

## ОТЗЫВ

### официального оппонента на диссертацию

#### **Татьяны Владимировны Давыденко «Тканевая организация и формирование защитных структур скребня *Acanthocephalus tenuirostris* (*Palaeacanthocephala*, *Echinorhynchidae*)» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности ВАК 1.5.17. Паразитология (биологические науки)**

Обоснование актуальности. Скребни - массовые паразиты молоди пресноводных промысловых рыб, лососей, хариусов, ленков и наносящие ущерб природным рыбным ресурсам в Сибири и на Дальнем Востоке. Биология, сложный жизненный цикл с участием промежуточного хозяина -беспозвоночного, особенно личиночных стадий скребней, очень слабо изучены. Поэтому соискатель выбрала такой массовый вид *Acanthocephalus tenuirostris* (класс *Palaeacanthocephala*, семейство *Echinorhynchidae*) в качестве объекта и модели исследования и долго, кропотливо и добросовестно изучила его как в полевых условиях, так и в лабораторных экспериментах по развитию личинок на промежуточном хозяине.

Обоснование цели и задач диссертации. Диссертант выбрал удобный для полевых наблюдений и прослеживания жизненного цикла в эксперименте на промежуточном хозяине объект – массовый вид скребней, паразитирующий на промысловых рыбах, хариусах и ленках. Суть (и цель) исследования состояла в прослеживании и сравнении всех стадий цикла в их обратной реконструкции – от взрослого червя к младшим личинкам, используя новейшие методы трансмиссионной электронной микроскопии. Так подробно отдельные виды скребней практически никто не исследовал ранее, поэтому работу можно считать классической для последующих сравнений с скребнями из других классов, кроме *Palaeacanthocephala*. Соответственно цели, исследование разбито на три задачи: исследование ультраструктуры взрослых самок и самцов с особым вниманием к половым системам; ультратонкая морфология личиночных стадий развития при заражении промежуточного хозяина – водяного ослика; для понимания динамики паразит-хозяинных была исследована ультраструктура формирующейся отношений в промежуточном хозяине цисты и граничащего с ней тегумента. Таким образом, исследование охватывало и морфогенез паразита и его мало исследованные отношения с беспозвоночным хозяином. Работа удивляет детальностью и дотошностью сравнений структурных элементов в пределах единого цикла развития паразита.

Структура диссертации общим объемом 169 страниц (основная часть – 108 страниц) состоит из: 5 глав, заключения, выводов, списка литературы из 178 источников (56 отечественных русскоязычных) и огромного приложения из 58 замечательных иллюстраций, включающих электронограммы, цветные фотографии светооптических препаратов и штриховые рисунки. Иллюстрации снабжены подробными условными обозначениями и легендами, с тщательностью, присущей морфологам.

Научная новизна обусловлена открытиями автора на уровне ультраструктуры: это собственно описание развития ранее не исследованного методами ТЕМ массового вида паразита, роль мышечных тканей в формировании оболочек половой системы типа скребней, где у других типов животных задействованы эпителии; перемещения (фрагментация) ядер тегумента, симпластического аналога внешнего эпителия, с сохранением тонких перемычек между ядерными фрагментами, необычный способ формирования цисты в промежуточном хозяине без участия микроворсинок, за счет внутренних инвагинатов цитоплазмы тегумента, а также возможность сбрасывания внутреннего слоя цисты- гликокаликса у пре-адультной личинки-цистоканта.

Научное и практическое значение диссертации несомненно. Как и любое глубокое исследование цикла массового паразита промысловых видов рыб, в этот труд дает понимание узкого звена в цикле вредного организма – т.е. личиночных стадий в промежуточном хозяине, для снижения численности и вредоносности патогена.

Положения выносимые на защиту хорошо обоснованы результатами исследования.

1. На протяжении всего жизненного цикла на поверхности тегумента *A. tenuirostris* отсутствуют микроворсинки. Поэтому циста в промежуточном хозяине формируется за счёт инвагинатов наружной плазматической мембраны мигрирующих из внутреннего слоя тегумента.

2. Фрагментация ядер тегумента на стадиях средней и поздней акантеллы в промежуточном хозяине неполная, с сохранением тонких мостиков между фрагментами.

3. Формирование оболочки оплодотворения, и начальные этапы дробления эмбрионов происходят еще в составе яйцевых шаров (аналоги яичников) в полости тела половозрелой самки.

4. Оболочки половых органов скребней образованы модифицированной мышечной тканью с отчетливой клеточной организацией. Отвергнута гипотеза симпластической организации этих органов. Из этого положения диссертанта следует, что в отсутствие эпителиев и соединительной ткани у скребней эти функции берет на себя мышечная ткань паразита.

