

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Боголюбовой Ирины Олеговны  
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

Работа Тимофея Ивановича Миронова посвящена эндосимбиотической системы, образованной инфузориями *Paramecium multimicronucleatum* и подвижными бактериями, локализующимся в макронуклеусе инфузорий. Актуальность работы определяется биологической уникальностью феномена симбиоза, с одной стороны, и широкой встречаемостью и разнообразием симбиотических систем в природе, с другой стороны. Новые данные, представленные в диссертации Т.И. Миронова, имеют не только теоретическую, но и практическую значимость, поскольку многие эндосимбионты инфузорий идентичны или родственны микроорганизмам, вызывающим опасные заболевания человека и животных.

Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и имеет общепринятую для работ подобного рода структуру. Результаты диссертации отражены в 3 статьях, опубликованных в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах WoS и/или Scopus (Q1).

В разделе «Введение» (6 с.) автор обосновывает актуальность и новизну своего исследования, раскрывает его теоретическую и практическую значимость, формулирует цели и задачи работы.

Обзор литературы (37 с.) посвящен различным теоретическим аспектам проблемы симбиоза (понятие симбиоза, классификация симбиозов, роль симбиотических систем в эволюции), а также описанию симбиотических систем, в которых хозяевами являются протисты, включая механизмы взаимодействия партнеров в таких системах. Обзор литературы написан интересно, понятным языком, иллюстрирован тремя схемами, заимствованными из цитируемых источников (с соответствующими ссылками). В совокупности со списком литературы, включающим 337 источников (из них 12 на русском, 337 — на английском языке), текст этой главы свидетельствует о глубокой проработке автором литературы, связанной с тематикой исследования.

В разделе «Материал и методы» (9 с.) приведена вся необходимая информация об использованных в работе штаммах инфузорий и экспериментальных процедурах. Данный раздел работы наглядно демонстрирует большой объем экспериментальной работы, проведенной автором, а также широкий спектр освоенных им методик, начиная от ведения культур инфузорий и современных методов морфологического анализа (включая трансмиссионную электронную микроскопию, атомно-силовую микроскопию и FISH) до экстракции и фракционирования антимикробного пептидного комплекса FLIP7 и биоинформатического филогенетического анализа.

Раздел «Результаты» (27 с.) состоит из 4 параграфов, содержит 20 рисунков и 4 таблицы. Хочется отметить очень высокое качество микрофотографий и электроннограмм; очевидно, что автор в совершенстве овладел трудоемкими и «капризными» методами морфологического анализа и приложил большие усилия для адаптации соответствующих протоколов к клеткам инфузорий.

В параграфе 4.1. раздела «Результаты», озаглавленном «Общая характеристика симбиотической системы *Paramecium multimicronucleatum*/Ca. *Trichorickettsia mobilis*», представлены данные о морфологических особенностях эндосимбионтов, обитающих в клетках инфузорий клона LSA11-2, полученные с помощью прижизненных наблюдений, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии, а также результаты биоинформатического анализа филогенетического положения эндосимбионтов, верифицированные с помощью FISH. Благодаря подобному комплексному подходу автор делает заключение о том, что подвижный внутриядерный эндосимбионт инфузории *P. multimicronucleatum* представляет собой новый род в семействе Rickettsiaceae, представители которого в отличие от других риккетсий обладают жгутиковым аппаратом. Для этих симбионтов автор предлагает название Ca. *Trichorickettsia mobilis*. В параграфе 4.2. представлены результаты FISH, доказывающие принадлежность макронуклеарных эндосимбионтов из других клонов *P. multimicronucleatum* (клоны Busnau, Kp154-4 и AB9-4) к этому же виду. С моей точки зрения, материал параграфа 4.2, объем которого составляет около 1 страницы, было бы целесообразно объединить с предыдущим параграфом.

В параграфе 4.3. представлены результаты экспериментов с использованием нескольких широко известных antimикробных препаратов (стрептомицина, ампициллина, тетрациклина и хлорамфеникола). Учитывая, что в экспериментах использовали 4 зараженных штамма инфузорий и один контрольный незараженный штамм, а препараты применяли в нескольких концентрациях, трудоемкость этой части работы также очень велика. В параграфе 4.4. представлены результаты экспериментов с использованием antimикробных пептидов FLIP7. Автор показал высокую стабильность исследуемой симбиотической системы к действию антибиотиков и antimикробных пептидов и показал, что одним из факторов этой устойчивости может выступать формирование персистирующих форм бактерий.

После описания результатов традиционно следует раздел «Обсуждение» (12 с.). Эта глава подразделена на 10 параграфов и, по сути, выполняет не только функции собственно обсуждения, но и в определенной степени функции заключения, поскольку в большинстве параграфов содержится не только интерпретация полученных данных, но и краткое резюме по той или иной части работы.

На основании полученных результатов автор формулирует 5 выводов, которые полностью обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Каких-либо принципиальных замечаний после чтения работы не возникает. В целом работа вызывает большой интерес, и в связи с этим хотелось бы задать автору следующие дискуссионные и уточняющие вопросы.

1. Говоря о практической значимости работы, автор утверждает, что исследованную им симбиотическую систему можно использовать «...как модель для изучения тонких механизмов взаимодействия риккетсий с эукариотической клеткой». В какой степени, по мнению автора, данные, полученные на модели протистов, можно переносить на клетки сложных многоклеточных организмов, в том числе человека? Разработаны ли к настоящему времени модели для изучения риккетсий на основе клеток человека или хотя бы позвоночных?

