

Отзыв оппонента на диссертацию Струнова Антона Александровича
«Распределение бактерий *Wolbachia* патогенного штамма wMelPop в
центральной нервной системе *Drosophila melanogaster* и их влияние на
продолжительность жизни хозяина при различных температурах»,
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по
специальности 03.03.04 –

«Клеточная биология, цитология, гистология».

Бактерии-эндосимбионты *Wolbachia*, обнаружены у многих членистоногих и
нематод. Поскольку эти бактерии способны вызывать цитоплазматическую
несовместимость и гибель самцов, то возможно их применение в качестве средства
борьбы с переносчиками различных заболеваний. Вероятно также, что эти свойства могут
быть усилены с помощью введения специальных генетических конструкций.
Рассматриваемая работа посвящена изучению распределения бактерий *Wolbachia* в мозге
инфицированных линий дрозофилы при различных экспериментальных воздействиях.
Работа логично продолжает исследования распространения бактерий *Wolbachia* в
природных популяциях *Drosophila melanogaster*, проводимые в лаб. Популяционной
Генетики ИЦиГ, в область генетики развития и ультраструктуры клетки.

В диссертации были поставлены следующие задачи: 1. Сравнить ПЖ и
выживаемость инфицированных и не инфицированных *Wolbachia D. melanogaster* при
разных температурных режимах. 2. Изучить строение клеток мозга *D. melanogaster*,
ультраструктуру и локализацию *Wolbachia* в этих клетках при определенных
температурных режимах. 3. Провести анализ ультраструктурной организации бактерий и
их распределения в клетках мозга *D. melanogaster*, содержащихся в условиях
температурных режимов II. 4. Исследовать распределение бактерий и оценить их титр в
различных отделах мозга *D. melanogaster* на последовательных стадиях их жизненного
цикла (личинка 3-го возраста, куколка и взрослая муха).

Задачи 2 и 3 относятся к области ультраструктуры клетки, задача 4 относится к
области биологии развития, а задача 1 к области биологии продолжительности жизни.
Отмечу также, что использование различных температурных режимов, в том числе и
таких, которые являются стрессовыми для дрозофилы, часто используемый прием в
области исследований контроля продолжительности жизни. Т.о. с самого начала имела
место существенная междисциплинарность планируемого исследования.

Глава 1 диссертации - обзор литературы, который включает: характеристику
различных форм симбиоза, данные о распространении *Wolbachia* у членистоногих и
нематод (Автор цитирует работы, согласно которым около половины видов насекомых и
40% наземных членистоногих инфицированы этой бактерией. Т.о. действительно, выбор

объекта исследования хорошо аргументирован), известные ультраструктурные данные о *Wolbachia* (Из обзора видно, что таких данных крайне мало). Это хорошо показывает **актуальность** проводимого исследования) и их филогении (этот вопрос изучен уже достаточно глубоко), распределение бактерий *Wolbachia* в тканях хозяина (локализация *Wolbachia* в центральной нервной системе хорошо документирована, вероятно она имеет функциональную значимость, так как может влиять на уровень передачи эндосимбионта потомству), воздействие *Wolbachia* на организм хозяина, действие *Wolbachia* на фертильность и жизнеспособность, влияние бактерий *Wolbachia* на продолжительность жизни *D. melanogaster*. Из обзора литературы видно, что рассматриваемая бактерия имеет широкий спектр действия на разные ткани (особенно репродуктивные) хозяина. В ряде случаев известен механизм этого действия. В ряде случаев показано, что это действие зависит от штамма бактерии и генотипа хозяина - т.е. что регуляция взаимодействия является очень тонкой. Именно это и послужило основанием для того, что название изучаемого штамма вынесено в заголовок диссертации. Используемая инфицированная линия дрозофилы также точно определена, неинфицированная линия же, используемая в работе, была получена из инфицированной с помощью длительного содержания на среде с тетрациклином. Это позволило автору получить линию, которая по генетическому строго идентична исходной, но не содержит изучаемых бактерий.

