ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертационной работе **Жигилевой Оксаны Николаевны**

«ВЗАИМОСВЯЗЬ ЗАРАЖЕННОСТИ ГЕЛЬМИНТАМИ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЖИВОТНЫХ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.04 - зоология.

Диссертационная работа Оксаны Николаевны Жигилевой представляет результат многолетнего исследования паразитарных систем Западной Сибири. Основная направленность работы – попытка сопоставить некоторые показатели генетического разнообразия с оценкой параметров паразитарных систем. При этом в исследование автор включает фрагменты широкого круга разнообразных паразитарных систем, связанные с различными видами млекопитающих, амфибий и рыб. Исследование природных паразитарных систем – весьма трудоемкая задача, требующая не только точного выделения в природе «объекта» исследования – многокомпонентной надорганизменной системы, но еще и включающая масштабную рутинную работу по оценке зараженностей в объеме достаточном для статистических оценок. Впрочем, автор ставит перед собой еще более сложную задачу. В фокусе ее интересов – связь структурных показателей паразитарных систем с генетическими параметрами популяций хозяев и паразитов, попытка получить данные о генетических механизмах регуляции в паразитарных системах. Вкратце –оценка распространения и распределения по хозяевам паразитических организмов как потенциального фактора, действие которого отражается на генетической структуре популяции хозяев. Заметим, что решение популяционно-генетических задач также требует от исследователя анализа обширных выборок для надежных заключений. Это делает задачу автора еще более трудоемкой.

Необходимо отметить, что именно трудоемкость решения такого рода задач приводит к тому, что надежных данных о популяционной генетике взаимодействия паразит-хозяин всегда недостаточно. Именно это в первую очередь определяет актуальность получения новых масштабных популяционно-генетических данных о природных паразитарных системах. Раскрытие цели работы - изучения взаимосвязи между показателями видового и генетического разнообразия животных и их зараженностью паразитами – предполагает комплексный характер исследования. В нем должны быть сопряжены выборочные методы исследования природных популяций, методы паразитологического анализа, методы оценки генотипического состава популяций хозяев и их паразитов, а также лабораторные экспериментальные исследования. Все это имеется в представленной работе. Суммарный объем проанализированного материала велик и по количеству исследованных видов (2735 особей 21 вида грызунов и насекомоядных млекопитающих, 241 особь двух видов куньих, 1115 особей двух видов лягушек, 1412 особей рыб четырех видов), так и по количеству исследованных популяций/выборок. Широк и охват обследованных территорий (20 районов Западной Сибири). Отметим также, что указанный объем материала очень неравномерно использован для решения различных задач работы, что требует постоянного внимания при оценке того или иного результата исследования.

Диссертация изложена на 415 страницах текста, состоит из введения, семи глав и выводов, проиллюстрирована 85 таблицами, 56 рисунками и 3 приложениями. Список литературы включает 626 источников, в том числе 296 – на иностранных языках.

Вводный раздел диссертации содержит все необходимые для квалификационной работы части. Автор обосновывает актуальность работы важностью анализа природных паразитарных систем как с точки зрения «нормального» функционирования сообщества, так и с точки зрения модификации сообществ за счет природных климатических и антропогенных воздействий. Не вызывает сомнения важность анализа генетических взаимодействий паразит-хозяин, хочу только отметить, что «представление о наличии генетических механизмов регуляции паразитарных систем» (с. 6) сформировалось в качестве исследовательской программы не в последние годы, а в 70-80-е годы XX века, разделившись к нынешнему времени на несколько областей паразитологических исследований и накопив огромный фактический материал.

Именно в этом разделе диссертант формулирует положения, выносимые на защиту, основные тезисы которых - **согласованное изменение показателей видового и генетического разнообразия паразитов и хозяев, а также специфичная для каждой системы паразит-хозяин дифференциальная зараженность хозяев, обладающих разным генотипом**.

