

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета

на диссертацию Миронова Тимофея Ивановича на тему: «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология

### Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Т.И. Миронова посвящена детальной цитологической характеристике особой симбиотической системы, образованной инфузурией (хозяином) и бактерией, заселяющей ее ядро (макронуклеус). Использование таких клеточных систем, если они, конечно, разносторонне охарактеризованы (это является главной задачей работы), позволяет решить многие задачи, как-то: выявление общих и специфических черт симбиотических отношений (паразит — хозяин) между эу- и прокариотической клеткой, особенно если в качестве симбионта выступает, как в данном случае, бактерия, относящаяся к группе социально значимых микроорганизмов, потенциально патогенных для человека; исследование устойчивости эндосимбионта и всей симбиотической системы к действию антибиотиков и антимикробных пептидов; введение в практику научных исследований новой адекватной модели для разработки концепции холобиоза, в том числе для решения вопросов его происхождения. Все вышесказанное не оставляет сомнения в актуальности избранной темы. Но есть еще одна немаловажная проблема, к решению которой только-только начинают подступать подобного рода исследования, — это вопрос о структуре и функциях самого ядра клетки-носителя (хозяина), этой сложной и тонко регулируемой многоуровневой системы, которая успешно функционирует в присутствии большого количества подвижных эндонуклеобионтов. Как регулируется столь сложная система, каковы механизмы компенсации тех или иных ядерных функций, возможно, сниженных в условиях нуклеобиоза, — эти актуальные и непознанные пока проблемы, имеющие и сугубо научную, и научно-практическую медико-биологическую значимость, еще предстоит решить.

## **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

В результате проведенного Т.И. Мироновым исследования, которое легло в основу диссертации, впервые описан новый для науки род и вид внутриядерных симбионтов инфузории *Paramecium multimicronucleatum* — риккетсиеподобная бактерия, названная кандидатным видом (*Ca.*) *Trichorickettsia mobilis*, несущая (в отличие от других риккетсий) многочисленные функциональные жгутики; при этом наличие жгутиков у риккетсий продемонстрировано впервые. Предложены возможные пути происхождения и определена таксономическая принадлежность нового рода и вида в семействе *Rickettsiaceae*. Доказано, что *Ca. T. mobilis* является облигатным эндонуклеосимбионтом, неспособным жить вне клетки-хозяина (в культуре). В отсутствие ряда существенных ограничений, которые накладывает работа с патогенными микроорганизмами, новая модельная система открывает возможности изучения тонких механизмов взаимодействия риккетсий с эукариотической клеткой. В контексте цитофизиологии новой эндосимбиотической системы организмов показано, что она чрезвычайно устойчива к действию антимикробных пептидов и антибиотиков, используемых для лечения риккетсиозов.

Полученные диссертантом оригинальные и приоритетные данные следует использовать в курсах лекций и практических занятий для студентов и аспирантов, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» и специализирующихся в области цитологии, клеточной биологии, микробиологии, а также включать в учебники и учебные пособия, рекомендуемые УМО организаций биологического профиля ВПО России.

## **Объем, структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, оформлена по традиционному плану, содержит оглавление, список сокращений и включает следующие разделы: «Введение» (8 с.); «Обзор литературы» (37 с. — 8 подразделов, 3 рис.); «Материалы и методы» (9 с. — 2 табл.); «Результаты» (28 с. — 3 подраздела, 20 рис., 4 табл.); «Обсуждение» (13 с. — 10 подразделов);

выводы (5); благодарности; список литературы, включающий 349 наименований, из которых 12 на русском языке, 377 — на иностранных.

Во Введении диссертант обосновывает актуальность тематики в контексте исследования симбиозов, холобионтных систем на основе клеток протистов, тонких механизмов взаимодействия между симбиотическими партнерами на клеточном уровне. Определены теоретическая и практическая значимость исследования, его новизна; сформулированы основная цель, 4 конкретные задачи, а также положения, выносимые на защиту. Главные из них касаются описания нового вида бактерий — облигатных эндонуклеосимбионтов инфузории *P. multimicronucleatum*, а также разносторонней характеристики симбиотической системы в целом. Приведен список публикаций по теме диссертации, включающий 3 статьи в рецензируемых журналах и 8 тезисов докладов.