2. В обзоре литературы существенное внимание автор уделяет описанию эндосимбионтов амёб и жгутиконосцев. В этих разделах, как и при описании эндосимбионтов инфузорий, описаны частные случаи симбиозов, однако, к сожалению, отсутствуют какие-либо элементы сравнительного анализа или обобщения. В связи с этим хочется получить ответ на следующий вопрос: симбиотические системы с участием амёб и жгутиконосцев чем-то отличаются от таковых с участием инфузорий? Если да, то какие специфические особенности характерны для симбиозов с участием инфузорий?

3. В разделе «Результаты» для меня осталось не до конца понятным, что представляют собой «лакуны» в макронуклеусе инфузорий, описываемые автором на светооптическом уровне в случае заражения инфузорий эндосимбионтами. Если лакуны – это зоны скопления бактерий, то почему их нуклеоид не окрашивается по Фельгену или DAPI? Лакуны на рис. 4 и 5 существенно (в разы) различаются по размерам, несмотря на одинаковый масштаб изображений. Насколько широко могут варьировать размеры лакун? На рис. 10 скопления видоспецифичной метки выявляются в зоне, отличной от лакуны, и, напротив, в зоне отсутствия окрашивания DAPI (то есть в лакуне) отсутствует как видоспецифичная, так и зубактериальная метка, то есть симбионтов в этой зоне нет. Хотелось бы, чтобы автор внес ясность в эти вопросы.

4. Описывая результаты экспериментов с использованием антимикробных соединений, автор отмечает, что эффект хлорамфеникола существенно различался для разных клонов, зараженных трихориккетсиями. С какими биологическими особенностями разных клонов инфузорий, по мнению автора, это может быть связано?

5. В разделе «Обсуждение» автор отмечает, что «... внутриядерное расположение оптимально для эндосимбионта с точки зрения возможности контроля над экспрессией генов хозяина». Описаны ли в литературе к настоящему времени какие-либо конкретные механизмы подобного контроля?

Также было бы интересно получить ответы на некоторые вопросы, касающиеся методической части работы.

1. Для трансмиссионной электронной микроскопии автор использовал два варианта фиксации клеток: в смеси 1,6% параформальдегида и 2,5% глутарового альдегида на фосфатном буфере, либо в 2,5% глутаровым альдегидом на какодилатном буфере (с. 50). Для каких целей помимо «классической» фиксации в 2,5%-ном глутаровом альдегиде использовали второй вариант фиксации? Почему сахарозу начинали добавлять в растворы только на этапе отмывки от фиксатора, но не добавляли в сами растворы ПФА и ГА?

2. Почему разрушение клеток инфузорий для последующего негативного контрастирования бактерий проводили в дистиллированной воде, а для последующей атомно-силовой микроскопии – в стерильной среде?

3. Проводили ли денатурацию препаратов во время постановки FISH (с. 53)? Если да, то при каких условиях (температура, состав буфера)?

4. Стоковый раствор хлорамфеникола готовили на этиловом спирте (с. 54). Проводили ли контрольные эксперименты с использованием аналогичного количества этилового спирта без хлорамфеникола?

Помимо этого можно сделать несколько замечаний редакционно-технического характера. При этом следует отметить, что в целом оформление работы аккуратное,

опечатки встречаются очень редко; очевидно, что автор уделил техническим моментам значительное внимание.

1. В разделе «Введение» (с. 7), раскрывая актуальность исследования симбиотических систем протистов, автор приводит ссылки на литературу, изданную до 2014 г. включительно, то есть десять лет назад. Учитывая, что тема работы действительно имеет высокую актуальность, следовало также упомянуть работы, вышедшие в последние годы.

2. При написании названий семейств и порядков курсив не используется, как сделано автором на с. 8). Напротив, родовые и видовые названия в некоторых местах работы не выделены курсивом (например, с. 12, с. 55).

3. Рисунки 1, 2, 3 слишком мелкие, некоторые надписи на них сложно прочесть. В подписи к рис. 3 отсутствует пояснение, что обозначают буквы А—F.

4. На с. 22 автор пишет: «Клетка инфузорий ... характеризуется рядом уникальных морфологических особенностей: стабильностью внутренней среды, высокой репродуктивной активностью, а также наличием различных крупных компартментов...». Стабильность внутренней среды и высокая репродуктивная активность не являются морфологическими особенностями.

5. В главе «Материал и методы» (раздел 3.6, с. 51) не указано, какая именно смола использовалась для заливки материала.

Еще раз хочу подчеркнуть, что все перечисленные выше вопросы и замечания имеют исключительно дискуссионный или редакционный характер и ни в коей мере не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования Т.И. Миронова.

С учетом всего вышесказанного полагаю, что содержание диссертации Миронова Тимофея Ивановича на тему: «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*» соответствует специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития клеточной биологии.

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук соискателем ученой степени мною не установлено.

Диссертация соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, установленным приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ.

Член диссертационного совета  
доктор биологических наук, доцент  
в.н.с. Института цитологии РАН

Боголюбова И.О.

29 января 2024 г.



Исполнитель  
Боголюбовой И.О.  
29.01.2024  
Канцелярия