

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Мустафиной Альфии Радмировны
на тему «Микроскопическая анатомия паразита трески *Pyramicoserphalus*
***phosarum* (Cestoda: Diphylobothriidea)**
по специальности 1.5.12 «зоология»

Диссертационная работа Альфии Радмировны Мустафиной посвящена исследованию инвазивной, плероцеркоидной стадии развития морского дифиллоботриидного вида ленточных червей, обитающего в полости тела и тканях морских промысловых рыб: трески, пинагора, сайды и керчака и др. Работа производит благоприятное впечатление. Актуальность и новизна исследования не вызывают сомнений. Морфофункциональные исследования цестод актуальны для понимания взаимоотношений паразита и хозяина и исследования адаптивных механизмов цестод к паразитированию в промежуточных, дополнительных и окончательных хозяевах в процессе реализации их жизненного цикла. В своей работе для выполнения морфофункциональных исследований Альфия Радмировна использовала комплекс современных биологических методов: молекулярную филогенетику, методы световой конфокальной, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Объектом исследования выбран малоизученный вид дифиллоботриидных цестод *Pyramicoserphalus phosarum* на личиночной стадии развития во втором промежуточном хозяине, добытых из полости тела беломорской трески. У личинок *P. phosarum* автором работы изучено строение тегумента, нервной, протонефридиальной систем и железистого аппарата, важных для оценки структурных адаптаций личинок дифиллоботриид к паразитированию в полости тела промежуточного хозяина, а также для сравнительной морфологии ленточных червей. Кроме того, впервые проведена сборка транскриптома *P. phosarum* и на основе полученных данных составлена база белковых последовательностей данного вида гельминта. Все полученные

Мустафиной А.Р. научные результаты оригинальны и выполнены впервые для плероцеркоидов *P. phosarum*.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 186 страницах, состоит из 5 глав (введение, литературный обзор, материал и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, благодарностей, списка литературы и приложения, включающего 2 таблицы, списка сокращений и 33 рисунка. Список литературы включает 247 источников, из них 51 – на русском языке, остальные – иностранные источники. Представленные в диссертационной работе рисунки, содержащие электронно-микроскопические скановые (21 фотография) и трансмиссионные (83 фотографии) иллюстрации, фотографии конфокальной микроскопии (48 фотографий), фотосъемки (2 рисунка) и графические схематические изображения (5 страниц) отличного качества и наглядно иллюстрируют полученные результаты.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи, из которых 3 - в изданиях из перечня научных журналов, рецензируемых ВАК при Минобрнауки России и базах Scopus и Web of Science, и 1 статья опубликована в зарубежном журнале *Zoology*, базы данных WoS. В двух из четырех опубликованных статей Альфия Радмировна - первый автор, что свидетельствует о ее значительном вкладе в совместную работу над статьями.

Для достижения поставленной цели – изучения структурной организации плероцеркоида *Pyramisoseraus phosarum*, паразита беломорской трески *Gadus morhua*, были определены три адекватные этой цели задачи, направленные на определение видовой принадлежности собранных плероцеркоидов методами молекулярной генетики, на изучение строения тегумента, фронтальных желез, мышечной, нервной и выделительной систем и проведение сравнительно-морфологического анализа строения *P. phosarum* с другими видами цестод.

Применяемые методы исследования подробно изложены в диссертации. Помимо основного объекта *P. phosarum*, материалом для исследования обозначены плероцеркоиды лигулид *Schistocephalus solidus* и трипаноринх *Nybelinia surmenicola* и взрослые кариофиллиды *Caryophyllaeus laticeps*.

Необходимо добавить информацию о причинах их включения в данную диссертационную работу.

Диссертантом на защиту вынесены четыре положения, которые подтверждаются выводами о полученных результатах. Можно поспорить с частью вывода 1, что «плероцеркоид в треске окружен тонкой соединительно-тканной капсулой, формирующейся организмом хозяина», что, несомненно, справедливо, но о формировании капсулы нет доказательных результатов в тексте диссертации. Относительно вывода 2 о выявленных типах микротрихий можно поспорить с автором работы о количестве описанных типов. Из просмотра микрофотографий можно констатировать факт наличия еще одного типа микротрихий (смотрите замечания к иллюстративному материалу). Не убеждает авторское заключение, что в базальном матриксе тегумента, впервые для отряда *Diphyllobothriidea* описаны радиальные закоривающие филаменты. Краткое их описание, проиллюстрированное одной фотографией малого увеличения, недостаточно для понимания природы данных филаментов. В выводе 3 автор констатирует, что «фронтальные железы открываются самостоятельными протоками и порами в тегументе», в действительности, это поры протоков. В выводе 6 можно подвергнуть сомнению высказывание, что «Выделительная система плероцеркоида *P. phocaum* представлена самостоятельными ресничными клетками и сложной системой каналов синцитиального строения». Общеизвестно, что терминальные ресничные клетки рассматриваются в качестве структурно-функциональной единицы протонефридиальной системы. С функциональной точки зрения невозможно представить «самостоятельность» ресничных клеток без выводящей канальной системы, так и выделительных каналов - без ресничного терминального комплекса. На приведенной диссертантом схеме 19 наглядно и корректно показана взаимосвязь терминальных клеток и выделительных каналов и что каждая из указанных структур – не самостоятельный элемент, а единый комплекс. Наличие множественных нефропор, открывающихся в терминальную пору, вероятно, обусловлено их множественной закладкой у

