

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Скалон Елизаветы Кирилловны тему: «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИРОДЫ ПЛАЗМОДИЯ ОРТОНЕКТИД (ORTHONECTIDA)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.17. Паразитология

Диссертационное исследование Е.К. Скалон выполнено на уникальной группе паразитических животных, положение которых на филогенетическом древе Metazoa до настоящего времени точно не определено и служит предметом дискуссий. Недаром видный отечественный зоолог академик В.В. Малахов включил ортонектид в свою широко известную книгу: "Загадочные группы морских беспозвоночных", изданную в 1990. Со времен выхода этой книги взгляды на ортонектид претерпели существенные изменения, но исключать этих животных из числа «загадочных» пока еще преждевременно. Действительно, даже такой принципиальный вопрос, как природа паразитической фазы жизненного цикла ортонектид – плазмодия – оставался до исследования диссертанта дискуссионным: то ли это самостоятельный паразитический организм, то ли гипертрофированная клетка животного-хозяина, в цитоплазме которой развиваются генеративные элементы. Использование современных технологий позволило Е.К. Скалон убедительно аргументировать первую точку зрения. Это важный вклад не только в познание ортонектид *per se*, но имеет и более широкое звучание в плане выяснения специфики морфофункциональных адаптаций многоклеточных при переходе к паразитизму. В случае ортонектид мы сталкиваемся с древним паразитизмом, который за время эволюции низвел многоклеточный организм до плазмодиального состояния (практически до протистного уровня), что представляет и общебиологический интерес.

Структура диссертации традиционна, она состоит из введения, обзор литературы, описания материала и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, благодарностей и списка литературы, насчитывающего 108 источников. Общий объем диссертации составляет 61 с. в русском и 58 с. в английском вариантах. Основные разделы диссертации освещены в 3 научных статьях, дающих полное представление о включенных в диссертацию материалах и сделанных на их основе выводах. Статьи опубликованы в рейтинговых научных журналах, индексируемых в WoS и SCOPUS и входящих в "Белый список" (уровни 1 и 2). В двух публикациях Е.К. Скалон стоит первым автором, что свидетельствует о ее первостепенном вкладе в исследование.

Во Введении Е.К. Скалон приводит краткую характеристику объекта исследования и убедительно аргументирует актуальность выбранного ею направления, то есть анализ природы плазмодия. Цели и задачи сформулированы четко, что в полной мере распространяется и на другие обязательные разделы вводной части диссертации. Обращает внимание наличие во Введении раздела "Методология", что не случайно, поскольку именно применение современных методов, включая иммуноцитохимию, омиксные технологии и биоинформатику, обеспечило результативность проведенного исследования. Личный вклад Е.К. Скалон в его выполнение сомнений не вызывает.

Интересен проведенный Е.К. Скалон обзор литературы по ортонектидам. Ввиду немногочисленности работ, посвященных этим животным, все они проанализированы диссертантом. Е.К. Скалон прослеживает изменение представлений об ортонектидах с момента их открытия во второй половине XIX века и до наших дней. Особое внимание уделено критическому анализу взглядов Е.Н. Козлова, который рассматривал плазмодий не как самостоятельный организм, а как видоизмененную клетку хозяина, в цитоплазме которой происходит развитие генеративных элементов, из которых формируются самцы и самки, выходящие затем во внешнюю среду. Таким образом, по Е.Н. Козлову ортонектид на паразитической фазе жизненного цикла следует считать внутриклеточными паразитами. Это положение оспаривается Е.К. Скалон в диссертации. В целом, знакомство с разделом дает ясное представление о современном уровне знаний относительно организации, филогении и жизненном цикле ортонектид.

Раздел "Материал и методы" позволяет убедиться в высокой квалификации диссертанта в методической части. Е.К. Скалон самостоятельно собран материал на Баренцевом море, что весьма трудоемко, учитывая чрезвычайно низкую зараженность ортонектидами хозяев – немертин. Морфологические исследования выполнены с использованием световой, конфокальной лазерной и электронной микроскопии, как сканирующей, так и трансмиссионной. Молекулярно-биологические работы заключались в подготовке библиотек для секвенирования РНК и биоинформатическом анализе транскриптомов. Отмечу, что получение транскриптома плазмодия ортонектид явилось нетривиальной задачей, поскольку потребовало его отделение от транскриптов хозяина, а затем выявление генов, которые демонстрируют значительную экспрессию у ортонектид из зараженного хозяина, но не экспрессируются у самцов и самок объекта исследования. Такое многообразие использованных методических подходов стало залогом успеха проведенного Е.К. Скалон диссертационного исследования.

