дискуссионными, либо редакторскими и никак не умаляют достоинств фундаментальной работы, и ни в коей мере не ставят под сомнение полученные результаты.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертационная работа Ю.Я. Соколовой «БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ И БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСПОРИДИЙ» - полноценное законченное научное исследование, основанное на всестороннем и глубоком анализе большого фактического материала. Она имеет важное теоретическое значение для решения общебиологических проблем, а в перспективе может послужить основой для разработки биологических методов борьбы с вредными насекомыми и методов лечения человека и животных от микроспоридиоза. Материалы этой работы могут быть использованы в лекционных курсах по эволюции, филогении и биологии клетки протистов. Диссертация 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, Ю.Я. Соколова, достойна присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 – Паразитология.

Отзыв подготовлен доктором биологических наук, главным научным сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук Карповым Сергеем Алексеевичем (докторская диссертация защищена по специальности 03.00.08 - «Зоология», диплом ДК № 017828, от 05.02.1993г.).

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук
e-mail: sergei.karpov@zin.ru



Карпов
Сергей Алексеевич

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Зоологический институт
Российской академии наук
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. д.1
Тел.: (812) 328-03-11
Факс: (812) 328-29-41, (812) 328-02-21,
(812) 714-04-44
E-mail: admin@zin.ru, office@zin.ru,
WWW: <http://www.zin.ru>

25 октября 2019 г.

Подпись руки Кар
Сергей Алексеевича
удостоверяется
Ученый секретарь И