Обзор литературы свидетельствует о большой научной эрудиции автора. В нем всесторонне обсуждена проблема симбиоза, в том числе в историческом ключе, с акцентом на симбиозах протистов — амёб, жгутиконосцев и инфузорий. Подробно рассмотрены примеры эндонуклеосимбионтных отношений. Специальный подраздел посвящен риккетсиям и риккетсиоподобным бактериям. Особый интерес вызывает рассказ о современных направлениях исследований симбиозов протистов с другими микроорганизмами с точки зрения эволюции и экологии, а также о современных методических подходах к решению разнообразных задач, связанных с исследованием симбиозов.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о высоком профессионализме диссертанта как исследователя-экспериментатора, умеющем на практике умело применять разнообразные методики клеточной биологии. В целом представленные в диссертации протоколы воспроизводимы, и данный раздел не оставляет сомнения в том, что диссертант в совершенстве владеет всеми перечисленными в нем методами.

Особо следует отметить методику гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* с одновременным использованием двух зондов, позволяющих в разных экспериментах четко и убедительно отсеleccionировать симбионта макронуклеуса парамеции от иных бактериальных контаминаций. На меня результаты FISH

произвели особенно сильное впечатление. Кроме того, выполнение задач данного исследования было бы невозможно без использования трансмиссионной электронной микроскопии, выполненной на высоком уровне. Качество пробоподготовки, ультрамикротомирования и контрастирования срезов для электронной микроскопии заслуживает отдельной похвалы. В этой связи, переходя к результатам, отмечу, что использование трансмиссионной электронной микроскопии (с использованием негативного контрастирования) вкупе с атомно-силовой микроскопией позволило достоверно установить наличие у бактерий-эндосимбионтов многочисленных длинных жгутиков, что является важным таксономическим и филогенетическим признаком.

Раздел «Результаты» позволяет всесторонне оценить большой масштаб проделанной диссертантом экспериментальной работы. Достоверно установлена принадлежность парамеции-хозяина к виду *P. multimicronucleatum*. Установлено филогенетическое положение и определена таксономическая принадлежность специфического эндонуклеосимбионта макронуклеуса *P. multimicronucleatum* (в разных клонах этой парамеции). Показано, что, несмотря на многочисленные функциональные жгутики, отсутствующие у других риккетсий, эта бактерия принадлежит к семейству Rickettsiaceae порядка Rickettsiales. В экспериментах с использованием антибиотиков возрастающей концентрации (в том числе применяемых в медицине для лечения риккетсиозов) и при обработке клеток антибактериальными пептидами установлено, что симбиотическая система *Paramecium/Trichorickettsia* отвечает на действие противомикробных агентов по принципу «всё или ничего»: эндосимбионты или сохраняются в макронуклеусе, или инфузория погибает вместе с ними. Интересным эффектом является обнаруженный диссертантом выход трихориккетсий из ядра парамеции в цитоплазму, хотя судьбу таких бактерий проследить не удается.

Результаты, полученные в ходе экспериментальной работы, разносторонне проанализированы в разделе «Обсуждение». Специально обсуждается проблема, могут ли риккетсии (риккетсиеподобные бактерии) иметь жгутики, и другие важные вопросы, как-то: каковы филогенетическое/таксономическое положение нового вида и его распространенность? какое значение имеет исследование «немодельных» риккетсий для изучения биоразнообразия и эволюции представителей порядка Rickettsiales? Специально обсуждаются

результаты, свидетельствующие о высокой резистентности *Ca. T. mobilis* к антибиотикам и антибактериальным пептидам, а также о высокой стабильности симбиотической системы *Paramecium/Trichorickettsia* в целом.

Выводы диссертации (их 5) напрямую следуют из полученных результатов и их обсуждения, соответствуют цели и задачам представленной диссертационной работы, хорошо аргументированы и подтверждены на большом объеме экспериментального материала.

Результаты диссертации достаточно полно отражены в 3-х статьях, опубликованных в рецензируемых международных журналах. Во всех публикациях личный вклад автора является определяющим, в 2-х статьях диссертант — первый автор. Материалы диссертации апробированы на 8 всероссийских и международных конгрессах по клеточной биологии и протистологии.

### **Критические замечания и вопросы к дискуссии**

*По существу* диссертационной работы Т.И. Миронова принципиальных возражений и замечаний, способных повлиять на ее оценку, у меня нет. Однако при ее прочтении возникло несколько вопросов дискуссионного характера, а также замечаний к написанию и оформлению.

