

ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу

Бабкина Игоря Викторовича

**«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ С РНК- И ДНК-
ГЕНОМАМИ: АСТРОВИРУС ЧЕЛОВЕКА, БОКАПАРВОВИРУСЫ И
ОРТОПОКСВИРУСЫ»**

представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность исследования

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на исследование ключевых проблем организации вирусных геномов и молекулярной эволюции РНК- и ДНК-содержащих вирусов с различными типами геномов. В современной таксономии вирусов описано чуть более 10000 видов вирусов, однако основная масса вирусных агентов еще ожидает своего открытия и изучения. Для подавляющего числа живых организмов, как клеточных, так многоклеточных, остаются неизвестными специфические для них вирусы. Экспертные оценки говорят, что возможное количество различных вирусных агентов в биосфере планеты может достигать несколько десятков миллионов видов. Это хорошо иллюстрирует ограниченность наших знаний в области познания царства вирусов.

Вопросы геномики и эволюции вирусов чрезвычайно сложны. Первые попытки описать пути возникновения и механизмы реализации геномной информации РНК- и ДНК-содержащих вирусов только подчеркивают несовершенство наших знаний в этой области. Сейчас известно не менее 7

различных механизмов реализации вирусной геномной информации, тогда как клеточные формы жизни используют только один классический механизм реализации геномной информации. Причем важно отметить, что для вирусов характерна высокая скорость эволюции, что находит отражение в изменениях вирусных геномов. Так скорость изменчивости РНК-содержащих вирусов достаточно высока и обычно составляет примерно 10^{-2} – 10^{-4} нуклеотидных замен на сайт в год. ДНК-содержащие вирусы более консервативны, но и их изменчивость достаточно высока.

Изучение вариабельности вирусных геномов принципиально важно для оценки эпидемического потенциала новых возникающих вариантов вирусов и для прогнозирования появления новых инфекционных агентов патогенных для культурных растений, домашних животных и человека. Стратегия молекулярной эволюции вирусов, принадлежащим к разным таксонам, может значительно варьировать. Для многих вирусов накопление точечных мутаций и рекомбинация играет важную роль в эволюционной истории, а в случае сегментированных вирусов на первый план выходит реассортация. Вирусы могут эволюционировать как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения их геномов. Особенности эволюции РНК- и ДНК-содержащих вирусов зависят от множества факторов – ошибочности репликации нуклеиновых кислот, типа организации вирусного генома, размера вирусной популяции, размера популяции хозяев, копийности вируса, его специфичности, степени патогенности и уровня летальности вирусного заболевания, контагиозности вирусного агента, его устойчивости в окружающей среде и т.д.

Именно эти соображения и определяют актуальность, новизну и значимость изучаемых в диссертационной работе проблем особенностей организации вирусных геномов, их молекулярной эволюции в отношении вирусов с различными типами геномов на примере астровирусов (РНК-геном), бокапарвовирусов (одноцепочечный короткий ДНК-геном) и

ортопоксвирусов (двухцепочечный протяженный ДНК-геном). Совокупность полученных диссертантом результатов по геномике этих вирусов фактически закрыло дефицит наших знаний в этой области. Эти знания станут основой для развития генетической диагностики, создания новых противовирусных препаратов и средств профилактики, включая новые поколения вакцин. Совершенно очевидно, что именно это может позволить сохранить здоровье и жизнь многим миллионам людей.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Бабкина И.В. представлена в виде научного доклада и сопровождающего ее автореферата. В связи с этим обзор литературы и подробное описание экспериментальных методов в диссертационной работе отсутствуют. Фактически эти разделы должным образом описаны в соответствующих публикациях автора по теме диссертации. Автореферат хорошо структурирован и состоит из общей характеристики работы, описания содержания работы, заключения, выводов и списка публикаций. Автореферат изложен на 40 страницах, проиллюстрирован 14 рисунками.

В первой части работы диссертант обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, обосновывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, определяет положения, выносимые на защиту, описывает личный вклад автора и апробацию основных результатов.

Так целью диссертационной работы было решение научной проблемы, связанной с изучением основных закономерностей молекулярной эволюции вирусов с различными типами геномов на примере астровирусов (РНК-геном), бокапарвовирусов (одноцепочечный короткий ДНК-геном) и ортопоксвирусов (двухцепочечный протяженный ДНК-геном).

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные проблемы:

- Изучение особенностей молекулярной эволюции астровирусов человека с учетом вклада возможной рекомбинации геномов в эволюцию астровирусов человека и реконструкция эволюционной хронологии современных генотипов астровирусов человека.
- Выявление особенностей молекулярной эволюции бокапарвовирусов и механизмов репликации бокапарвовирусов человека, особенностей рекомбинации и эволюционных взаимосвязей бокапарвовирусов человека и приматов, оценки скорости молекулярной эволюции бокапарвовирусов.
- Исследование молекулярных особенностей геномной организации ортопоксвирусов для выявления особенностей организации геномов ортопоксвирусов, определению скорости молекулярной эволюции ортопоксвирусов и реконструирование эволюционной хронологии вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов.

Собственно, описание работы разбито на три основных части. Первая часть посвящена изучению основных закономерностей строения геномов и молекулярной эволюции астровирусов (РНК-геном). Вторая часть работы описывает геномику бокапарвовирусов (одноцепочечный короткий ДНК-геном) и в третьей части работы дано описание исследований геномов и молекулярной эволюции ортопоксвирусов (двухцепочечный протяженный ДНК-геном). Результаты обсуждаются в заключении и формируются основные выводы работы.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Решение проблемы в понимании механизмов молекулярной эволюции астровирусов человека. Установлено, что механизмы молекулярной

эволюции различных генотипов астровируса человека различны, и очень часто связаны с межштаммовой рекомбинацией астровирусов человека 2, 3, 4, 5, 7 и 8-го генотипов, причем для 1-го и 6-го генотипов не обнаружено достоверных признаков рекомбинации. Обнаружено, что средняя скорость накопления мутаций в геноме астровируса человека составляет 3×10^{-3} замен на сайт в год, что позволило определить, что современные генотипы астровируса человека разделились приблизительно 700 лет назад.

- Выяснено, что проблемы механизмов молекулярной эволюции бокапарвовирусов взаимосвязаны с вторичными структурами концевых некодирующих районов генома и их консерватизм решает проблемы регуляции репликации и транскрипции бокапарвовирусов человека. В геноме бокапарвовирусов человека обнаружена горячая точка рекомбинации, расположенная между областями с аномально низким и аномально высоким содержанием GC. Анализ всех последовательностей бокапарвовирусов приматов показал, что бокапарвовирусы человека, по всей вероятности, имеют зоонозное происхождение. Причем современные генотипы бокапарвовирусов человека разошлись сравнительно недавно, около 60-300 лет назад, а средняя скорость накопления мутаций в геноме бокапарвовирусов приматов составляет 9×10^{-4} нуклеотидных замен на сайт в год.
- Изучены проблемы структурной организации геномов ортопоксвирусов и их молекулярная эволюция. Это позволило создать методы быстрой видоспецифичной идентификации четырех патогенных для человека видов ортопоксвирусов. Обнаружено, что средняя скорость накопления замен в геноме вируса натуральной оспы составляет $4,4 \times 10^{-6}$ нуклеотидных замен на сайт в год. Это позволило определить, что вирус натуральной оспы предположительно произошел около 270 (13-494) г. нашей эры. При

этом вирус оспы обезьян предположительно появился в 15 веке до н.э., а его западноафриканский генотип ВОО датируется 15 веком н.э. Причем для изученных ортопоксвирусов характерна независимая эволюция в различных географических регионах.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Бабкина Игоря Викторовича является самостоятельным законченным исследованием, посвященным решению проблем установления закономерностей молекулярной эволюции вирусов с различными типами геномов и относящихся к различным таксономическим группам вирусных агентов на примере астровирусов (РНК-геном), бокапарвовирусов (одноцепочечный короткий ДНК-геном) и ортопоксвирусов (двухцепочечный протяженный ДНК-геном). В целом поставленные в работе задачи решены, выносимые на защиту положения хорошо аргументированы. Диссертантом проведена большая и объёмная работа, ее результаты должным образом опубликованы и отражены в научном докладе и автореферате. Предложены перспективы дальнейшего развития исследований по исследованным проблемам.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-биологических методов исследования в сочетании с современными биоинформатическими методами для анализа полученных массивов последовательностей последовательностей вирусных геномов. Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам.

