

**Министерство науки и высшего  
образования Российской Федерации**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки

**Оренбургский федеральный  
исследовательский центр Уральского  
отделения Российской академии наук  
(ОФИЦ УрО РАН)**

Набережная ул., д. 29, Оренбург, 460014, а/я 83  
тел.: (3532) 77-54-17, тел/факс (3532) 77-44-63

E-mail: [ofrc@list.ru](mailto:ofrc@list.ru), <http://orennc.ru>  
ОКПО 13658273 ОГРН 1035608451042  
ИНН/КПП 5612036362/561001001

25.01.2024 № 01-01-01-14/21

На № от

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор  
государственного  
учреждения науки  
федерального  
центра Уральского  
Российской академии наук

Федерального  
бюджетного  
Оренбургского  
исследовательского  
отделения  
РАН

д.м.н., член-корр. РАН



С.В. Черкасов

«25» января 2024 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертацию **Миронова Тимофея Ивановича**

**«Новая модельная симбиотическая система инфузория**

***Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*»,**

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология в совет по  
защите диссертации в Санкт-Петербургском государственном университете

**Актуальность избранной темы**

Симбиоз является широко распространенным явлением, которое, как сейчас признано, лежит в основе формирования эукариотической клетки, и во многом определяет разнообразие эукариотических организмов. Хотя изучение симбиоза насчитывает уже почти полтора века, проведенные за эти годы исследования открыли множество симбиотических систем с чрезвычайно многообразным характером взаимоотношений между партнерами (от мутуалистического до антагонистического), разной степенью их влияния друг на друга – от облигатного до факультативного, разным пространственным расположением партнеров – от интимного внутриклеточного до дистантного. Установлено, что характер взаимодействия партнеров в симбиозах может меняться на протяжении жизненного цикла организмов или с изменением условий их существования.

Интенсивные исследования симбиотических систем и всеобщее признание их важной роли в экологии и эволюции привели к развитию концепции холобионта. Хорошей основой для дальнейшей разработки концепции холобионта могут послужить исследования симбиотических систем, в которых в качестве хозяина выступает одноклеточный эукариот-протист, а взаимодействие между партнерами происходит на клеточном уровне организации. Кроме того, при исследовании таких моделей важным фактором является ее стабильность, т.е. устойчивость к действию различных внешних факторов, в том числе антибиотиков и антимикробных пептидных комплексов. Особенно важное значение такие модели имеют для исследования взаимодействий эукариот с патогенными микроорганизмами, с целью поиска и оценки эффективности антимикробных препаратов. Таким образом, тема диссертационной работы Миронова Тимофея Ивановича, направленной на создание и изучение новой модельной симбиотической системы, образованной инфузорией *Paramecium multimicronucleatum* и подвижной внутриядерной бактерией *Ca. Trichorickettsia mobilis*, принадлежащей семейству Rickettsiaceae, а также исследование стабильности этой системы при воздействии антибиотиками и антимикробными пептидами, является своевременной и актуальной.

#### **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна диссертационного исследования заключается прежде всего в том, что в работе впервые с помощью морфологических и молекулярных методов исследования описан новый вид внутриядерных симбиотических бактерий, обитающих в макронуклеусе инфузории *Paramecium multimicronucleatum*/*Ca. Trichorickettsia mobilis*. Установлена принадлежность этого вида к семейству Rickettsiaceae (порядок Rickettsiales). Впервые у представителя семейства Rickettsiaceae продемонстрировано наличие жгутиков. Впервые установлено, что симбиотическая система *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis* обладает высокой устойчивостью к действию ряда антибиотиков, в том числе используемых для лечения риккетсиозов у человека. Впервые показана высокая устойчивость симбиотической системы *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis* к действию комплекса антимикробных пептидов FLIP7 и его отдельных фракций. Впервые предложено рассматривать симбиотическую систему *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis* в качестве модели для дальнейшего развития концепции холобионта

### **Значимость для развития соответствующей отрасли науки результатов, полученных автором диссертации**

Выявленные морфологические особенности вида *Ca. Trichorickettsia mobilis* (наличие функционирующих жгутиков) требуют пересмотра диагнозов не только семейства *Rickettsiaceae*, но и всего порядка *Rickettsiales*. Полученные новые данные позволят уточнить возможные пути эволюции бактерий этого порядка. Полученные данные, свидетельствующие о высокой стабильности симбиотической системы *P. multimicronucleatum/Ca. T. mobilis*, позволяют рассматривать данную симбиотическую систему в качестве удобной модели для дальнейшей разработки концепции холобионта.