плероцеркоидов для перехода к последующей полизоичной стадии цестод. В выводе 8 можно поспорить с авторским положением «Изменения в структуре цитоплазмы в выделительных каналах цестод свидетельствует о многофункциональности экскреторного эпителия». Предположение о многофункциональности не было поддержано детальными TEM исследованиями и/или изучением стенки выделительных каналов после инкубации червей в растворах моноклональных антител. На рисунках 22Б, 25Е и 26В видно, что стенка эпителиальных каналов 2 порядка, главных каналов и мочевого пузыря имеет усиленный, гомогенный, плотный матрикс апикальных участков цитоплазмы, не исключена иммунореактивность к f-актину. В выводе 9 «Тонкое строение плероцеркоида *P. phocaenum* имеет ряд уникальных черт, но, в целом, соответствует другим представителям отряда *Diphyllbothriidea*». Следует конкретизировать выявленные уникальные черты.

Глава «Результаты» состоит из трех разделов: первый посвящен генетическому исследованию плероцеркоида из трески, второй – двигательной активности плероцеркоида *Pyramicoscephalus phocaenum* и третий – микроскопической анатомии и ультраструктурной организации систем органов плероцеркоида *P. phocaenum*. Раздел диссертации по генетическому исследованию плероцеркоидов был выполнен на основе анализа 18S рДНК. К списку подтвержденных молекулярными методами вторых промежуточных хозяев исследованного вида отнесены треска и пинагор. Научный интерес представляет раздел результатов, посвященный изучению нервной системы плероцеркоида *P. phocaenum*. Использование комплекса методик как иммуногистохимическое определение ацетилированного тубулина, FMRF амида, серотонина, Gaba-like IR (гамма-амино-масляная кислота) и трансмиссионной электронной микроскопии были идентифицированы FMRFamide-, GABA-like- и серотонинэргические нейроны, описаны 4 ультраструктурных типа нейронов и 4 типа сенсорных органов, предложена модель нейро-железистого мозга, показано участие серотонина в работе ресничных терминальных клеток. Несомненную научную ценность и новизну

представляют полученные диссертантом оригинальные данные по окраске фаллоидином, α -тубулином и иммунореактивности к серотонину (5-НТ) терминальных клеток выделительной системы, по реконструкции протоков выделительной системы плероцеркоида *P. phocaenum*. Впервые для плероцеркоида *P. phocaenum* изучена общая архитектура нервной системы с характерной низкой концентрацией нервных элементов. Впервые для цестод показано участие серотонина в работе ресничных терминальных клеток и наличие фибриллярного актина в клеточной цитоплазме. Констатация FMRFamide-эргической регуляции выброса секрета фронтальных желез плероцеркоидов можно рассматривать пионерными данными для личиночных стадий развития цестод. Выявлено, что иннервация фронтальных желез плероцеркоида *P. phocaenum* осуществляется непосредственно нейронами латеральных долей и медианной комиссуры.

Глава «Обсуждение» посвящена сравнительному анализу полученных результатов с таковыми других видов дифиллоботриидных цестод и видов из других отрядов ленточных червей. Сравнительный анализ протонефридиальной системы плероцеркоидов *Pyramisoscephalus phocaenum*, *Schistocephalus solidus*, *Nybelinia surmenicola* и взрослой особи *Caryophyllaeus laticeps* базировался на собственных исследованиях А.Р. Мустафиной, включенных в раздел «Результаты» данной работы.

Завершается диссертационная работа логичным заключением. Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертационной работы. Стоит отметить список литературы, в котором наряду с современными источниками цитируются работы по паразитологии, относящиеся к 50–80 годам XX столетия. В таблице 1 «Приложения» дан сводный список терминов, используемых в литературных источниках при описании выделительной системы цестод. Все это свидетельствует о тщательной работе А.Р. Мустафиной с литературой и знанием предмета исследований.

Однако, к некоторым разделам диссертации есть ряд замечаний.

Непонятна причина включения в результаты отдельной главы 4.2. по визуальным наблюдениям двигательной активности плероцеркоида *Pyramicoserphalus phosarum in vitro*, извлеченного из капсулы. Как правило, подобного рода движения характерны для любого вида цестод. Понять замысел автора можно при одном условии, если выявленная двигательная активность плероцеркоида была бы привязана к исследованию конкретных морфологических структур, например, мускулатуры или нервной системы, или к описанию строения сколекса. Однако, в результатах мышечная система рассмотрена поверхностно и не проиллюстрирована, а в обсуждении дано лишь предположительное объяснение движениям личинки. С точки зрения научной значимости и новизны, более важны ультраструктурные знания о формировании и строении капсулы, окружающей дифиллоботриидных плероцеркоидов, изучение взаимоотношения личинок с тканями капсулы. Таковые данные отсутствуют в работе, но они необходимы и для подтверждения авторской гипотезы о треске, как резервуарном хозяине *P. phosarum*, в котором не происходит метаморфоза личинки, а лишь ее линейный рост.