Полученные результаты были апробированы на ряде российских и международных конференций и конгрессах. По теме диссертации

опубликовано 25 научных статей в международных высокорейтинговых журналах индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и один патент РФ. Все полученные нуклеотидные последовательности вирусных геномов депонированы в международной базе данных GenBank и доступны для всех исследователей.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Работа выполнена в очень актуальной области исследований и вносит очень существенный вклад в понимание основных закономерностей молекулярной эволюции вирусов с различными типами геномов: РНК-геном, одноцепочечный короткий ДНК-геном и двухцепочечный протяженный ДНК-геном. Научная новизна и практическая значимость полученных результатов не вызывает сомнений. Это утверждение и высокая научно-практическая значимость полученных результатов подтверждается уровнем цитирования некоторых основных публикаций по теме диссертационной работы в базах данных WoS и Scopus. Так публикации №1, 2, 21 и 22 (стр. 38 и 40) цитируются от 8 до 19 раз только в течение неполного 2022 года. Их востребованность в период глобальной вспышки оспы обезьян очень высока. Оценить подобным образом значимость, определённых диссертантом, нуклеотидных последовательностей ортопоксвирусов затруднительно из-за отсутствия системы регистрации использования (реферирования) этих последовательностей. Однако вполне понятно, что эти нуклеотидные последовательности были широко использованы для конструирования тест систем для генетической диагностики оспы обезьян в современных условиях.

Замечания по диссертационной работе

Представленная работа не лишена определенных недостатков. Замечания, которые можно сделать, немногочисленны и во многом вызваны формой

представления диссертационной работы в виде научного доклада, неизбежно менее детального, чем диссертационная работа традиционного вида.

К ним следует отнести:

- Диссертант пишет, что все полученные нуклеотидные последовательности вирусных геномов депонированы в международной базе данных GenBank (стр. 7 автореферата). Представляется, что это далеко не полное описание проделанной работы по расшифровке вирусных последовательностей, включенных в диссертационную работу. Обращение в эту базу данных показывает, что диссертант является автором более 1470 нуклеотидных и 4170 аминокислотных последовательностей. Причем 48 наборов последовательностей классифицируются как «PopSet». Это огромный массив данных о расшифрованных вирусных последовательностях, связанных с диссертационной работой. Важно отметить, что процедура депонирования предусматривает обязательную экспертизу последовательностей перед их опубликованием. Чуть более подробное описание этого массива опубликованных и доступных всем исследователям данных существенно бы упростило понимание достоверности, новизны и научно-практической значимости полученных результатов.
- На страницах 9, 13 и 21 автореферата дана очень краткая таксономическая характеристика исследуемых групп вирусов. В 2022 году опубликована новая таксономия вирусов, которая предусматривает более сложную таксономическую иерархию вирусных агентов. Основой новой таксономии являются геномные последовательности вирусов и более полное описание современной таксономии астровирусов, бокапарвовирусов и ортопоксвирусов, без сомнения, упростило бы понимание эволюционной изменчивости этих

вирусов, и привнесло новые аспекты в понимании целей и задач исследования.

- Ряд рисунков, например - рис.14, стр. 32, безусловно, выиграл бы от внесения номеров GenBank для использованных для построения дендрограммы последовательностей.

Эти недостатки не снижают научной значимости диссертационной работы и, оценивая работу в целом, можно сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Высокий уровень международного цитирования основных публикаций диссертационной работы дополнительно подтверждает значимость и востребованность диссертационной работы.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для решения проблем молекулярной эволюции РНК- и ДНК-содержащих вирусов, для развития дальнейших исследований в области исследования структуры и функции вирусных геномов, что может существенно расширить наши знания и представления в этой области науки.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Бабкина И.В. «Молекулярная эволюция вирусов с РНК- и ДНК-геномами: астровирус человека, бокапарвовирусы и ортопоксвирусы», дает все основания считать, что диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.3 – молекулярной биология и полностью соответствует требованиям критериев пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте

химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических 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. Автор диссертации, Бабкин Игорь Викторович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Заведующий отделом
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор



Локтев Валерий Борисович

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Роспотребнадзора.
Адрес: 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Тел: (383) 363-74-10
Факс: (383) 363-47-14
Эл. адрес: vector@vector.nsc.ru

Подпись Локтева Валерия Борисовича заверяю:

Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
к.б.н.



Т.С. Непомнящих