Поскольку работа с патогенными микроорганизмами ограничена существенными техническими и организационными требованиями, дальнейшие исследования предложенной симбиотической системы имеют важное практическое значение, так как близкое родство *Ca. T. mobilis* и патогенных для человека риккетсий дает возможность использовать данную симбиотическую систему как модель для изучения тонких механизмов взаимодействия риккетсий с эукариотической клеткой.

Результаты работы могут быть использованы в обучении студентов биологических специальностей высших учебных заведений по клеточной биологии, молекулярной биологии, симбиозу, и экологии микроорганизмов.

### **Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научные положения, выносимые на защиту, сформулированные выводы и предлагаемые рекомендации базируются на результатах диссертационного исследования. Все этапы экспериментальной работы изложены в тексте диссертации доступно и в полной мере. Таким образом, положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и соответствуют поставленной цели, задачам исследования, содержанию представленной работы.

### **Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикаций в рецензируемых журналах**

Исследования проведены с применением современных разносторонних методологических подходов и аппаратуры надлежащего технического уровня, в достаточном количестве повторов, в связи с чем достоверность результатов не вызывает сомнений.

Результаты работы обсуждались на 4 конференциях, по теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в

рецензируемых журналах первого квартиля SJR, индексируемых в системах Web of Science и/или Scopus, и 8 публикаций в материалах международных и всероссийских конференций.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты, полученные в рамках данной диссертационной работы, и описанные в ней методы могут быть интегрированы в учебный процесс высших учебных заведений; могут быть использованы в курсах лекций по клеточной биологии, симбиозу и экологии микроорганизмов для студентов биологических специальностей высших учебных заведений. Предложенная стабильная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis* может использоваться в качестве модели для поиска и оценки новых антимикробных препаратов, действующих на бактерии семейства *Rickettsiaceae*, которое содержит и патогенные для человека и животных виды.

### **Соответствие специальности**

Диссертационная работа Миронова Тимофея Ивановича «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*» соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, а именно:

п. 3. Организация ядра. Ядрышко, ядерные тельца, ядерная мембрана, ядерные поры.

п. 19. Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий. Создание клеточных моделей различных заболеваний, в том числе наследственных.

п. 20. Системный анализ взаимоотношений клеток в составе тканей и органов. Внутриклеточный симбиоз/паразитизм.

### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Планирование научной работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем, кандидатом биологических наук, доцентом Сабанеевой Е. В. Секвенирование и филогенетический анализ соискатель проводил совместно с коллегами из Университета Пизы (Италия) (Vannini, Mironov et al., 2014).

Получение комплекса антимикробных пептидов FLIP7 и его хроматографических фракций выполнил Андрей Юрьевич Яковлев (лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых СПбГУ). Автор лично провел анализ научной литературы, выполнил экспериментальную часть исследований, интерпретировал полученные результаты. Написание и оформление рукописи диссертации также осуществлялось соискателем лично. Результаты работы обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

### **Содержание и оформление диссертационной работы, общая оценка диссертации**

Диссертация в целом написана в соответствии с ГОСТ 7.0.11-2011, объём диссертации составляет 127 страниц и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, использованных в работе, экспериментальную часть, полученные результаты и их обсуждение, выводы и список литературы (349 источников, из них-336 иностранных). Полученные результаты иллюстрированы 6 таблицами и 23 рисунками.

Во введении отражена актуальность темы диссертационного исследования, сформулированы цель работы, задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, отмечена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлена информация об апробации результатов исследования и личный вклад автора диссертации.

В обзоре литературы (глава 2) проанализированы научные источники информации по теме диссертации; освещена история исследования симбиозов; рассмотрены эндосимбионты протистов; указаны современные направления исследований симбиозов между протистами и другими микроорганизмами.

В 3 главе представлены объекты исследования, подробно и в полном объеме описаны методология и методы исследования, поэтапно расписан ход собственных исследований.