1. В названии диссертации перед словом «инфузория», согласно действующим нормам русского языка, необходима постановка тире.

2. По поводу «Введения» хочется сделать ремарку: аббревиатура *Ca.* (кандидатный вид), употребляемая в тексте диссертации 137 раз, должна была быть расшифрована в начале работы, а не ближе к ее концу — лишь на с. 67, поскольку читатели, специализирующиеся в разных областях клеточной биологии, не обязаны в совершенстве владеть правилами таксономии микроорганизмов.

То же касается и следующего раздела, когда, например, ссылка (Осипов и др., 1996) относительно использования термина «симбиотрофная вакуоль» должна была появиться при первом упоминании этого термина (с. 13), а не спустя 5 страниц (с. 18).

3. Раздел «Обзор литературы», на мой взгляд, можно было бы сократить за счет второстепенных и (или) частных деталей. В первую очередь из раздела

«Обзор литературы» я бы исключил подразделы, рассматривающие эндосимбионты амёб и жгутиконосцев, начав повествование сразу с инфузорий, а информацию, содержащуюся в этих разделах, если необходимо, использовал бы при обсуждении результатов.

Например, не имеет прямого отношения к теме исследования такая информация: «Для большинства свободноживущих амёб характерен гетеротрофный способ питания. Основным источником энергии для них служат бактериальные колонии, одноклеточные водоросли и грибы прудов и озер (Leidy, 1878)» (с. 19). Или: «...активированная инфекционная форма [холоспоры] выходит из пищеварительной вакуоли инфекционным концом *вперед* (Iwatani et al., 2005)» (с. 42; выделено мною. — Д.Б.). Или рассуждения относительно пластид (с. 36–37), которые, очевидно, не свойственны парамециям.

Если опустить избыточно-необязательные детали, не имеющие прямого отношения к теме диссертации и не обсуждаемые в контексте полученных результатов, текст получился бы более емким и легким для восприятия. Как следствие, сократился бы и список литературы, который, на мой взгляд, избыточен и содержит ссылки на первоисточники, не имеющие прямого отношения к содержанию диссертации.

Наоборот, в конце этого раздела мне не хватило небольшого резюмирующего заключения. Хотя подраздел 2.8.4 «Методические подходы к исследованию симбиотических систем инфузорий», по сути, можно рассматривать в качестве такого заключения, пара фраз, которые могли бы служить «связующим звеном» между обзором литературы и содержательной частью конкретного исследования, были бы, на мой взгляд, нелишними.

4. Раздел «Материал и методы» вызывает некоторые вопросы/замечания частного характера и содержит ряд отдельных — незначительных — неточностей.

4.1. Несколько таких замечаний и вопросов возникло при прочтении подраздела 3.6 «Трансмиссионная электронная микроскопия»:

— хотя сплошь и рядом так пишут, некорректно говорить о процентной концентрации *пара*формальдегида — надо писать: *хх* %-ный раствор формальдегида, приготовленный из параформальдегида;

— зачем в некоторых случаях пробоподготовки для электронной микроскопии использовали одновременную фиксацию двумя альдегидами — формальдегидом и глутаральдегидом (с. 50)?

— не указана молярность и рН какодилатного буфера;

— важно, какую именно смолу использовали для заключения образцов: словосочетание «смола для заливки фирмы Fluka» (с. 51) неинформативна;

— не объясняется, с чем связана необходимость использования сахарозы в довольно высокой (12.5%) концентрации в фиксаторах для парамеций (там же), тогда как даже для клеток млекопитающих обычно используют 8.5%, а пресноводных беспозвоночных нередко фиксируют без добавления сахарозы?

— если для контрастирования цитратом свинца использовали не традиционный раствор, приготовленный по Рейнольдсу, а «1 %-ный водный раствор цитрата свинца» (там же), который, возможно, готовили из коммерчески доступного реактива (так? — *Д.Б.*), то тогда следует указывать производителя; кроме того, в воде цитрат свинца нерастворим — только в довольно крепкой щелочи (рН ~ 12).

4.2. При проведении реакции Фёльгена используется окраска фуксинсернистой кислотой (реактивом Шиффа), а не просто «окраска фуксином» (с. 50).

4.3. Не указана концентрация DAPI — она может существенно различаться при окраске разных клеток разных объектов.

4.4. Описание атомно-силовой микроскопии (разд. 3.8, с. 52) приведено чрезвычайно лаконично. В частности, возникают вопросы: как высушивали образцы? каковы параметры работы микроскопа и микроскопирования? Наоборот, если антибактериальные пептиды FLIP7 (их фракции) получали не сами (с. 56), то подробное описание этой методики в отдельном подразделе (3.13) избыточно, достаточно было ограничиться парой значимых фраз и ссылкой на первоисточник.

4.5. В начале разд. 3.11 «оборвана» начальная фраза: «Филогенетический анализ был проведен... с использованием 32 последовательностей» [точка] (с. 53). Последовательностей чего? 16S рРНК?

5. При знакомстве с описаниями результатов также возникли незначительные вопросы частного характера.

5.1. На рис. 4 показаны результаты окраски инфузории по Фёльгену; при этом наряду с локальными областями «с низкой конденсацией хроматина в [макронуклеусе]» (подпись к рис. 4; с. 58) ядро в целом окрашено очень интенсивно. Как соотносится столь «плотная» картина окрашивания по Фёльгену

с утверждением, сделанным в «Обзоре литературы» на с. 18, о «низкой степени конденсации хроматина (Осипов, 1981)» у инфузорий?

5.2. Возник вопрос и относительно Фёльген/DAPI-негативных обширных полостей/лакун в макронуклеусе (рис. 4а; 5), в которых при прижизненных наблюдениях «активно двигались эндосимбионты» (с. 59). В то же время, судя по рис. 7а (электронная микроскопия) и рис. 10г (FISH), в таких «лакунах» эндосимбионтов мало. Вопрос: действительно ли появление лакун в ядре связано с эндонуклеосимбиозом или это какая-то специфическая особенность ядра (макронуклеуса) клетки-хозяина? Например, наблюдаются ли они в макронуклеусах незараженных штаммов парамеций?

5.3. Как неспециалист в области построения филогенетических «деревьев», я прошу диссертанта дополнительно пояснить рис. 12 (Филогенетическое дерево бактерий сем. Rickettsiaceae, построенное по методу Байеса. Дерево построено с применением GTR+I+G модели...). Метод описан в подразделе 3.11 раздела «Материалы и методы», но требует объяснения «простыми словами» согласно актуальному в настоящее время принципу easy-to-read / plain language. Например, на рис. 12 представлены и симбионты, и их хозяева, и какие-то связи между ними. Как получают подобного рода рисунки, как их читать и как понимать? Что обозначают связи (линии) между про- и эукариотами? Ясно, что не эволюцию. Почему тогда «филогенетическое дерево»?

5.4. Непонятна фраза (с. 79): «в цитоплазме... присутствуют отдельные трихориккетсии, окруженные хроматином...». Что такое цитоплазматический хроматин?

6. Несмотря на то что обсуждение полученных результатов носит непротиворечивый характер и в целом демонстрирует умение автора анализировать и правильно интерпретировать результаты собственных наблюдений в свете имеющихся представлений, не могу не задать некоторые вопросы и по этому разделу.

6.1. Вопрос к общей дискуссии: почему все-таки автор считает, что открытый им вид бактерий принадлежит к риккетсиям? Как отмечает сам диссертант, «...все представители [порядка Rickettsiales] не имеют жгутиков» (с. 87). Разве это не главный диагностический признак, несмотря на 97.3 %-ное сходство последовательности гена 16S рРНК (с. 64) и обнаружение в геноме риккетсий



генов, кодирующих белки жгутиков (с. 31)? Следуют рассуждения о том, что «предки бактерий из порядка Rickettsiales когда-то могли нести функционировавшие жгутики, которые позже были утрачены в ходе эволюции». Но в данном случае речь-то о современном виде, а не о предковой форме. Я согласен с автором, что представление о том, что «жгутики и подвижность у внутриядерных симбионтов *P. multimicronucleatum* появились вторично в результате горизонтального переноса генов... основывается лишь на допущениях» (там же). Но данные электронной микроскопии о присутствии вирусоподобных частиц (если это действительно так) ничего не могут сказать о переносе генов, который когда-то, возможно, имел место. Вместе с тем, автор настаивает на опровержении представлений об отсутствии жгутиков в порядке Rickettsiales и внесении изменений в описание порядка Rickettsiales (с. 87). Это серьезное заявление. Поэтому в порядке дискуссии прошу диссертанта еще раз, кратко и емко, аргументировать свою позицию.

