

ОТЗЫВ

официального оппонента Платонова Александра Евгеньевича
на диссертационную работу Ковалева Сергея Юрьевича
**«Происхождение, распространение и эволюция вируса клещевого
энцефалита»,**

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.02 Вирусология

Клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), вызываемый вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), - одна из наиболее распространенных и тяжелых природно-очаговых инфекций на территории России. В среднем смертность от КВЭ превышает смертность от какой-либо другой природно-очаговой инфекции в РФ; по нашим оценкам КВЭ занимает также первое место по вызываемым им экономическим потерям и второе место по социально-медицинскому ущербу (утраченным годам полноценной жизни - DALY). Дополнительную значимость исследованиям КВЭ и ВКЭ придает три обстоятельства. Во-первых, ученые и специалисты СССР и РФ исторически всегда были на первых ролях изучения ВКЭ и борьбы с КВЭ и было бы жаль утратить эту позицию. Во-вторых, в отличие от многих других природно-очаговых инфекций, наибольшее число случаев КВЭ регистрируется именно в России, то есть борьба с КВЭ является в первую очередь российской проблемой, в решении которой менее заинтересованы другие развитые страны. В третьих, эпидемиология КВЭ в РФ уникальна: именно на территории РФ встречались и встречаются все три основных генотипа (субтипа) ВКЭ и в настоящий момент преобладает именно "основной евразийский" генотип ВКЭ, традиционно называемый сибирским. Поэтому **любые профессиональные исследования ВКЭ актуальны**, в том числе и рассматриваемая диссертационная работа, цель которой сформулирована автором следующим образом:

"разработать систему классификации вируса клещевого энцефалита в пределах субтипа и на основе комплексного подхода предложить гипотезу о времени происхождения, путях распространения и механизмах эволюции ВКЭ".

При оценке диссертации надо преодолеть некоторый разрыв между разнообразными и бесспорными фактическими результатами, интересными и побуждающими к дискуссии способами их анализа и интерпретации, и недостаточно взвешенным и (само)критичным стилем их представления. При этом диссертация написана четко, последовательно, достаточно глубоко и содержит всю необходимую информацию для понимания сути работы. В частности, к несомненным достоинствам работы следует отнести наличие 10 приложений, содержащих практически все "первичные данные", полученные в ходе исследования. В этой связи хотелось бы в отзыве не просто формально отразить структуру и содержание диссертационного текста (которые ясны из самого текста), но обсудить работу по существу.

Диссертация имеет блочную структуру. Фактическим ядром первого блока является определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E в 454 н.п. для 500 штаммов ВКЭ сибирского и дальневосточного субтипов. Интерпретирующей оболочкой является рассмотрение сходства и различия этих последовательностей (чаще - соответствующих аминокислотных последовательностей) в контексте места и времени обнаружения конкретного изолята. Для анализа привлечены не только собственные данные, но и вся доступная информация из базы данных GenBank. При этом последовательно применяется язык описания генетического разнообразия популяции ВКЭ, названный автором "кластеронным подходом". Результаты представлены и обсуждены в

разделах 3.2, 3.3, 4.1 и 4.2, в том числе и в аспекте практического применения "кластерного подхода" для мониторинга изменений в локальных или географически распространенных популяциях ВКЭ.

Фактическим ядром второго блока было проведение ПЦР-РВ с праймерами и зондами к митохондриальному гену *cox1* и ядерному внутреннему транскрибируемому спейсеру ITS2 между 5.8S и 28S рРНК иксодовых клещей. Исследовано ДНК 783 взрослых особей клещей видов *I. persulcatus* или *I. pavlovskyi*, собранных в Томской области (судя по всему, без дифференциации по видам классическими энтомологическими методами, упоминание о такой дифференциации в работе отсутствует). С помощью аналогичного ПