

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Бабкина Игоря Викторовича «Молекулярная эволюция вирусов с РНК- и ДНК- геномами: астровирус человека, бокапарвовирус и ортопоксвирусы.» , представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

### **Актуальность темы.**

Мир вирусов самодостаточен, изменчив и мало изучен. Изменчивость вирусов связана с их молекулярной эволюцией, которая представляет собой накопление изменений в геноме вирусной популяции. .

Молекулярная эволюция вирусов представляет собой накопление изменений в геноме вирусной популяции. Сначала в геноме возникают мутации, к числу которых относятся нуклеотидные замены, дупликации, делеции, инсерции и рекомбинации. Далее мутации могут закрепиться в популяции под действием отбора или элиминироваться. Естественный отбор обеспечивает дифференциальное различие между вирусами, несущими мутации, с точки зрения вероятности их выживания и размножения. Различия в скорости накопления мутаций определяют и возможную временную шкалу изучения эволюции вирусов. Высокая скорость накопления замен в геноме ряда вирусов не позволяет провести изучение их молекулярной эволюции на протяжении длительного периода времени. Скорость изменчивости РНК-содержащих вирусов составляет примерно  $10^{-2} - 10^{-4}$  нуклеотидных замен на сайт в год , что было показано ранее. Следовательно, при построении эволюционных деревьев на глубину нескольких десятков или сотен лет достигается насыщение генома нуклеотидными заменами, и дальнейшая аппроксимация становится невозможной. Для многих ДНК-содержащих вирусов возможны построения на глубину нескольких тысяч или даже десятков тысяч лет. Изучение вариативности вирусных геномов важно для оценки эпидемического потенциала возникающих вариантов вируса и для решения научной проблемы – прогнозирования появления новых инфекционных агентов, которые неизбежно будут возникать в ближайшем будущем. Стратегия молекулярной эволюции вирусов, принадлежащим к разным таксонам, может значительно варьировать. Для многих вирусов рекомбинация играет важную роль в эволюционной истории, а в случае сегментированных вирусов на первый план выходит реассортация. Однако для этих механизмов определяющим фактором является заражение клетки двумя и более вирусами. Это возможно при значительном превышении количества вируса над количеством чувствительных клеток. Вирусы могут эволюционировать как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения их геномов. В ряде случаев эволюция

вируса идет в направлении увеличения патогенности, например, при широком использовании противовирусных препаратов и вакцин, в других случаях эволюция приводит к аттенуации вируса, например, в случае обширных эпидемий, приводящих к значительному снижению популяции чувствительных хозяев. Стратегия эволюции вируса зависит от множества факторов – ошибочности его репликации, организации генома, размера вирусной популяции, численности популяции хозяев, копийности вируса, его специфичности, степени летальности вызываемого заболевания, контагиозности вируса, его устойчивости в окружающей среде и т.д. На примере продолжающейся в настоящее время вспышки оспы обезьян можно судить о важности исследования эволюции ортопоксвирусов. В течение долгого времени фиксировались только случаи зоонозного заражения людей, и не отмечались факты передачи вируса между людьми, но в последние 20-30 лет были обнаружены события передачи вируса между людьми со все более увеличивавшейся инфекционной цепочкой. Isidro J и соавторами было показано, что молекулярная эволюция современных вирусов оспы обезьян демонстрирует значительно возросшую скорость накопления мутаций и, как следствие, его эффективную передачу от человека к человеку. Современная вспышка обусловлена западноафриканским генотипом вируса оспы обезьян, вызывающим заболевание с низкой летальностью, однако имеются данные об эволюции высоко опасного центральноафриканского вируса в сторону большей контагиозности для человека. Изучение закономерностей молекулярной эволюции вирусов с различными типами геномов актуально, интересно и важно.

### **Структура и содержание работы.**

Диссертационная работа Бабкина И.В. представлена в виде доклада и сопровождающего его автореферата. В связи с этим обзор литературы и подробное описание методов как таковые отсутствуют. Методы, которыми пользовался соискатель, подробно описаны в публикациях по теме диссертации. Автореферат хорошо структурирован и состоит из общей характеристики работы, содержания работы, выводов и списка публикаций по теме диссертации. Автореферат изложен на 42 страницах, иллюстрирован 14 рисунками. В общей характеристики работы автором развернуто дано описание актуальности проблемы. При ознакомлении с разделом видно, что автор владеет вопросом, хорошо обосновывает актуальность и необходимость исследования. С актуальностью проблемы логично связаны цель и задачи исследования, которые были достигнуты и нашли свое отражение в заключении и выводах. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования полностью основаны на представленных в автореферате и публикациях материалах и имеют несомненное

фундаментальное значение. Основные положения, выносимые на защиту взаимосвязаны с поставленными задачами и подкреплены данными, изложенными в автореферате и публикациях. Содержание работы имеет три подраздела: 1. Молекулярная эволюция астровирусов с +РНК-геномом; 2. Молекулярная эволюция бокапарвовирусов, характеризующихся короткими одноцепочечными ДНК-геномами; 3. Молекулярная эволюция ортопоксвирусов с протяженными двухцепочечными ДНК-геномами. Разделы и представленные в них материалы полностью соответствуют основной цели работы - изучению закономерностей молекулярной эволюции вирусов с различными типами геномов на примере астровирусов (РНК-геном), бокапарвовирусов (одноцепочечный короткий ДНК-геном) и ортопоксвирусов (двухцепочечный протяженный ДНК-геном). Работа написана хорошим языком.

#### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов.**

При подготовке работы автором определены полные последовательности геномов ранее не изученных субгенотипов астровируса человека 2а и 2с, трех изолятов генотипа 3, двух изолятов редкого генотипа 4 и одного изолята 6-го генотипа. Изучена эволюционная история этих вирусов. Впервые определена скорость накопления мутаций в геноме астровируса человека. Показано широкое распространение рекомбинаций в эволюционной истории этих вирусов.

Определены полные геномы российских изолятов бокапарвовируса человека, имеющего короткий одноцепочечный ДНК геном: одного изолята HBoV1, двух изолятов HBoV2 и двух изолятов редкого генотипа HBoV4; секвенирован геном уникального изолята, возникшего в результате рекомбинации между генотипами HBoV3 и HBoV4.

Для бокапарвовирусов человека изучен механизм репликации и показано, что все генотипы бокапарвовируса человека формируют репликативные интермедиаты типа «голова-хвост», что свидетельствует о репликации по типу «катящегося кольца». Для редко встречающегося генотипа 4 это показано впервые. Такой тип репликации кардинально отличает бокапарвовирусы человека от механизма репликации других парвовирусов по типу «катящейся шпильки».

Впервые установлено, что в отличие от других парвовирусов, в геноме бокапарвовирусов присутствует только одна горячая точка рекомбинации, и предложен механизм преодоления иммунной системы хозяина этим вирусом путем рекомбинации распространенных изолятов бокапарвовирусов человека с редкими изолятами 4-ого генотипа.

Изучена эволюция современных бокапарвовирусов человека, рассчитана скорость изменчивости их геномов. На основе сравнительного филогенетического исследования геномов предложена гипотеза происхождения бокапарвовирусов человека от бокапарвовирусов приматов и впервые показано, что это произошло сравнительно недавно.

Изучена организация геномов различных ортопоксвирусов. Впервые были созданы методы видоспецифичной детекции четырех опасных для человека ортопоксвирусов на основе ПЦР.

Впервые на основе бинарных таблиц данных ДПЦР-ПДРФ анализа полных геномов 66 штаммов вируса натуральной оспы и гипотезы простых молекулярных часов оценена скорость накопления мутаций в геноме вирусов натуральной оспы. Дальнейшее накопление в базах данных большого количества полногеномных последовательностей ортопоксвирусов, полученных, в том числе, в результате палеогеномных исследований, позволило с использованием современных компьютерных методов уточнить расчёты скорости изменчивости геномов и впервые реконструировать хронологию происхождения различных видов ортопоксвирусов

Проведенные исследования позволили провести анализ молекулярной эволюции вирусов с различной организацией геномов: астровируса человека, бокапарвовирусов человека и различных ортопоксвирусов.

Полученные данные о нуклеотидных последовательностях астровируса человека, бокапарвовирусов человека и различных ортопоксвирусов, включая вирус натуральной оспы, являются базисом для разработки различных методов детекции этих вирусов, для разработки современных вакцин и противовирусных препаратов. Изучение распространенности различных генотипов вирусов в ряде случаев может быть полезно для прогнозирования течения инфекционных заболеваний, например, в случае бокапарвовирусов человека и ортопоксвирусов.

Все полученные нуклеотидные последовательности вирусных геномов депонированы в международной базе данных GenBank.

Полученные при выполнении работы результаты имеют несомненную практическую значимость – они могут быть применены в поиске противовирусных препаратов.

Несомненен вклад в обеспечение безопасности работ с патогенами – создана коллекция ампликонов вируса натуральной оспы, содержащих перекрывающиеся фрагменты ДНК полных геномов этого вируса. Впервые разработаны ПЦР методы детекции и видоспецифичной идентификации вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов, опасных для человека.

### **Степень достоверности и обоснованность результатов исследования.**

Достоверность полученных результатов исследований подтверждается большим объемом полученных результатов, полученных с использованием современных молекулярно-генетических методов, адекватных поставленной цели и задачам. Достоверность обработки полученных результатов не вызывает сомнений. Полученные результаты отражены в 25 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus; патенте на изобретение РФ. Результаты работы были представлены на 18 международных и российских научных конференций.

### **Замечания.**

В разделе работы «Молекулярная эволюция астровирусов с +РНК-геномом», отмечено: «механизмы молекулярной эволюции различных генотипов астровируса человека различны: все известные последовательности астровируса человека 2, 3, 4, 5, 7 и 8-го генотипа возникли в результате межштаммовой рекомбинации, в то время как большинство последовательностей 1-го и все последовательности 6-го генотипов не демонстрируют достоверных признаков рекомбинации». Сделав такое заключение, автор не предложил механизмов, которые могли бы объяснить такие различия молекулярной эволюции близкородственных генотипов астровируса человека.

### **Заключение.**

На основании всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа Бабкина Игоря Викторовича «Молекулярная эволюция вирусов с РНК- и ДНК- геномами: астровирус человека. бокапаровирус и ортопоксвирусы.» является завершенным цельным научным исследованием, которое не только содержит информацию об особенностях молекулярной эволюции астровирусов и бокапаровирусов человека, но и молекулярную эволюцию ортопоксвирусов, что значительно расширяет понимание эволюции вирусов. Работа соответствует требованиям и критериям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении научных степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора наук. Диссертационная работа в виде научного доклада оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а сам Бабкин Игорь

Викторович, безусловно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук, профессор  
старший научный сотрудник  
Федерального бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт  
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,

Игнатьев Георгий Михайлович

Почтовый адрес: 105064, Российская Федерация, г. Москва, Малый Казенный переулок  
дом 5а

e-mail: marburgman@mail.ru

Подпись д.м.н., профессора Г.М. Игнатьева заверяю

Директор ФБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.  
Мечникова», доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН



Свитич Оксана Анатольевна