Глава 1 посвящена обзору имеющихся работ, тематически связанных с обсуждающимися в диссертации проблемами.

Сильной стороной этого раздела выступает широкий охват проблематики, включающий обсуждение понятий и определений паразитизма вообще, молекулярно-генетических аспектов отношений паразит-хозяин, генетических основ специфичности, особенностей генетической структуры популяций паразитов. Хорошее впечатление оставляет анализ известной информации о популяционно-генетических механизмах регуляции паразитарных систем, включающий данные по разнообразным симбиотическим системам, включая микробно-растительный симбиоз. Конечно, при таком широком подходе и гигантском объеме новой литературы, автор всегда рискует получить упрек в неполноте охвата всей новейшей информации по проблеме.

В качестве конкретных замечаний по разделу отмечу следующее. Автор пишет (с.18) «… у трематод сужение генетической изменчивости приурочено к стадии спороцисты, и происходит в результате отбора мирацидиев на совместимость с хозяином (моллюском) с последующим восстановлением численности путем партеногенетического размножения. То есть, в гемипопуляции спороцист происходит дрейф генов, который ведет к уменьшению изменчивости их популяций». Однако на стадии внедрения мирацидия происходит жесткий отбор определенных генотипов, после чего выросшая из успешного мирацидия спороциста просто воспроизводит отобранные генотипы. В чем тогда заключается дрейф генов в «гемипопуляции спороцист»?

На с.20 приведен тезис «Паразитизм рассматривается как начало своеобразного способа эволюции новых таксонов путем симбиоза – симбиогенеза». Неясно почему автор не упоминает комменсальные отношения как еще более широкую основу для потенциального симбиогенеза.

Текст раздела в целом читается достаточно легко, но не лишен стилистических неточностей, которых хотелось бы избегать в работе такого уровня. Например (с. 45), «Желудочно-кишечные расстройства в свиноводстве очень распространены и являются серьезной проблемой», (с. 49) «С помощью тренировочных поколений осуществляют корреляцию между фенотипом и генотипом…».

Глава 2. «Материалы и методы» дает краткую сводку очень разнородной информации. От определения мест сбора, до изложения методической части молекулярно-генетических исследований. Учитывая разноплановость материала, обилие видов, популяций и необходимость комплексных анализов, можно отметить сложнейшую задачу, которая стояла перед автором в этой главе. Не способствует ясности имеющееся в разделе описание преимуществ того или иного метода. Все это – материал обзора литературы. Работа разнородна. Для исследования различных паразитарных систем применялись различные сочетания методов. Забегая вперед, необходимо

отметить, что ясного понимания структуры материала сильно не хватает в последующих главах. Хорошим выходом из этой ситуации было бы стандартное изложение информации по использованному материалу в каждой последующей главе в связи с анализом соответствующей паразитарной системы. Де факто же часть информации приводится в разделе Материалы и методы, часть – в соответствующих главах. В результате не формируется важнейшая для оценки популяционно-паразитологической и, сопряженной с ней, популяционно-генетической информации, ясность в понимании места, времени, объема материала.

Глава 3 посвящена описанию гельминтофауны модельных групп позвоночных. Раздел представляет объемные описания фауны паразитов млекопитающих, амфибий, рыб. Это само по себе является важным вкладом для уточнения паразитофауны рассматриваемого региона. Поскольку работа проводилась в различных точках региона и представляет временнЫе серии – основательность этой информации увеличивается. Эта сводка – серьезный фактологический вклад, который увеличивает значимость диссертационного исследования.

В качестве недостатков раздела можно отметить недостаточную «строгость» изложения с точки зрения важного для квалификационной работы разграничения собственных данных, результатов других авторов и общей трактовки. Описание по каждой группе хозяев начинается обширными преамбулами (очевидно, материал обзора литературы; лишний в данной главе), затем собственные данные, сразу и часто вперемешку с собственными данными других исследователей и обсуждение всего вместе. В результате, весьма сложно «фокусированно» оценить что является результатом диссертационного исследования, а что представляет заключение на основе всего массива имеющейся информации. Пожалуй, изложение материала по рыбам представляет наиболее четко структурированную информацию с этой точки зрения и создает достаточно полную картину результатов исследования.