В обзоре литературы имеется раздел, в котором обосновывается выбор *Drosophila melanogaster* в качестве организма-хозяина для изучаемой бактерии. Полностью согласен с аргументами автора. Важной частью обзора является раздел по структуре мозга дрозофилы. Описаны основные морфологические структуры мозга взрослой особи и их функциональное назначение. Замечу, что научная литература о мозге дрозофилы практически безгранична. Некоторые вопросы - например, как различные группы клеток получают из других групп, маркеры для идентификации различных групп клеток, развиты очень сильно. В то же время, ультраструктура различных отделов мозга развита слабо (видимо потому, что наука находится на уровне идентификации этих групп клеток, а вопросы их ультраструктуры логично решать позже). Поэтому, думаю правильно согласиться с подходом автора, который описал структуру мозга с точностью до хорошо видимых морфологических образований. Сведения об ультраструктуре этих образований автор получил в ходе своих исследований.

Методы исследования, использованные автором, включают: выделение геномной ДНК, ПЦР, электрофорез ДНК, выделение фрагментов ДНК и их секвенирование. Эти методы в настоящее время являются широко-распространенными. Также автор использовал метод электронной микроскопии, который встречается далеко не в каждой

работе. Автором были выполнены эксперименты, позволившие найти условия фиксации для хорошего выявления ультраструктуры мозга. Автором использовалась также гибридизация *in situ* для выявления бактерий в мозге. Замечу, что при этом была использована стандартная проба для выявления бактерий. Т.о. подбор условий для успешной гибридизации был существенно облегчен в сравнении со случаем, когда бы автор сам попытался сделать пробу для выявления исследуемых бактерий.

Раздел результаты начинается с описания популяционного эксперимента, в котором зараженные и незараженные взрослые особи содержались определенное время при температуре 29°C, а затем переносились на температуру 16°C (температурные ступеньки). Сравнение продолжительности жизни инфицированных и неинфицированных мух показало, что эффект частичного восстановления жизнеспособности у инфицированных мух, наблюдаемый в опыте, пропадает после 7 дней содержания на высокой температуре. У неинфицированных особей этого эффекта нет (**Вывод 2** диссертации). Автор стал искать объяснение этого эффекта в распределении бактерии в мозге дрозофилы. Прежде чем решать эту задачу, автор провел изучение ультраструктуры клеток мозга дрозофилы. В работе содержатся иллюстрации демонстрирующие ультраструктуру нейронов и клеток глии, а также схемы показывающие локализацию этих клеток на срезах окрашенных метиленовым синим (Эти сведения суммированы в виде **Вывода 1** диссертации). Также автор изучил морфологию бактерий *Wolbachia* в клетках мозга при нормальной температуре. Описана внутриклеточная локализация бактерий в нейронах и клетках и клетках глии, описаны скопления бактерий в этих клетках. Имеются количественные оценки распределения бактерий на уровне клетки.

При пониженной температуре распределение бактерий сходно с тем, которое наблюдается при нормальной температуре. В то же время, при повышенной температуре наблюдаются деградирующие бактерии. Анализ результатов ультраструктурного исследования распределения бактерий в опытах по температурным ступенькам привел автора к выводу, что при содержании мух в течение 7 на повышенной температуре происходит увеличение числа нейронов содержащих большие скопления бактерий.

В работе также было проведено исследование распределения бактерий в мозге личинок и взрослых особей при различных температурных режимах с помощью флуоресцентной микроскопии. Итог этих исследований приведен на Рис46 диссертации и показывает, что, начиная с 7 дня взрослой жизни, титр бактерий в мозге мух существенно возрастает. Т.о. ультраструктурные данные и данные флуоресцентной микроскопии объясняют результаты популяционного эксперимента, описанные в начале отдела. Результаты и суммированные в **Выводе 2** диссертации.

Рассмотренная выше логическая цепочка исследований не является единственной в диссертации. Большое внимание было уделено также вопросу о детерминации распределения бактерий в онтогенезе. Содержание личинок на низкой и на высокой температурах не привело к различиям в распределении бактерий в мозге личинок, в то время как у взрослых особей такие различия были выявлены (**Вывод 4** диссертации). Автор объясняет эти различия тем, что распределение бактерий закладывается в раннем эмбриогенезе за счет неравномерного распределения бактерий по первичным нейробластам (**Вывод 5** диссертации). Далее, в силу асимметричного деления нейробластов возникает наблюдаемая автором неравномерность распределения бактерий в мозге. Такая интерпретация результатов базируется не только на данных автора диссертации, но во многом на данных работы (Albertson et al., 2009), в которой было изучено распределение бактерий того же штамма на более ранних стадиях развития.

