

О Т З Ы В

официального оппонента на докторскую диссертацию Дубовского Ивана Михайловича "ЭВОЛЮЦИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЩИННОЙ ОГНЕВКИ *GALLERIA MELLONELLA* (L.) К ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ БАКТЕРИЯМ И ГРИБАМ", защищаемую по специальности 03.02.05 – энтомология

Диссертационная работа И. М. Дубовского представляет собой цельное, отлично спланированное и блестяще выполненное экспериментально-теоретическое исследование, в котором его автор использовал самые современные методические подходы для анализа тонких взаимоотношений в паразито-хозяйных системах, формируемых модельным видом насекомых, вощинной огневкой, и его патогенами — бактериями и грибами. Актуальность проблематики диссертации сомнений не вызывает. Ее экспериментальная часть, составляющая основу работы, выполнена в рамках только недавно сформировавшегося направления — анализа динамики адаптаций паразита и контрадаптаций хозяина и *vice versa* в лабораторных (ко)эволюционных экспериментах. Работы такого рода проводятся на ряде важнейших в медицинском отношении паразитах — шистосомах, трипаносомах и др. и дали много нового для понимания механизмов формирования резистентности и вирулентности. Речь идет о фиксации микроэволюционных событий, выяснении их скорости и направленности в конкретных системах паразит-хозяин.

Использование подобного подхода для анализа насекомых и их патогенов оригинально, а его перспективность наглядно демонстрируют полученные диссертантом принципиально новые материалы. Удачен и выбор модельных паразито-хозяйных систем. Вощинная огневка переведена в лабораторную культуру, для нее, в том числе и трудами диссертанта, достаточно хорошо изучена организация иммунной, антиоксидантной и детоксицирующей систем. Патогены — бактерии *Bacillus thuringiensis* (БТ) *ssp. galleriae* и грибы *Beauveria bassiana* — входят в число обычных паразитов насекомых с широкой специфичностью, а по факторам их вирулентности имеются существенные наработки. Таким образом, наличествует базис для перехода на новую ступень анализа, то есть выяснение характера микроэволюционных событий в системе паразит-хозяин, в ходе которых формируется резистентность хозяев по отношению к факторам вирулентности паразитов. Здесь видится высокая практическая значимость исследований, поскольку следствием таких процессов является и выработка устойчивости насекомых-вредителей к воздействию биопрепаратов. Результаты проведенных И. М. Дубовским исследований

найдут свое применение при разработке нового поколения биологических средств борьбы с насекомыми-вредителями сельского и лесного хозяйств.

Об успехе диссертанта на этом поприще свидетельствует, в том числе, полученный им патент РФ.

Диссертация построена по классической схеме — введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, заключение и выводы. Подобный способ изложения себя вполне оправдывает, поскольку работа зиждется на данных многочисленных экспериментов, требующих пошагового описания хода их выполнения, использованных при этом методик и способов анализа полученных в результате их проведения материалов. Знакомство с обзором литературы убеждает как в высокой компетентности диссертанта, так и в полном владении проблемой, на решение которой нацелена диссертация. Приводится подробное описание факторов вирулентности патогенов и систем защиты насекомых, с которыми они сталкиваются, как структурных (покровы, кишечник), так молекулярных, особенности клеточного и гуморального компонентов иммунитета, антиоксидантная и детоксицирующая системы. При этом диссертант уделяет особое внимание неизученным или слабоизученным аспектам, логично подводя к обоснованию выбранного направления собственных исследований.

В приведенном, очень грамотном, обзоре все же, на мой взгляд, не хватает более подробного описания особенностей коэволюции в системах паразит-хозяин, анализа исследований, которые в этом направлении предпринимались, и заключений, которые были сделаны на их основе (это и принцип Красной Королевы, и отбор против обычного генотипа, и оценка скоростей коэволюции в экспериментальных системах паразит-хозяин и т.п.). Эти вопросы до некоторой степени затрагиваются во введении, заключении к обзору литературы и к ним диссертант обращается в общем заключении. Однако наличие в обзоре литературы специального "эволюционного" раздела было бы логично в работе, первым словом в названии которой стоит "эволюция", и полезно для обсуждения полученных диссертантом материалов.

