

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
РГПУ им. А. И. Герцена



Л.А. Цветкова

«28» октября 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена» на диссертацию Соколовой Юлии Яновны «Биология клетки и биоразнообразии микроспоридий», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 Паразитология в диссертационный совет Д 002.223.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт Российской академии наук» по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

Актуальность темы. Изучение микроспоридий на протяжении долгого времени носило в основном прикладной характер, что обусловлено их большим значением как паразитов экономически ценных беспозвоночных. Более того, появились данные о их патогенности для позвоночных животных, включая человека. С другой стороны, важное значение придавалось использованию микроспоридий в организации биологического контроля за распространением вредных для сельского хозяйства насекомых, а также паразитов (например, трематод), вызывающих гельминтозы человека и домашних животных. В последнее время усилился теоретический аспект изучения микроспоридий, чему способствовало внедрение в исследовательскую практику методов электронной микроскопии, молекулярной биологии, биоинформатики. Интенсивно обсуждается положение этих протистов в системе эукариот, их биология, включая адаптации к паразитизму, и видовое многообразие. К сожалению, далеко не

все специалисты имеют теоретическую и практическую подготовку для проведения комплексного анализа как биологии объекта, так и его биоразнообразия. Ю. Я. Соколова, безусловно, обладала этим заделом в отношении микроспоридий, поэтому выбранная ею тема для диссертационной работы представляется хорошо продуманной и чрезвычайно актуальной.

Цель работы заключается в изучении многообразия клеточной организации и жизненных циклов микроспоридий, паразитирующих в хозяевах из разных систематических и экологических групп, для выявления морфологических коррелятов диверсификации микроспоридий и эволюционных адаптаций, которые обеспечили этим паразитам широкое распространение среди разнообразных животных, а также для разработки подходов к изучению инфекций человека.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить строение и жизненные циклы представителей семейства *Metchnikovellidae*;
2. Изучить ультраструктуру, особенности внутриклеточного развития и филогенетические связи микроспоридий членистоногих;
3. Изучить распространение микроспоридий у рептилий и родственные связи *Encephalitozoon pogonae* с видами рода *Encephalitozoon*, патогенными для теплокровных;
4. Используя отработанные методики идентификации микроспоридий, изучить распространение микроспоридиоза у ВИЧ-инфицированных пациентов Больницы им. Боткина, СПб;
5. Изучить функциональную морфологию аппарата Гольджи микроспоридий как структурной основы для образования и дальнейшего совершенствования аппарата экстрезии;
6. На клеточных моделях «микроспоридии *E. cuniculi* и *V. corneae* – культура макрофагов человека» экспериментально подтвердить гипотезу об ингибировании апоптозного каскада клетки хозяина как универсального механизма патогенеза микроспоридиоза.

Научная новизна. Описано 12 новых видов и выделено 6 новых родов микроспоридий (*Apotaspora*; *Kneallhazia*, *Larssonia*, *Liebermannia*, *Mockfordia*

и *Paranosema*); 30 сиквенсов депонированы в Генбанке. Впервые изучена специфическая организация «минимальной» секреторной системы микроспоридий, на базе которой сформировались основные компоненты аппарата экструзии. На примере микроспоридий показано, что секреторная система эукариотической клетки может функционировать в отсутствие системы везикулярного транспорта. Впервые на клеточной системе с двумя 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 клетки хозяина.

Теоретическая и практическая ценность работы.

В работе обобщены данные по клеточной биологии, эволюции и биоразнообразию микроспоридий. Материалы диссертации использованы в лекциях и практических занятиях кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ и для подготовки монографий: (1) «The Microsporidia and Microsporidiosis», 1990; (2) «Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты», 2001; (3) «The Golgi Apparatus. State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery», 2008; (4) «Microsporidia: Pathogens of Opportunity», 2014. Описанная в диссертации ультраструктура жизненного цикла *Paranosema locustae* вошли в учебник паразитологии США «Foundation of Parasitology» (Roberts, Janovi, 2004; Schmidt, Roberts, Janovi, 2009, 2013). Методики идентификации микроспоридий успешно применены для диагностики микроспоридиозов и идентификации видов в экспериментальной группе пациентов Инфекционной больницы им. Боткина, СПб. Описание новых родов и видов микроспоридий, уточнение жизненных циклов, структурной организации клетки, а также выяснение филогенетического положения этих паразитов важно для построения естественной системы микроспоридий, а также оценки их роли в биологических сообществах. Изучение микроспоридий насекомых, вредящих здоровью и хозяйственной