Степень достоверности результатов подтверждается тщательностью работы и крайне осторожными выводами, приближенными к конкретному материалу (электронным фотографиям), без сложных теоретических предположений. Результаты опубликованы в 7 статьях журналов списка ВАК, что значит, что они прошли тщательное рецензирование. Материалы диссертации прошли апробацию в виде докладов на 8 научных конференциях.

Личный вклад соискателя. В 6 из 7 опубликованных статей Давыденко была первым и главным автором. Диссертант осуществлял всю подготовку материала и его анализ. Также все необходимые лабораторные исследования в промежуточном хозяине сделаны лично автором. Автор сама участвовала в экспедициях где собирала материал методами отлова и вскрытия рыб.

Глава 1 Морфология и развитие скребней (обзор литературы) состоит из 6 разделов, где подробно и добросовестно описаны литературные сведения по основным системам органов скребней: 1.1 Тегумент и субтегументальная мускулатура; 1.2 Нервная система; 1.3 Женская половая система; 1.4 Мужская половая система; 1.5 Жизненный цикл; 1.6 Заключительные замечания к обзору.

Хотя в первом разделе даны сведения о классификации типа скребней из 4 классов, далее не раскрыта подробно их морфологическая диагностика и обоснование такого деления. Указано только что важным критерием служит количество и расположение цементных желез самцов, их структура ядер и число протоков. В главе дано весьма яркое и подробное описание – обзор разнообразия структур и систем скребней в целом с упоминанием видов и ссылок на публикации. Особо подробен раздел о тегументе и его производных – шипиков, лемнисков и микроворсинок. Важно, что автор подробно обсуждает роль отдельных слоев и структур тегумента в питании скребня и транспорте питательных веществ во внутренние ткани и полость тела. В разделе по нервной системе интересно описание генитальных ганглиев самца, а также апикального органа хоботка. В разделе о женской половой системе описан уникальный механизм распада яичников на яйцевые шары, который происходит на разных стадиях у разных видов. Обзор жизненного цикла с обсуждением единой терминологии для стадий личинок – акантор, акантелла, цистакант - подробен и интересен. В заключительных замечаниях диссертант четко обозначила проблемные точки знаний о морфологии скребней, которые решала в своем исследовании: морфогенез личинок и их стадии, формирование цисты и структурные источники её слоев.

Глава 2. Характеристика скребня *Acanthocephalus tenuirostris* – самая короткая глава из 2 страниц с кратким описанием вида, историей его классификации (без строгой синонимии), мест обнаружения на Дальнем Востоке, дефинитивных хозяевах и единственном виде промежуточного хозяина, патогенном значении вида скребня для рыб и удобстве этого скребня как модельного объекта лабораторных исследований.

Вопрос: для типа скребней использовано название *Acanthocephales*, в современной литературе чаще используется *Acanthocephala*. Объясните, что Вы считаете правильным.

Глава 3. Материал и методика. Для получения материала в промежуточном хозяине было проведено 6 опытов, получено около 200 личинок-акантелл из которых лишь десятая часть к 60-65 сут заражения становились цистакантами, что совершенно достаточно для исследования. Опыты детально описаны, как и методики подготовки материалов для световой микроскопии (срезы) и ТЭМ.

Глава 4. Результаты – самая важная, фактологическая, состоит из 8 разделов: 4.1 Строение тегумента и субтегументальной мускулатуры взрослых *Acanthocephalus tenuirostris*; 4.2 Органы

пресомы взрослых *Acanthocephalus tenuirostris*; 4.3 Женская половая система взрослых *Acanthocephalus tenuirostris*; 4.4 Мужская половая система взрослых *Acanthocephalus tenuirostris*; 4.5 Тканевая организация ранней акантеллы; 4.6 Тканевая организация средней акантеллы; 4.7 Тканевая организация поздней акантеллы; 4.8 Тканевая организация цистаканта.