Полученные результаты отчетливо подразделяются на морфологические и молекулярно-биологические, соответственно этому и проведена рубрикация описывающего их раздела диссертации. В морфологической части приводятся принципиально новые данные по структуре и ультраструктуре плазмодия. В том числе выявлены микроламеллярные выросты на поверхности плазмодия, что автор справедливо связывает с питанием паразита. Впервые четко показано наличие в плазмодии ядер и продемонстрировано их отличие как от ядер хозяина, так и от репродуктивных клеток и эмбрионов, локализующихся в цитоплазме плазмодия. Вызывает интерес обнаружение в цитоплазме плазмодия многочисленных везикул, разных по своей природе. Некоторые из них выделяются в межклеточное пространство и, по аналогии с внеклеточными везикулами паразитических протистов и гельминтов, могут играть роль во взаимодействиях паразита и хозяина, вплоть до модификации его поведения. По крайней мере, часть из обнаруженных в цитоплазме мультиламеллярных тел, как справедливо полагает диссертант, может служить источником материала для построения наружной мембраны плазмодия. Такая функция мультиламеллярных тел показана для трематод *Schistosoma* spp. – кровепаразитов человека, поверхность которых, как и у плазмодия, окружает комплекс из двух плазматических мембран.

Результатом проведенного Е.К. Скалон тонкого биоинформатического анализа стала дифференциация генов, экспрессирующихся только на стадии плазмодия и отличных как от генов, экспрессия которых выявляется у половых особей и у хозяина. Это совершенно новаторский результат, который пролил свет на молекулярные механизмы функционирования плазмодия. Проведенный диссертантом *in silico* анализ выявил плазмодий-специфичные белки, причем 35 из них оказались присущими только ортонектидам, что указывает на уникальность эволюции взаимоотношений этих паразитов с хозяевами. Кроме того, обнаружены белки, которые у других организмов ассоциированы с эндопаразитизмом. Это служит весомым подтверждением статуса плазмодия как фазы жизненного цикла ортонектид, а не видоизмененной клетки хозяина.

В Дискуссии Е.К. Скалон обсуждает все полученные ею материалы в контексте уже известных к настоящему времени по ортонектидам и некоторым другим группам паразитов и на этой основе предлагает оригинальную трактовку формирования плазмодия в организме хозяина. Совокупность морфологических и молекулярно-генетических данных (последние получены исключительно в ходе предпринятого диссертантом биоинформатического анализа) убедительно подтверждают наличие в жизненном цикле ортонектид паразитической фазы – плазмодия. Этот вывод закрывает дискуссию о природе плазмодия, развернувшуюся с момента появления гипотезы Козлова о плазмодии как о гипертрофированной клетке хозяина. Диссертант обсуждает и некоторые аспекты, которые невольно возникают при знакомстве с работой. Речь идет, в том числе, об удивительном конвергентном сходстве с рядом паразитических организмов далеко отстоящих от ортонектид в филогенетическом отношении. В первую очередь это Мухозоа, чрезвычайно измененные паразитизмом кишечнополостные (Cnidaria), для жизненного цикла которых также характерен многоядерный плазмодий, внутри которого формируются споры, стадия "клетка-в-клетке", окруженные двумя мембранами спороциста и споробласт. Справедливо и предположение автора о формировании второй мембраны как защиты от факторов иммунной защиты хозяина. Здесь напрашивается аналогия с трематодами – паразитами крови человека и животных, также окруженных двумя мембранами. Таким образом, приведенные в работе Е.К. Скалон материалы призываю к широкому обсуждению конвергентных путей становления адаптаций к паразитизму у представителей разных таксонов. В этом видится общебиологическое значение результатов рецензируемого исследования.

Краткое Заключение резюмирует основные итоги работы, а следующие за ним Выводы вполне обоснованы и написаны корректно. Серьезных замечаний у меня к работе нет. Хотелось бы только получить разъяснения по нескольким вопросам:

1. Известно ли что-либо о продолжительности жизни плазмодия в хозяине? Все время ли сохраняется в плазмодии пул репродуктивных клеток или обнаруживаются старые плазмодии, в которых содержатся только половое поколение на разных этапах формирования?

2. Можно ли по морфологическим критериям дифференцировать прилежащие друг к другу делящиеся репродуктивные клетки от эмбриона на стадии двух бластомеров?

3. На некоторых электроннограммах (например, на рис. 10А, В; 12В) обозначенные как свободные рибосомы структуры напоминают гранулы гликогена. Как Вы их дифференцировали и встречались ли в цитоплазме плазмодия характерные розетки гликогена?

Диссертация написана хорошим языком, как в русской, так и в английской версиях, и прекрасно иллюстрирована высококачественными микрофотографиями и схемами.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Скалон Елизаветы Кирилловны тему: «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИРОДЫ ПЛАЗМОДИЯ ОРТОНЕКТИД (ORTHONECTIDA)» соответствует специальности 1.5.17. Паразитология. Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития отрасли знаний Паразитология.

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, профессор,
главный научный сотрудник СПбГУ



Галактионов Кирилл Владимирович

28 июня 2024 г.