В главе, посвященной описанию материалов и методов, диссертант четко обосновывает выбор модельных систем и методик проведения многочисленных экспериментов. Хочется отметить оригинальный подход, который, собственно, и позволил получить столь значимые результаты. Это селекция в лабораторных условиях огневок с повышенной устойчивостью к тестируемым энтомопатогенам и сопоставление морфо-физиологических параметров секционированных и контрольных групп. Используются самые современные методики, включая ПЦР в реальном времени, секвенирование

нового поколения (Illumina), подавление экспрессии гена-мишени при помощи микроРНК, фотометрия, флуориметрия и др. Они соответствуют мировому уровню и не оставляют сомнений в валидности полученных при их использовании материалов. Все полученные в ходе выполнения экспериментов результаты подвергнуты корректной статистической и/или биоинформатической обработке.

Основная, результативная часть работы изложена в трех главах, в которых последовательно рассматриваются механизмы формирования устойчивости вошинной огневки к БТ и грибам *B. bassiana*. В ходе экспериментальной селекции удалось выработать линии насекомого-хозяина, которые обладали существенно большей резистентностью к соответствующим патогенам, чем контрольные животные. Успех этого селекционного эксперимента позволил подойти решению основных задач диссертационного исследования, то есть к оценке механизмов резистентности к конкретному патогену. Особо хочется отметить высокую степень доказательности полученных диссертантом результатов. Так диссертант не довольствовался констатацией повышения экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз (IMPI), антимикробного белка гловерина и глутатиона пероксидазы (GPx) при воздействии патогенов на огневок устойчивой линии по сравнению с восприимчивой. Им так же был использован и метод избирательного подавления экспрессии соответствующих генов при помощи малых молекул РНК, каковое воздействие привело к существенной потере устойчивости. В результате такой проверки роль тестируемых соединений в защитных реакциях насекомого выглядит совершенно бесспорной.

В многочисленных экспериментах, выполненных диссертантом, анализировались проявления факторов резистентности у восприимчивых и устойчивых линий вошинной огневки в ответ на воздействие бактериальных и грибковых патогенов. Это составляющие клеточного и гуморального иммунитета (фагоцитирующая активность гемоцитов, интенсивность инкапсуляции, активация феноксидазы, продукция антимикробных пептидов и кислородных радикалов и др.), экспрессия шаперонов, ингибитора металлопротеаз (IMPI), анализ активности антиоксидантов и мн. др. Повторюсь, что все эти эксперименты выполнены грамотно, методы их проведения и обработки полученных материалов вопросов не вызывают.

Результаты, полученные диссертантом, под стать столь объемному и комплексному исследованию, которое им было предпринято. Отмечу лишь основное, на мой взгляд. Удалось показать, что защитные реакции на бактериальный и грибковый патогены имеют свою специфику. При этом есть

и определенные черты сходства, такие как, например, повышение экспрессии индуцибельного ингибитора металлопротеаз (ИМПІ) и АМБ. В то же время отчетливо показано, что ответ хозяина на инвазирование разными патогенами четко локализован. В случае инфекции БТ выработка факторов резистентности приурочена главным образом к кишечнику (место проникновения бактерий) и к жировому телу, а при поражении грибами — к покровам, через которые они проникают в организм хозяина. Любопытным в этой связи выглядит то обстоятельство, что при грибковой инфекции в первую очередь поражается жировое тело, где производится основная масса антимикробных пептидов, включая лизоцим. Диссертантом показано, что эти соединения играют существенную роль в защите от микозов. Не может ли быть разрушение жирового тела одной из адаптаций грибов, направленной на подавление защитных реакций насекомого-хозяина? Справедливым выглядит заключение диссертанта, что выявленную им специфическую "локализацию" защитных реакций следует рассматривать как адаптацию насекомого, направленную на подавление определенного патогена до его проникновения в гемоцель, где бороться с ним гораздо сложнее.

Важным и хорошо обоснованным представляется и вывод диссертанта о том, что эволюция механизмов резистентности к патогенам у насекомых-хозяев идет не только в направлении совершенствования механизмов, нацеленных на уничтожение паразита (клеточные и гуморальные иммунные реакции, кислородсодержащие радикалы). Имеет место и развитие систем, способствующих инактивации и детоксикации токсинов как экзогенного, так и эндогенного происхождения (антиоксидантная и детоксицирующая системы). Весьма любопытно и обнаруженное диссертантом снижение концентрации рецепторных молекул, наличие которых на поверхности клеток кишечного эпителия необходимо для проявления токсических свойств активированного Сгу-токсина БТ. Здесь напрашивается аналогия с пониженной экспрессией Даффи-рецептора у некоторых африканских народов, живущих в местах с высокой опасностью заболевания малярией. Даффи-рецептор необходим для проникновения возбудителя малярии *Plasmodium vivax* в эритроциты. Эта адаптация не имеет "цены резистентности", что выгодно отличает ее от мутации бета-глобина, приводящего в гомозиготном состоянии к серповидноклеточной анемии. Таким образом, сходные по своей направленности механизмы защиты от патогенов обнаруживаются у животных столь различных по своему филогенетическому положению и уровню организации.

В заключительной части диссертации (глава "Заключение") И. М. Дубовский подробно обсуждает полученные им материалы и сопоставляет их

с имеющимися в мировой литературе наработками. Диссертантом представлена целостная картина особенностей формирования механизмов резистентности насекомого-хозяина к бактериозам и микозам и определены основные направления их совершенствования в ходе микроэволюции. Ряд обсуждаемых в "Заключении" положений уже затронуты мною выше. Хочется остановиться еще на одном, весьма, по-моему, важном аспекте. Это выявленная диссертантом стратегия "быстрого ответа", которая направлена на поддержание в активном состоянии ряда систем инактивации патогена и его токсинов на самых ранних этапах инфекции. Вкупе с "локализацией" защитных реакций в местах вероятного проникновения паразитов, "быстрый ответ" способствует их уничтожению до попадания в гемоцель, где, вследствие открытости кровеносной системы и иммуносупрессии со стороны патогенов, уничтожение их становится проблематичным.

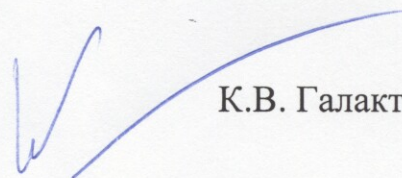
Эти адаптации диссертант рассматривает и в терминах "цены резистентности", справедливо полагая, что благодаря им организму насекомого удастся избежать затрат на постоянно повышенный конституциональный (базовый) уровень защитных реакций. В этой связи отмечу, что в условиях лаборатории диссертанту удалось доказать возможность выработки повышенной устойчивости к патогенам в чреде нескольких поколений. При этом полученная в лабораторных условиях устойчивая линия платит малую "цену резистентности" (либо вовсе ее не платит). Насколько такая ситуация возможна в природе, где в ответ на выработку нового защитного механизма хозяином через некоторое время появляется и контрадаптация паразита? Можно предположить, что "цена резистентности" в природных популяциях достаточно высока, о чем свидетельствует зарегистрированный диссертантом меньший репродуктивный успех устойчивой к грибковой инвазии меланистической морфы огневки по сравнению с ахромистической. Поэтому одним из возможных в дальнейшем направлений исследований могут стать работы по экспериментальной коэволюции, которые позволили бы сопоставить скорости выработки паразитом и хозяином коадаптаций в процессе эволюционной гонки вооружений.

Можно констатировать, что выполненное И. М. Дубовского исследование открывает целое интереснейшее направление в исследовании коэволюции паразито-хозяинных систем "насекомое-хозяин-патоген", которое имеет большую перспективу как для фундаментальной науки, так и для практического использования полученных при его проведении результатов.

Подводя итог, следует заключить, что диссертация И. М. Дубовского представляет собой законченное оригинальное исследование с высокой степенью новизны. Знакомство с ним убеждает, что выносимые на защиту положения имеют крепкую доказательную базу. Сделанные выводы обоснованы и логически вытекают из приведенных в диссертации материалов, а автореферат соответствует ее содержанию.

Хочется особо отметить, что диссертация написана хорошим литературным языком. Диссертанта можно разве что упрекнуть в злоупотреблении словом "данный" (сс. 33, 85, 125, 203 и др.). Изложение материала логичное и четкое. Никаких сомнений в том, что это работа докторского уровня не возникает. Сделанные мною ремарки носят рекомендательный и дискуссионный характер, и не затрагивают сути исследования. Считаю, что И. М. Дубовский заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03-02-05 – Энтомология, поскольку работа соответствует требованиям "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемых к докторским диссертациям.

Зав. лаб. по изучению паразитических червей
Зоологического института РАН,
доктор биологических наук, профессор



К.В. Галактионов

Галактионов Кирилл Владимирович
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской Академии наук (ЗИН РАН)
Университетская наб., 1, 199034, Санкт-Петербург
Тел.: (812)3280611 e-mail: kirill.galaktionov@zin.ru

18 января 2016 г.