6.2. Требуется редакционная правка/уточнения диагноз нового вида *Ca. Trichorickettsia mobilis*:

— «бактерия палочковидной формы» — а как же овальные, которые неоднократно упоминаются в работе и которые, согласно автору, «следует рассматривать как персистирующие формы, которые... отвечают за стабильность симбиотической системы» (с. 93)?

— «заселяет [макронуклеус] и цитоплазму» — насколько я понял, трихориккетсии в первую очередь являются внутриядерными симбионтами (например, по данным FISH), а в цитоплазме инфузорий они в основном оказываются благодаря действию антимикробных препаратов (у автора: «бактерии находились в [макронуклеусе]... и не обнаруживались в цитоплазме» — с. 69).

Дополнительно хочу указать автору на некоторые стилистические неточности и неудачные словосочетания относительно всего текста:

— «недифференцированные цианобактерии» (с. 22): что понимается в данном контексте под словом «дифференцировка»?

— «...бактерия не окружена мембраной клетки-хозяина» (с. 32): речь идет об эндосимбионте, который так или иначе мембраной хозяина окружен;

— «совсем недавно, в 2005 году» (с. 33);

— неоправданным является дальнейшее повторение термина «сфероидные тельца» после первого его упоминания и объяснения (с. 37), если это, по сути, эндосимбиотические цианобактерии; в этой связи словосочетание «геном ... телец» (с. 38) звучит довольно странно;

— крайне неудачным является словосочетание/определение «слизевой грибок» применительно к *Dictyostelium*: по-русски это слизевик;

— нельзя писать «*подвижный* эндосимбионт» (*подпись к рис. 7*, с. 61), если речь идет о рисунке, иллюстрирующем результаты исследования срезов фиксированного материала с помощью электронной микроскопии;

— при описании результатов электронной микроскопии (в силу природы метода) нельзя использовать прилагательные «светлый/темный» (например, с. 62): следует писать «электронно-прозрачный/электронно-плотный».

7. Что касается выводов диссертации, то в них не отражены важные, с моей точки зрения, результаты работы, свидетельствующие о невозможности получения парамеций, лишенных эндосимбионтов (аписимбиотических линий *P. multimicronucleatum*), и, наоборот, о невозможности существования *Sa. Trichorickettsia mobilis* вне клетки-хозяина.

При этом из всего вышесказанного совершенно очевидно, что все возникшие вопросы к диссертанту и замечания к диссертации носят *исключительно* редакционно-технический характер, совершенно не затрагивают существа работы и не умаляют ее научно-теоретической и практической значимости.

Считаю, что диссертация Т.И. Миронова представляет собой целостное, всесторонне обоснованное экспериментальное исследование, обладающее несомненной новизной и тщательно выполненное с применением современных методов клеточной биологии. Результаты полностью достоверны, а выводы обоснованны.

## **Заключение**

Диссертационная работа Миронова Тимофея Ивановича является законченным в рамках поставленных задач научно-квалификационным самостоятельным исследованием, выполненным на современном методическом уровне и базирующимся на обширном экспериментальном материале. Она

содержит новые обоснованные положения, которые можно трактовать как новое решение актуальной научной задачи в области клеточной биологии — поиска адекватной модели изучения внутриядерного симбиоза между социально значимыми бактериями (риккетсиями) и эукариотической клеткой (инфузориями). Диссертация Т.И. Миронова, несомненно, открывает перспективы дальнейших исследований в области клеточной биологии протистов, эндосимбиоза (особенно эндонуклеосимбиоза) и разработки концепции холобиоза.

По актуальности темы исследования, степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности, новизне, научно-теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Миронова Тимофея Ивановича на тему: «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*» полностью соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», а соискатель Миронов Тимофей Иванович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета:

главный научный сотрудник  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

доктор биологических наук



Д.С. Боголюбов

Контактные данные:

тел.: +7 (812) 2971829 (дирекция ИНЦ РАН); моб. тел.: +7 (911) 2116330;  
e-mail: [dbogol@mail.ru](mailto:dbogol@mail.ru); [dmitr@incras.ru](mailto:dmitr@incras.ru)

Специальность, по которой членом диссертационного совета защищена диссертация:  
1.5.22 – Клеточная биология  
(шифр и специальность на момент защиты: 03.03.25 – гистология, цитология,  
клеточная биология).

Адрес места работы:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4 \*



*Боголюбова Д.С.*

9.09.2024г

*Григорьев*