Изучая распределение бактерий на уровне ультраструктуры, автор накопил материал по ультраструктуре самой бактерии. На основе этого материала он описал последовательные стадии деградации бактерий *Wolbachia*. Показано, что имеются различные пути гибели бактерий, которые продемонстрированы в диссертации специфическими переходными формами *Wolbachia* в цитоплазме нервных клеток. Эти результаты суммированы в **Выводе 3**. Эта часть диссертации представляет собой отдельное исследование клеточных ультраструктур внутри текста диссертации проиллюстрированное Рис. 27-29.

В целом выводы диссертации понятны и **обоснованы** представленным материалом. Однако часть Вывода 4: "Показано, что повышенная температура не оказывает существенного влияния на титр бактерий в центральной нервной системе личинки мух, однако, значительно увеличивает его, начиная со стадии поздней куколки" нуждается в пояснении. В диссертации показано, что накопление бактерий происходит также и в мозге взрослых мух (Рис 46). Возникает вопрос, почему в выводах автор акцентирует внимание только на накоплении бактерий у личинок и не упоминает о другой фазе. Предлагаю автору ответить на этот вопрос как на **замечание**.

Наиболее **важным** результатом диссертации являются результаты по формированию распределения бактерий *Wolbachia* в эмбриогенезе, изложенные в **Выводах 4,5**. Ультраструктурное исследование поведения этой бактерии в клетках хозяина, суммированное в **Выводе 3**, показывает **квалификацию** автора в отношении метода электронной микроскопии. **Выводы 1,2** посвящены обнаружению эффекта бактерий на продолжительность жизни хозяина и изучению его механизма. Эта часть придает исследованию **законченный** характер. Раздел "Обсуждение" не вызывает

существенных вопросов - на мой взгляд, сравнение полученных данных с данными по другим видам бактерий и хозяев хотя и правомерно, но для рассмотрения данной работы несколько избыточно.

Примененный автором спектр методов исследования является широким, современным и адекватным поставленной задаче. Полученные результаты по распределению бактерий *Wolbachia* в мозге дрозофилы удачно дополняют результаты, полученные другими авторами, т.о. проведенное исследование хорошо вписано в мировой ландшафт работ по этой бактерии и является **актуальным**. Конечной целью исследования рассматриваемой бактерии служит использование ее и ее модифицированных форм для ограничения распространения инфекций. Если рассматривать работу с этой точки зрения, то можно констатировать, что элементы **практической значимости** в работе имеются. **Теоретическая значимость** работы определенно присутствует в **Выводе 3** - автор первым описал спектр морфологий бактерии в клетках хозяина. Другие элементы теоретической значимости распределены по выводам 2, 4, 5. В работе имеется много элементов **научной новизны** - работы по ультраструктуре мозга дрозофилы немногочисленны и крайне фрагментарны, автор во многом самостоятельно заполнил многие пробелы такого рода исследований. Сочетанное действие температуры и бактериальной инфекции на выживаемость дрозофилы и раскрытие механизма этого явления это полностью заслуга автора. Уровень **опубликованности** материалов диссертации достаточно хорош - 3 публикации в журналах из списка ВАК, одна из них в профильном зарубежном журнале. Содержание **автореферата** адекватно иллюстрирует данные полученные в диссертации. Представляемая работа обладает высокой степенью **полноты** рассмотрения вопроса и является **законченным** исследованием. **Достоверность** представленных данных не вызывает сомнения.

На основе проведенного рассмотрения текста диссертации, оцениваю диссертацию положительно, как определенно соответствующую требованиям ВАК к кандидатской диссертации. Считаю, что квалификация Струнова Антона Александровича определенно соответствует уровню кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Омельянчук Л.В. Д.б.н., зав. Лабораторией
Клеточного цикла Института молекулярной
и клеточной биологии СО РАН,
Новосибирск 630090 Лаврентьева 8/2
ome@mcb.nsc.ru