В Главе 4 речь идет о популяционно-генетической структуре модельных групп животных. Это наиболее объемный раздел диссертации в сумме занимающий более ста страниц рукописи. В разделе приведены данные как по хозяевам, так и по некоторым группам их паразитов.

Данные по генетической структуре популяций бурозубок и мышей получены только методом аллозимного анализа, с соответствующим расчетом показателей полиморфизма, генетического сходства и дистанции. Анализ позволяет выявить существенную структурированность популяций, связь с распространением «хромосомных рас» бурозубок, а также отметить связь частот генетических маркеров с особенностями структуры популяций (в частности, различия в межпопуляционных сравнениях генетической структуры синантропного и «природных» видов мышей).

Таблицы, иллюстрирующие использованный материал свидетельствуют о том, что выборки для аллозимного анализа во многих случаях формировались на основе суммирования материала разных лет. Строго говоря, такие выборки оценивают различные генеральные совокупности, их использование для расчета интегрального показателя может приводить к очень существенным искажениям реальных частот соответствующих генов в популяциях. На страницах 240-241 автор приводит данные по динамике показателей зараженности полевок в разные годы. Экстенсивность инвазии и другие показатели проявляют значительную динамику. Суммирование любого показателя в этой ситуации чревато появлением ложных «закономерностей».

Для оценки значимости данных аллозимного анализа цестод (с. 143) автор использует весьма ограниченный по объему материал. Так, изменчивость *Hymenolepis* исследуется на 16 цестодах из 1 мыши и 8 цестодах еще из трех. Еще более ограниченная выборка используется для оценки изменчивости *R. microstoma*. Проблема здесь даже не столько в общем числе экземпляров цестод, а в том, что они получены из единичных особей хозяев. Такой материал вообще можно рассматривать

как сугубо предварительный. И уж тем более на его основании нельзя строить какие-либо рассуждения о генетической структуре популяции (см. с.145).

Вопросы возникают и по оценке генетической структуры группировки цестод *Arostrilepis horrida* из полевок. Генетический анализ выполнен всего по 12 экземплярам, при этом неясным оказывается из какого количества особей хозяев они получены.

Много вопросов возникает по материалу, представляющему изменчивость морфометрических показателей цестод в связи с генотипом полевок. На варьирование показателей существенное влияние может оказывать точка сбора (их 9), год сбора (2001 – 2005), кроме того, при изложении этих результатов не указано какой вид полевок использовался. Все это не позволяет строить определенные утверждения на основании этих данных.

В некоторых случаях при изложении материала автор не указывает величину выборок. Это не позволяет составить представление об основательности приведенного материала. Так, результаты аллозимного анализа рыб (с. 191) не сопровождаются данными о количестве выборок язей, плотвы, ельцов, о количестве особей в каждой выборке. Численности не указаны в большинстве таблиц. В таблице 49 и в тексте не указана оценочная статистика при сравнении числа чешуй разных видов рыб. При описании генетической изменчивости (локус ISSR) трематод *Opisthorchis felineus* не сказано, как формировались выборки метацеркарий для анализа. Сколько личинок исследовано, из скольких особей хозяина они получены, какую популяцию хозяина характеризуют эти выборки. В работе сказано, что «Сравнение метацеркарий, собранных от разных видов рыб, показало, что выборка личинок из плотвы статистически значимо отличается от личинок из ельца по частотам 7 бэндов, а от личинок из язя – по 5» (с. 219). Однако таблица 53 свидетельствует о том, что сравнение метацеркарий из хозяев одного места можно делать только для плотвы и язя в одной точке совместного сбора и для язя и ельца – в другой. Более того, показатели, полученные на материале из одной реки, для метацеркарий из язя различаются в 7 раз.