деятельности человека, позволило разработать методы диагностики этих микроспоридий и помогло оценить их роль в снижении численности хозяев. Изучение микроспоридии *Agmasoma penaei*, паразита креветок, выявило широкую распространенность инфекции в Луизиане (США) и необходимость ее диагностики и профилактики. Исследование функциональной морфологии аппарата Гольджи показало, что микроспоридии представляют собой модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, перспективной для изучения физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. Сравнительное изучение влияния заражения двумя видами микроспоридий на индукцию апоптоза в макрофагах и экспрессию генных кластеров, ответственных за регуляцию апоптоза, показало подавление митохондриального сигнального пути апоптоза обоими видами при наличии видоспецифичных механизмов регуляции клеточного цикла хозяина. Эти исследования расширяют представления о многообразии ответных реакций макрофагов на инфекцию эукариотическими микробами.

Структура и объем диссертации. Диссертация Ю. Я Соколовой состоит из Введения, пяти глав («Обзор литературы»; «Объекты и методология исследований»; «Цитология, жизненные циклы и филогения микроспоридий...»; «Аппарат Гольджи и секреторный транспорт микроспоридий»; «Модуляция апоптоза клетки хозяина как механизм патогенеза микроспоридий»), Заключения, Выводов, Списка литературы и Приложения. Работа изложена на 278 страницах и содержит 16 таблиц, 53 рисунка. Список литературы включает 484 источника.

Апробация. Результаты диссертации напечатаны в 68 публикациях, (из них 62 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ), также представлены в более, чем 30-и докладах на конференциях и семинарах, многие из которых являются международными.

Характеристика работы.

Во Введении (излишне пространном, – 17 стр., – за счет материала более уместного в обзоре литературы) автор описывает теоретическую и

практическую значимость работы, обосновывает ее актуальность, а также отмечает научную новизну исследования. Здесь же приводятся основные положения, выносимые на защиту диссертации и формулируется цель и задачи исследования. В этом же разделе отражена апробация работы, объём и структура диссертации.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Она очень объемна – насчитывает 40 страниц, однако не представляется искусственно раздутой. Именно здесь автор системно излагает современные представления об организации клетки микроспоридий на разных уровнях. Особенно ценны в выполненном анализе объяснения функционального значения рассматриваемых морфологических структур. Далее Соколова переходит к дискуссионному вопросу о положении микроспоридий в системе эукариот. Выполнив детальный анализ истории и современных взглядов на эволюцию и макросистематику микроспоридий автор признаёт место этих протистов внутри Opisthokonta, а затем подробно рассматривает родственные связи микроспоридий внутри этой группы. В целом глава получилась очень цельной, логично выстроенной и хорошо написанной. После небольшой доработки может быть рекомендована к опубликованию в виде обзорной статьи.

В следующей Главе 2 описаны материалы и методы, положенные в основу диссертационного исследования. Она дает полное впечатление о масштабе исследования. Впечатляет перечень изученных автором микроспоридий – более 30, хозяевами которых являются представители 13 сложных таксонов. В главе имеется детальное описание мест сбора или условий содержания клеточных культур и методов исследования, основными из которых стали световая, конфокальная и электронная микроскопии, а также разнообразные биохимические методы (включая молекулярно-биологические). В целом используемые методы соответствуют задачам исследования и полностью отвечают критерию воспроизводимости. Указано использованное оборудование, перечень реактивов. Эти сведения

обеспечивают полное доверие к достоверности полученных результатов. При этом не возникает сомнений в профессиональном владении автором методами работы с живым материалом и его экспериментальной обработкой.