В 4 главе представлены собственные результаты исследований. Автор дает общую характеристику симбиотической системы *Paramecium multimicronucleatum*/Ca. *Trichorickettsia mobilis* и доказывает принадлежность макронуклеарных эндосимбионтов из клонов *P. multimicronucleatum* Busnau, Kp154-4 и AB9-4 к виду *Ca. Trichorickettsia mobilis*; подробно разбирает влияние различных антимикробных препаратов на симбиотическую систему *Paramecium multimicronucleatum*/Ca. *Trichorickettsia mobilis*.

5 глава является прямым логическим продолжением предыдущей главы. Автор обсуждает внутриядерную локализацию подвижных

эндосимбионтов инфузории *P. multimicronucleatum*; наличие жгутиков у бактерий порядка *Rickettsiales*; филогенетическое положение и таксономическую принадлежность подвижных внутриядерных эндосимбионтов; встречаемость вида *Ca. Trichorickettsia mobilis*; значение исследований группы «немодельных *Rickettsiales*»; чувствительность симбиотической системы *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis* к действию антибиотиков; выход внутриядерных бактерий в цитоплазму клетки-хозяина; изменение морфологии и ультраструктуры бактериальных клеток в результате обработки ампициллином и хлорамфениколом и природу вакуолей, содержащих эндосимбионтов, в клетках инфузорий, обработанных ампициллином; действие комплекса антимикробных пептидов FLIP-7 на стабильность симбиотической системы *P. multimicronucleatum*/*Ca. T. mobilis*; проводит анализ полученных данных и их сопоставление с литературными источниками отечественных и зарубежных авторов.

Выводы научно обоснованы, соответствуют поставленной цели, задачам исследования и в полной мере отражают результаты собственных исследований автора.

#### **Замечания по сути и оформлению диссертации:**

Несмотря на общее положительное впечатление от диссертационного исследования следует отметить ряд замечаний, которые в основном касаются оформления работы:

1. В работе встречаются опечатки, в том числе в латинских названиях микроорганизмов (например на с. 13, строка 17 сверху: «*aphidiclola*» вместо «*aphidicola*», не всегда используется курсив для латинских названий таксонов (например на с. 12, строка 14 сверху: *Holospora*).

2. Оформление библиографического списка использованной литературы не полностью соответствует актуальному ГОСТ Р 7.0.100-2018 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления».

3. В диссертации встречаются десятичные дроби, например на с. 24, где целая часть отделена от дробной точкой, хотя в русскоязычной литературе для этого принято использовать запятую.

4. В тексте диссертации научные названия, особенно в ранге семейства, порядка или класса в ряде случаев не обозначены курсивом. Хотя, в соответствии с главой 4, частью А Международного кодекса номенклатуры прокариот [Parker C.T., Tindall B.J., Garrity G.M. (Editors) International Code of Nomenclature of Prokaryotes (2008 Revision) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2019. – Vol. 69. – Issue 1A. – P.

S1–S111. DOI 10.1099/ijsem.0.000778] научные названия таксонов в тексте желательно обозначать другим шрифтом, например курсивом, или каким-либо другим способом, чтобы отличать их от остального текста.

5. В литературном обзоре встретилась некорректная интерпретация цитируемого источника. В частности, на с. 21 автор написал, что «*Chlamydia pneumoniae* является возбудителем 10% всех пневмоний, а также причиной большого количества хронических заболеваний, таких как астма и сердечно-сосудистые заболевания (Horn, Wagner, 2004)». Однако, если в отношении этиологии пневмонии соискатель совершенно прав, то и бронхиальную астму, и большинство сердечно-сосудистых заболеваний современная медицина рассматривает как полиэтиологические болезни, в развитии которых микроорганизмы могут принимать участие, но вовсе не являются единственной причиной большинства из них. И действительно, в цитируемом источнике написано следующее: «*Chlamydophila* (formerly classified as *Chlamydia*) *pneumoniae* is responsible for about 10% of community-acquired pneumonia and has been associated with a number of chronic diseases like asthma and cardiovascular disease (Mahoney et al. 2003).», что переводится на русский как: «*Chlamydophila* (ранее классифицировавшаяся как *Chlamydia*) *pneumoniae* является причиной около 10% внебольничных пневмоний и связана с рядом хронических заболеваний, таких как астма и сердечно-сосудистые заболевания (Mahoney et al. 2003).»