Еще меньше информации приведено о формировании выборки марит. Марит *Opisthorchis felineus* выращивали в лаборатории в золотистых хомячках. Нигде в работе нет информации сколько метацеркарий и от каких видов рыб использованы для заражения. Данные таблицы 53 не позволяют понять какие именно мариты выращивались и, соответственно, как относиться к приведенным показателям сходства-различия. В таблицах 55-58 не указана стадия анализируемого паразита. Таблица 56 – единственная, в которой указаны численности анализируемых особей. Все это в целом существенно затрудняет понимание данных по генетическому анализу трематод.

В целом материал, изложенный в Главе 4 представляется весьма неоднородным. Данные о генетической структуре популяций хозяев представляются более основательными, особенно это касается подробно изложенных материалов по популяциям рыб. Что касается данных по паразитическим организмам, то они базируются на незначительной фактической основе. Возможно, более подробное описание методической части, в частности, формирования выборок позволило бы составить более ясную картину о характере варьирования и значении этих данных.

Глава 5 касается вопросов о взаимосвязи генетических и паразитологических характеристик популяций хозяев. В этом разделе показаны различные тенденции в соотношении гельминтов у популяций грызунов и насекомоядных млекопитающих в популяциях таежной, лесостепной и степной зон. Показано наличие положительной корреляции между показателем видового разнообразия сообщества грызунов и их гельминтов. Что касается популяционно-генетических показателей: у мелких млекопитающих выявлена отрицательная корреляция показателей средней гетерозиготности популяций и индексов видового разнообразия гельминтов, а индекс обилия паразитов положительно коррелируют с гетерозиготностью популяций полевок. Понятно, что корреляция не означает функциональной связи. Гетерозиготность популяций хозяев, например,

может быть связана с географическими клинами и с массой других причин. Здесь, при обсуждении этих данных, необходимо быть максимально осторожным в утверждении связи соответствующих показателей с зараженностью.

В этом же разделе приведены данные по зараженности различных групп хозяев внутри вида выделяемых различными генотипическими маркерами. Действительно, данные из природных популяций показывают меньшую паразитарную нагрузку группы хозяев, маркированных Est-1 генотипом (бурозубки, аллозимный анализ). Зараженность полевок («нормальный» митотип, cyt b) ниже, чем у особей с иным генотипом по этому маркеру. Показатели гетерозиготности рыб коррелируют с отдельными показателями зараенности (язь, аллозимы). Лабораторные эксперименты по инвазии золотистых хомячков описторхисом не выявили различий в развитии паразитов в инбредных и аутбредных «расах» хозяев.

Глава 6 посвящена анализу ассоциации биохимических и генетических маркеров с зараженностью. Аллоферментный анализ тканей зараженных млекопитающих (модельные виды – золотистые хомячки и крысы), а также выращенных в хомячках марит *Opisthorchis felineus* приводит автора к выводу о том, что имеется определенное сходство хозяина и паразита по неспецифическим эстеразам. Этот вывод необходимо рассматривать как сугубо предварительный, поскольку единственный контроль, который вообще позволяет говорить о сходстве двух систем – это аналогичные показатели крыс – животных, на которых не удалось провести ни одного удачного заражения.

Более основательными представляются данные по дифференциальному заражению различных видов и особей хозяев, характеризующихся различными генетическими маркерами. У язя и плотвы количество метацеркарий трематод коррелирует с некоторыми аллоферментными аллелями и аллелями ISSR. Выявлена ассоциация зараженности представителями разных классов гельминтов бурозубок (*Sorex*) и полевок (*Myodes*) с ISSR-маркерами. У представителей р. *Martes* установлена дифференциальная зараженность гельминтами обладателей разных гаплотипов мтДНК.