В Таблице 4 «Приложения» даны термины и определения, используемые в описании выделительной системы автором диссертации. Однако, на протяжении всего текста диссертации, где присутствует информация по выделительной системе, автор использует широкий спектр терминов, выходящих за рамки Таблицы 4, но присутствующих в Таблице 1. Необходимость в таблице 4 отпадает полностью.

В тексте диссертации неоднократно подчеркивается, что «фронтальные железы имеют синцитиальное строение». Доказательства данного факта отсутствуют как в тексте результатов, так и в иллюстративном материале (Рис. 18 Б, Г). С большой долей вероятности можно говорить об одноклеточных специализированных железистых клетках, поскольку их протоки укреплены микротрубочками и высвобождение секреторных гранул осуществляется путем эккринового типа секреции.

На стр. 43 автор упоминает новый тип клеток «гликогеновые клетки». Как правило, это мышечные клетки. В тексте диссертации необходимо заменить «каналы, выводящие мочу» на каналы, выводящие экскреторные продукты.

В тексте диссертации встречаются неудачные выражения, которые достаточно экспрессивные для строгого научного текста: Стр. 29 «Свежевыделенных из трески плероцеркоидов»; Стр. 39 «Плероцеркоиды располагаются в полости тела»; «Для животного, вынутого из капсулы, характерны регулярные перистальтические сокращения»; Стр. 41 «Апикальный кончик микротрихии»; Стр. 42 «Апикальная часть электронотемная»; Стр. 44 «Цитоны имеют богатое эухроматином ядро»; Стр. 46 «Латеральные доли широко расставлены» и пр.

Замечания к иллюстрациям. Для нумерации иллюстраций в каждом рисунке автор использует русский алфавит, а английский – для обозначения в рисунках. Как правило, рекомендуется использовать единый алфавит при составлении иллюстраций. Выявлено ряд неточностей в подписях к рисункам и обозначениях. Рис. 3В, сколекс дорсальной или вентральной стороны, следует определиться со стороной или избежать в подписи указание на сторону. Рис. 5В, 16Б, 16Г, 18З – на данных фотографиях изображены микротрихии четвертого типа, о котором автор не упоминает, а рассматривает их как микротрихии первого типа. Подпись к рисунку 6Д – мышечная клетка с гликогеном, не соответствует изображению на фотографии, это часть саркоплазмы с мышечным волокном и без гликогена. Рис. 14А, на данном изображении нейриты не контактируют с клетками желез и мышц, а соседствуют. Рис. 15А, определение цитоплазмы как «пенистая» следует заменить на иной термин, упомянув о скоплениях рибосом в цитоплазматическом матриксе данных клеток. Рис. 18Г, в подписи «цистерны» надо заменить на «протоки фронтальных желез». Рис. 18Е, подпись к рисунку отсутствует. Рис. 25 Д-Е, дана некорректная подпись «эпителий главных каналов с двухслойной апикальной цитоплазмой». Эпителиальный

цитоплазматический слой однослойный, но содержит гетерогенный цитоплазматический матрикс. Рис. 27, на приведенной схеме отчетливых различий в строении терминальных клеток не видно. У каждого конкретного вида цестод на протяжении их тела можно наблюдать морфологические вариации в строении их терминальных клеток. Более весомо, следует обратить внимание на доминирование тех или иных органоидов, на различие в строении ресничных корешков, на морфологические вариации апикального покрытия эпителия экскреторных каналов у видов, принадлежащих разным отрядам.

Однако, все высказанные замечания не влияют на общее высокое качество проделанной работы. Таким образом, диссертационная работа Мустафиной А.Р. «Микроскопическая анатомия паразита трески *Ryamicosephalus phocarum* (Cestoda: Diphyllbothriidea)» является законченной научно-квалификационной работой. По научной новизне, актуальности, методическому уровню, теоретической и практической значимости, уровню публикаций диссертация представляет собой законченное исследование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.12 – «зоология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным п.п. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова. Диссертационная работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Московского государственного университета.

Таким образом, соискатель Мустафина Альфия Радмировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – «зоология».

Официальный оппонент:

Поддубная Лариса Григорьевна

кандидат биологических наук

ведущий научный сотрудник Лаборатории экологической паразитологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Адрес места работы:

152742, Ярославская область, Некоузский район, п. Борок, д. 109

Тел.: 8(4847) 24-042; e-mail: adm@ibiw.ru

Поддубная Л.Г.

24.10.2022

Контактные данные:

Телефон: ·

Электронная почта: poddubnaya@ibiw.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.19 – «паразитология»

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН Поддубной
Ларисы Григорьевны удостоверяю:

руководитель/кадровый работник

штамп, подпись, гербовая печать