6. В клетках *Paramecium multimicronucleatum*, обработанных ампициллином, выявлена трансформация подвижных внутриядерных укороченных палочковидных бактерий в филаметозные и овальные формы, которые соискатель называет персистирующими формами на основании ряда ультраструктурных особенностей, сходных со сферопластами, образующимися другими представителями порядка Rickettsiales. Подчеркивая потенциальную возможность такого явления, следует отметить, что представленных данных недостаточно, чтобы уверенно говорить о том, что наблюдаемые измененные формы *Ca. Trichorickettsia mobilis* являются сферопластами или персистирующими формами, а сделанный на основе данного наблюдения вывод требует более надежных доказательств.

#### **Вопросы, возникшие в ходе ознакомления с диссертацией:**

1. В разделе 4.1.5 на с. 68 соискатель описывает безуспешные результаты заражения других клонов *Paramecium multimicronucleatum* бактериальным эндосимбионтом *Ca. Trichorickettsia mobilis*. С чем может быть связана устойчивость клонов инфузорий к заражению? Возможно ли заражение данным бактериальным эндосимбионтом естественным путем,

например при сокультивировании зараженного и незараженного клонов инфузорий или при их конъюгации?

2. Методом секвенирования ДНК получены данные по последовательности гена 16S рРНК для одного штамма бактериального эндосимбионта вида *Ca. Trichorickettsia mobilis*, которые показали его филогенетическое положение среди других представителей семейства *Rickettsiaceae*. Принадлежность других штаммов, обнаруженных у других клонов *Paramecium multimicronucleatum*, к этому виду показана методом FISH, который однако является лишь вспомогательным для сравнения штаммов бактерий и оценки их идентичности. Каким образом можно надежно доказать или опровергнуть принадлежность других штаммов к виду *Ca. Trichorickettsia mobilis*, а также оценить их идентичность, и планирует ли соискатель такое исследование?

3. Какие причины могут определять устойчивость исследуемого штамма *Ca. Trichorickettsia mobilis* в клетках хозяина к антибиотикам и антимикробным пептидам? Может ли это определяться снижением доступности антибиотика для бактерий, локализованных в ядре инфузорий? Известны ли подходы к оценке устойчивости к антибиотикам на культуре бактерий-эндосимбионтов, выделенных из клеток инфузорий? Как в этом случае можно оценить жизнеспособность бактерий, подвергнутых действию антибиотиков и антимикробных пептидов?

Следует отметить, что высказанные замечания и вопросы не снижают положительную оценку диссертации, и не подвергают сомнению научную ценность, оригинальность, новизну, теоретическую и практическую значимость диссертационного исследования Т.И. Миронова.

### **Заключение**

Диссертационная работа Миронова Тимофея Ивановича «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по поиску и характеристике новой модельной симбиотической системы, образованной инфузорией *Paramecium multimicronucleatum* и внутриядерной бактерией семейства *Rickettsiaceae*, что имеет существенное значение для клеточной биологии.

Таким образом, диссертационная работа Миронова Тимофея Ивановича «Новая модельная симбиотическая система инфузория



*Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*», соответствует требованиям пп.9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Миронов Т.И. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Отзыв на диссертационную работу Миронова Тимофея Ивановича «Новая модельная симбиотическая система инфузория *Paramecium multimicronucleatum* / бактерия *Ca. Trichorickettsia mobilis*» обсужден и одобрен на заседании ученого Совета Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (протокол заседания №1 от 25 января 2024 года).

Татьяна Николаевна Яценко-Степанова

Доктор биологических наук (специальность 03.02.03 - Микробиология и 03.02.08 – Экология (биология)), доцент, ведущий научный сотрудник группы альгологии Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11

тел. (3532) 77-54-17, e-mail: [yacenkostn@gmail.com](mailto:yacenkostn@gmail.com)

Андрей Олегович Плотников

Кандидат медицинских наук (специальность 03.02.03 – Микробиология), доцент, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11

тел. (3532) 77-54-17, e-mail: [protoz@mail.ru](mailto:protoz@mail.ru)

Личную подпись д.б.н., доц. Яценко-Степановой Т.Н. и к.м.н., доц. Плотникова А.О. заверяю.

Начальник отдела кадров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук



И.В. Турленко