Последующая часть рукописи включает 3 главы, посвященные изложению и обсуждению результатов. При этом Главы 3 и 5 завершаются собственными заключениями, а в Главе 4 оно отсутствует. В целом эти главы дают полное впечатление о масштабе выполненных исследований и содержат критический анализ собственных результатов и литературных данных. Получены новые данные об ультраструктурной организации микроспоридий, их физиологических особенностях, путях внутриклеточной регуляции и размножении. Также подробно проанализированы филогенетические взаимоотношения представителей микроспоридии, предложены пути возможной их дивергенции.

Завершается диссертация Заключением и Выводами. К сожалению, Заключение представляет собой во многом перечисление выполненных автором работ и полученных результатов, а не обобщенный анализ материала диссертации. С учетом краткости промежуточных заключений в работе не хватает полноценного обсуждения. Для того, чтобы понять авторскую позицию по рассматриваемым вопросам необходимо детально ознакомиться со всей рукописью. Это замечание касается в большей степени удобства знакомства с работой и не снижает её общей высокой оценки.

Выводы, в целом, соответствуют поставленной цели и задачам исследования и, в целом, отражают объём выполненной работы. Не является выводом только восьмой, отражающий скорее новизну исследования, но не его результаты. В последнем предложении вывода 6, очевидно, пропущено слово «анализ». Не очень понятно значение слова диверсифицированный в выводе 7: «...род микроспоридий диверсифицированный среди... позвоночных...».

В целом работа написана ясно, хорошо иллюстрирована, однако частые опечатки, а также использование некоторых слов в непривычном значении

несколько затрудняют чтение. То же слово «диверсификация» используется как термин для разных явлений – и для филогенетических различий, и для описания разнообразия форм (стр. 45, стр. 271). Также термин «сиквенс» обозначает и нуклеотидную последовательность (стр. 103, 111, 149, 269), и «секвенирование» (стр. 80). На стр. 149: «Первый сиквенс выявляет максимальную гомологию с сиквенсом *Larssonia obtusae* (86%) из копепод, второй – с *Vairimorpha* sp. (84%) из чешуекрылых». Нуклеотидные последовательности гомологичны? Он сам себя выявляет?

Часто используется термин ПЦР амплификация (стр. 73, 71, 84). Есть полимеразная цепная реакция, в процессе которой происходит амплификация участка ДНК. Каким другим способом можно осуществить амплификацию гена? Если только клонированием. Но тогда указывают, что «нарабатывают» плазмиду или ген. На стр. 82: «амплификацию проводили в стандартном термоциклере...». В русском языке используется «термоциклер» или «амплификатор». Список подобных неточностей можно продолжать, но в целом они не снижают впечатления о диссертации Соколовой как о фундаментальном исследовании, имеющем большое теоретическое и практическое значение.

Заключение. Диссертация Соколовой Юлии Яновны «Биология клетки и биоразнообразие микроспоридий», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук, представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне, и отвечает паспорту специальности 03.02.11 Паразитология.

Автореферат и публикации полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям п. 9-14 положения «О присуждении учёных степеней» от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а

её автор, Соколова Юлия Яновна, достойна присуждения искомой степени по специальности 03.02.11 Паразитология.

Отзыв составлен заведующим кафедрой зоологии, д.б.н., проф. Г. Л. Атаевым.

Отзыв рассмотрен и обсуждён заседании кафедры зоологии. Присутствовало на заседании 17 человек. Результаты голосования: «за» –17 человек, «против» –нет (протокол заседания № 2 от 17.10.2019 г.).

Заведующий кафедрой зоологии

Д.б.н., профессор

РГПУ им. А.И. ГЕРЦЕНА

подпись 

Г.Л. Атаев

удостоверяю 28 10 2019 года
Отдел персонала и социальной работы
управления кадров и социальной работы



Ведущий документовед
отдела персонала
и социальной работы


В.В. Рубинчик

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», (РГПУ им. А.И. Герцена), 191186, Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, дом 48. Телефон: (812) 570-61-96. Официальный сайт: <http://herzen.spb.ru/>. Электронная почта: mail@hezen.spb.ru