

## 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

Диссертация Тимофея Ивановича Миронова посвящена характеристике новой модельной симбиотической системы, образованной инфузорией из рода *Paramecium* и бактерией, принадлежащей к семейству Rickettsiaceae. Симбиотические системы, в которых одноклеточные эукариоты выступают в качестве хозяев для других микроорганизмов, всегда привлекали внимание исследователей, а в настоящее время интерес к ним существенно усилился, в основном, в связи с усовершенствованием аналитических подходов, которые позволяют проверить старые гипотезы, открывать новые ассоциации и исследовать все более тонкие аспекты взаимодействий новыми морфологическими, молекулярными методами, методами биоинформатики и пр. Всплеск и разносторонность интереса к эндосимбионтам протистов (= одноклеточным эукариотам) и различным аспектам эндосимбиоза отражена в том факте, что на последнем Европейском конгрессе по протистологии этой теме, было отведено целых 3 сессии. Такой интерес совершенно оправдан по следующим причинам. (1) Исследования современных ассоциаций могут приблизить нас к разгадке происхождения эукариотической клетки, которая, по современному представлению, обязана своим происхождением эндосимбиозу. Ассоциации протистов с эндосимбионтами — простейшие примеры и модели «холобионта», причем более доступные для изучения и анализа, чем сложные системы высших организмов с многочисленными «метапопуляциями» симбионтов. Эволюционная биология последних лет предполагает, что именно холобионты — «над-организмы», обладающие собственным «хологеномом», являются объектами эволюции. (2) Симбиотические системы, подобные описанной в диссертации, играют существенную роль в биоценозах, особенно в освоении протистами новых экстремальных ниш, и изучение их биоразнообразия — важный аспект экологии. (3) Протисты — идеальные модельные системы для изучения внутриклеточной персистенции паразитов (и прочих эндосимбиотических организмов), и их первазивного воздействия на функционирование различных клеточных систем и реакций: внутриклеточный транспорт, апоптоз, экзоцитоз, эндоцитоз, ауто- и ксенофагию, и пр. и пр. Исследования на модельных системах с участием протистов, примером которых является представленная к защите диссертационная работа, крайне важны для цитологии, клеточной биологии и биомедицины, в частности, при изучении свойства патогенных микроорганизмов и для поиска методов терапии инфекций. Устойчивость патогенных риккетсий к антибиотикам — вообще едва ли не самая актуальная проблема в медицине инфекционных болезней. И с этой точки зрения, найденная диссертантом новая риккетсиеподобная бактерия, развивающаяся в парамециях, и исследования, направленные в значительной части на изучение устойчивости системы к воздействию антимикробных агентов, более чем актуальны. Кроме того, внутриядерная локализация симбионтов, характерная, помимо вирусов и бактерий, также для некоторых эукариотических паразитов, например, для отдельных микроспоридий и микроспоридии-подобных розелломикот — малопонятный феномен. Исследования механизмов энергообеспечения внутриядерных

симбионтов, их транспорта в ядро и из ядра, а также способов воздействия на экспрессию генов ждут удобных экспериментальных моделей, подобных описываемой в диссертации Т.И. Миронова.

Все упомянутые выше аспекты изучения феномена эндосимбиоза в той или иной степени затронуты в диссертации Тимофеем Ивановичем. Таким образом, актуальность выбранной темы и значимость выполненных Т.И. Мироновым исследований не вызывает сомнений.

Диссертация в целом хорошо написана, логично построена и легко читается. Небольшие замеченные мною шероховатости стиля не снижают хорошего впечатления от текста. Следует отметить, что английская версия также качественно написана.

Диссертация Миронова Тимофея Ивановича изложена на 127 страницах текста; примерно столько же занимает английская версия. Работа содержит 23 рисунка и 6 таблиц. Список литературы чрезвычайно обширен и включает 349 источников.