Хотя ряд данных достаточно подробно представлен в этом разделе, в отдельных местах проявляется уже указанный недостаток в изложении материала. Так, данные по анализу рыб не сопровождаются ни указанием популяций, взятых для анализа, ни указанием численностей проанализированных хозяев. Есть указание на использование 111 особей из 10 мест отлова, но не сказано вместе анализировали такую комбинированную выборку или отдельно; есть ли ANOVA, оценивающая фактор «место отлова».

В Главе 7 автор обсуждает важные теоретические вопросы, связанные с фундаментальной значимостью генетических аспектов взаимодействия паразит-хозяин, а также касается вопросов практического применения полученных знаний для «управления паразито-резистентными популяциями животных» (замечу, что сам термин «паразито-резистентный», использованный также в названии главы не представляется удачным, хотя мысль автора передает).

В разделе дается трактовка понятию резистентности. Резистентность и толерантность автором понимаются в соответствии со взглядами Реберга с соавторами – как две потенциальные стратегии. Первая, направленная на устойчивость к заражению. Вторая – на минимизацию вреда от заражения для организма хозяина. Соответственно, можно предполагать, что генетические адаптации популяции/вида могут преимущественно решать первую или вторую задачу.

Большое внимание в этой теоретической главе уделено разностороннему обсуждению признака индивидуальной или среднепопуляционной гетерозиготности, его потенциальному значению как интегральной характеристике генотипа. Рассматриваются возможные коррелятивные отношения с

иными признаками и, конечно, потенциальная связь с зараженностью особи/экстенсивностью инвазии популяции хозяина.

Наконец, последняя часть главы снова возвращает нас к представлению особенностей применения генотипических маркеров, использованных в работе. В конце автор формулирует пять особенностей использования генетических маркеров резистентности для «управления» резистентностью популяций. Эти положения выглядят вполне убедительно.

В целом материал последней главы, в качестве определенной «идеологической надстройки» над основным содержанием работы, выполняет свою функцию, хотя и в значительной степени перекликается с отдельными частями раздела Обзор литературы. Вероятно, в этой заключительной части работы стоило бы показать перспективы использования генетических маркеров к паразитарным заболеваниям животных. А они, конечно, связаны с возможностями специфических маркеров, поиск и применение которых становится возможным в связи с бурным развитием полногеномного секвенирования и функциональной геномики.

Выводы работы сформулированы в виде компактных утверждений. По смыслу этих тезисов возражений по формулировкам не возникает. Выводы обоснованы материалом диссертационного исследования и методикой его обработки.

Представленная к защите диссертация посвящена важным фундаментальным и потенциально прикладным аспектам анализа генетической структуры видовых популяций млекопитающих, амфибий, рыб на обширной территории и вовлеченности этих популяций в структуру соответствующих паразитарных систем региона. Работа является комплексной по своей методической базе, основывается на многолетнем материале. Многочисленные вопросы и замечания, обозначенные в отзыве, относятся в значительной степени к «технике представления» рукописи и не ставят под сомнение выводы диссертации, основанные на большом экспериментальном материале.

В целом диссертация Жигилевой Оксаны Николаевны «Взаимосвязь зараженности гельминтами и генетического разнообразия популяций животных», соответствует требованиям, предъявляемым работам, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.04 - зоология. А сам диссертант заслуживает присвоения ему искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.04 - зоология.

Текст автореферата в целом полно отражает основное содержание диссертации. Основные результаты обнародованы в многочисленных публикациях автора (150 работ, в том числе 30 статей в научных журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ; 4 – главы в коллективных монографиях; учебное пособие) по теме диссертации.

Профессор, заведующий кафедрой
Зоологии беспозвоночных
Санкт-Петербургского
государственного университета,
доктор биологических наук
1.11.2017

А.И.Гранович

199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб. 7/9,
тел. 8921951 76 83
e-mail: a.granovich@spbu.ru

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ
А. И. Гранович
ЗАВЕРЯЮ

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПБГУ
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