Глава весьма логично начинается с описания общего плана строения и ультраструктур половозрелых самца и самки, поскольку морфологические ряды ранее не исследованных структур личинок должны заканчиваться уже описанными ранее систематиками органами половозрелого скребня. Наглядно и доказательно обоснована номенклатура слоев тегумента: поперечно-полосатый, войлочно-волоконистый, радиально-волоконистый и трубчатый. В целом исследование тегумента в его морфогенезе у личинок в промежуточном хозяине – один из ключевых аспектов диссертации. Особое внимание уделено структуре фрагментов ядер и связи между фрагментами в виде перемычек. Описано различие сократимой и цитоплазматической зон у клеток наружного слоя кольцевых мышц под тегументом и внутреннего слоя продольных мышц. Столь же подробно описана ультраструктура мышц хоботкового влагалища, где диссертант обнаружила два различных слоя, а также лемнисков пресомы. В половой системе самок автор подробно исследовала яйцевые шары в полости тела, заменяющие яичники, в них выявлены соматический и оогониальный (или герминативный) компоненты, которые обосновано обозначены как симпласт, а не синцитий. Поскольку диссертант обнаружила в яйцевых шарах оплодотворенные зиготы и эмбрионы на разных стадиях, то подробно рассматривается процесс оплодотворения с образованием оболочки зиготы и начальных этапов дробления, что несомненно является заслугой автора. Поскольку общепринятое мнение таково, что развитие эмбрионов происходит за пределами яйцевых шаров в половых путях самки. Ультраструктура этих путей также хорошо иллюстрирована - маточный колокол (играющий роль клапана для остановки незрелых яиц), яйцеводы, матка и влагалище. Выявлено, что половые пути двуслойные: наружный слой (обращенный в полость тела) – сократимый из мышечных волокон, а внутренний (обращенный в полость яйцевода) – цитоплазматический. Столь же подробно описана ультраструктура мужской половой системы и сперматозоидов и связей половых путей самца с внешним тегументом.

При анализе структур личиночных стадий – акантора, акантеллы и цистаканта автор, экспериментировавшая с промежуточным хозяином выделила три последовательные стадии акантеллы с разными ультраструктурными характеристиками: ранняя, средняя и поздняя акантелла. Подробно рассматривается морфогенез этих стадий на уровне ультраструктур с особым вниманием к тегументу. Прослежено формирование хоботка и его крючков а также ганглиев у средней акантеллы, семенников и цементных желез.

Особое внимание диссертант уделила формированию цисты у личинок-акантелл как маркеру отношений хозяин-паразит. У ранней акантеллы это аморфный материал снаружи тегумента, у средней это два слоя – наружный аморфный и внутренний плотный, а также

концентрические мембраны вблизи тегумента. У поздней акантеллы полностью сформированная циста из 2 слоев которые автор логично выводит из инвагинатов наружной мембраны тегумента. На этой стадии также сформированы семенники, цементные железы, бурса и копулятивный орган самца, а также апикальный орган хоботка. На стадии цистаканта к двуслойной цисте добавляется гликокаликс над полностью сформированным тегументом из 4 слоев. У самок цистакантов полностью сформированы яйцевые шары (функциональный аналог яичников) с двумя синцитиями – соматическим и герминативным, и идет процесс обособления ооцитов из последнего.

Глава 5. Обсуждение полученных результатов обобщает полученные сведения и содержит ценные соображения по биологическому смыслу морфологических преобразований в онтогенезе скребней: изменениям в тегументе с исчезновением везикулярного слоя, фрагментации ядер с сохранением мостиков, роли трубчатого слоя тегумента для транспорта питательных веществ, трактовке синцитий или симпласт для различных тканей скребня. Отдельное обсуждение сделано для места оплодотворения – в полости тела или на поверхности яйцевых шаров, последний факт, установленный диссертантом – это новая биологическая особенность у данного вида, как и соображения автора о роли кортикальных гранул ооцита для предотвращения полиспермии, т.е. двойного оплодотворения. Еще одна находка – начало дробления эмбриона еще в составе яйцевых шаров. Автор также продвигает идею о роли мышечной ткани (именно её сократимой части) в синтезе межклеточных элементов – аналоге соединительной ткани, которой нет у скребней. Автор расширяет эту функцию от субтегументальных мышц до всех мышечных оболочек органов скребня, включая оболочки органов половой системы. Важную часть в главе составляет обсуждение функциональной связи цисты и гликокаликса у цистаканта. Диссертант считает важным одновременное сбрасывание цисты и появляющегося лишь на стадии цистоканта гликокаликса. Роль цисты и гликокаликса под цистой автор логично характеризует как барьеры для иммунитета хозяина, а появление гликокаликса у поздней личинки – как активизация секреторной деятельности тегумента, совпадающей с увеличением везикулярного слоя последнего непосредственно под гликокаликсом. После сбрасывания цисты и гликокаликса формируется половозрелый скребень у которого везикулярный слой тегумента уже отсутствует. Это наглядно и логично, поэтому диссертант прав в интерпретации сравнения ультраструктуры покровов личинки и взрослого скребня.

Выводы (7) соответствуют положениям выносимым на защиту: фрагментация ядер тегумента, оплодотворение на поверхности яйцевых шаров, роль мышечной ткани в формировании оболочек и межклеточных образований, формирование цисты в промежуточном хозяине без участия микроворсинок тегумента за счет инвагинатов мигрирующих из его внутреннего слоя, сбрасывание слоя гликокаликса у цистоканта одновременно с цистой.

Первый вывод о сходстве покровов (структуры тегумента) у исследованного вида с представителями не своего класса (*Palaeacanthocephala*), а класса *Eoacanthocephala* нуждается в