Диссертация имеет классическую рубрикацию и начинается с «Введения», в котором подробно обоснованы актуальность работы, ее теоретическая и практическая значимость и научная новизна. Автором четко сформулированы основные положения, выносимые на защиту, и приведен список публикаций автора, который соответствует уровню требований, предъявляемых к кандидатской диссертации. Здесь отмечу, что доказательством высокого качества и мирового уровня выполненных исследований служит тот факт, что три основные статьи по теме диссертации опубликованы в журналах, относящихся к первому квартилю. Во «Введении» также описан личный вклад автора в выполнение работы. Из этого описания понятно, что подавляющую часть работы автор выполнил самостоятельно. В тексте диссертации автор опирается только на собственные исследования. Соавторство с другими специалистами в двух публикациях вызвано тем, что в одной из статей, помимо указанной симбиотической системы, описаны еще две, а в другой статье соавтором были выполнены работы по получению комплекса антимикробных пептидов, использованных Т. И. Мироновым в своих экспериментах. «Цели и задачи работы» хорошо сформулированы и адекватны выполненным исследованиям. Обзор литературы обширен и хорошо структурирован. В разделе «Материал и методики», описаны подходы, использованные в работе — как классические, так и самые современные. В следующем разделе «Результаты» описаны результаты проведенных исследований, и далее идет глава «Обсуждение», посвященная обсуждению и анализу результатов. Работа завершается разделом «Выводы», после которых следуют традиционные разделы «Благодарности» и «Список литературы». Общая структура работы возражения не вызывает.

В качестве основной цели работы (стр. 7) автор ставит описание новой симбиотической системы и исследование ее чувствительности к различным антибиотикам и комплексу антибактериальных пептидов FLIP7, полученных из личинок мясной мухи. Сразу отмечу, что цель работы автором была достигнута, а полученные им данные свидетельствуют о высокой стабильности описанной симбиотической системы.

Глава «Обзор литературы» состоит из 6 разделов и освещает широкий круг вопросов: в ней приводится общее представление о симбиозах и их классификации, вкратце изложена история исследования симбиозов, приводится общая характеристика симбионтов протистов и отдельно рассмотрены симбионты амёб и жгутиконосцев и, наконец, подробно

описаны цитоплазматические и ядерные эндосимбионты инфузорий. Этот обзор произвел на меня крайне благоприятное впечатление. Он отражает глубокий интерес автора к проблеме симбиоза и истории ее изучения, содержит тщательный анализ литературных данных, включая даже весьма экзотические и труднодоступные источники, и представляет собой исчерпывающую сводку информации по теме диссертации. Подробное цитирование, а также воспроизведение оригинальных иллюстраций из старых работ не оставляет сомнений в том, что автор работал с оригинальными источниками. Поистине огромный список процитированной литературы отражает попытку автора охватить в своем обзоре все аспекты проблемы симбиотических отношений между протистами и другими микроорганизмами.

Раздел «Материал и методики» содержит всю необходимую информацию о местах изоляции инфузорий, примененных в ходе исследования методах, и проведенных экспериментах. В работе подробно описаны все использованные методы исследования: прижизненные наблюдения с помощью дифференциально-интерференционного контраста, гистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия на тонких срезах и на негативно окрашенных препаратах, подходы с применением таких молекулярных методов, как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и филогенетический анализ, а также серия биохимических методов (очистка методом центрифугирования, лиофилизация, жидкостная хроматография).

Автором получены интересные и значимые для науки результаты. В первую очередь, с помощью морфологических и молекулярных методов описана новый (кандидатный) вид риккетсиноподобных бактерий. Диссертант показал, что эта подвижная бактерия, обитающая в макронуклеусе инфузории, обладает жгутиками, что не характерно для форм, относящихся к семейству Rickettsiaceae. Таким образом, диагноз группы должен быть пересмотрен. Более того, данная находка, заставляет по-новому взглянуть на пути эволюции порядка Rickettsiales: предковая форма риккетсий, по-видимому, обладала жгутиками, и в этом случае изучаемый эндосимбионт - реликт, родственник этому предку. С другой стороны, нельзя исключить вторичное появление жгутика у некоторых представителей Rickettsiaceae в результате вертикального переноса генов. Данная часть работы, на мой взгляд, представляет собой фундаментальный вклад в филогению и таксономию альфапротеобактерий.

Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с видоспецифичным олигонуклеотидным зондом автор доказал принадлежность внутриядерных симбионтов трех клонов *P. multimicronucleatum*, к одному и тому же виду. По поводу этой, в целом великолепно выполненной, части работы у меня есть вопрос: на рис.13 хорошо заметно, что клетки разных клонов инфузорий, зараженных *Trichorickettsia* (рис. 13), очень сильно различаются по своей форме и размерам. Интересно, чем можно было бы объяснить такие различия?

Значительная часть работы посвящена изучению устойчивости системы *Paramecium multimicronucleatum* - *Ca. Trichorickettsia mobilis* к серии антибактериальных агентов. Исследования показали, что данная симбиотическая система проявляет устойчивость как к действию антибиотиков, традиционно используемых для получения апосимбиотических клонов инфузорий, так и антибиотиков, применяемых при лечении

риккетсиозов человека. Изучаемая бактерия — ближайший родственник возбудителей тяжелых заболеваний человека, и данную модель, в которой хозяином служит инфузория, легко культивируемая *in vitro*, можно использовать для исследования взаимодействия риккетсий с эукариотической клеткой, в частности, для изучения механизма возникновения рекуррентных заболеваний.

С целью нащупать уязвимые места в симбиотической системе в своей работе автор, помимо использования антибиотиков, прибегает к нестандартному подходу, а именно — применению в ряде экспериментов комплекса антимикробных пептидов FLIP7, полученных из иммунизированных личинок мясной мухи. Т. И. Миронову удалось показать, что даже этот антимикробный комплекс, к которому у многих бактерий не вырабатывается резистентность, не способен полностью освободить инфузорию от трихориккетсий.

В разделе «Обсуждение» автор приводит диагноз кандидатного вида бактерий и подвергает всестороннему анализу полученные данные. Принципиальных возражений этот раздел не вызывает, однако все же остается неясным, чем может объясняться разница в чувствительности к тетрациклину у видов *Paramecium primaurelia* и *P. pentaurelia*, зараженных *Ca. Megaira polyxenophila* (данные работы Pasqualetti et al., 2020) и *P. multimicronucleatum*, несущей в своем макронуклеусе *Ca. Trichorickettsia mobilis*.

Описанная в диссертации модель ставит множество вопросов и открывает дальнейшие перспективы исследований, что характерно для качественной научной работы. Так, интересный и принципиальный вопрос о наличии в геномах риккетсиеподобных бактерий генов, кодирующих белки бактериального жгутика, их составе и распространённости может быть решен только с помощью сравнительной геномики, требующей полногеномного секвенирования *Ca. Trichorickettsia mobilis* и других представителей сем. Rickettsiaceae, особенно риккетсий из группы возбудителей пятнистой лихорадки, также способных развиваться в ядре. Кроме того, чрезвычайно интересным и перспективным направлением могло бы стать изучение феномена индукции ауто- и ксенофагии антибиотиками. В этой связи, желательно было бы подтвердить утверждение о том, что обнаруженные на ультратонких срезах после обработки антибиотиками и содержащие трихориккетсий вакуоли действительно являются аутофагосомами. Это можно сделать с помощью специфичных иммуноцитохимических маркеров аутофагосом. Хотелось также пожелать автору осуществить поиск инфекционных форм трихориккетсий и выяснить механизм заражения инфузорий. Исследование обнаруженных в бактериях фагов и их роли в устойчивости и жизнеспособности симбиотической системы - еще одно интересное направление дальнейшей работы.

Работа хорошо оформлена и прекрасно проиллюстрирована. Особенно хочется отметить качество изображений, демонстрирующих результаты экспериментов с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ*, а также хорошее качество электронной микроскопии.

К погрешностям оформления следует отнести ряд опечаток, так, на титульном листе английской версии в слове «ciliate» присутствует удвоенная «l». Также в Материалах и Методах не указано, в какую именно смолу заливались инфузории для электроно-

микроскопического анализ (спур, аралдит, дюркопан, эпон, или их комбинации). Это важная информация, и хотелось бы услышать пояснение, хотя бы на защите.

Основные полученные результаты сформулированы четко и корректно, выводы соответствуют результатам и задачам работы. Цель работы автором достигнута, поставленные при ее выполнении задачи – успешно решены. Таким образом, я полагаю, что диссертация Миронова Тимофея Ивановича на тему: «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Миронов Тимофей Иванович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета

Доктор биологических наук  
Биолог-исследователь/ электронный микроскопист  
Общеинститутский центр пользования современными методами микроскопии  
Институт болезней слуха и других коммуникационных расстройств  
Национальный институт здоровья, Бетесда, Мэриленд, США

PhD, Dr. Sci  
Research Biologist/ Electron Microscopist, contractor  
Advanced Microscopy Core  
National Institute of Deafness and other Communication Disorders,  
National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA



Соколова Юлия Яновна

11.11.2023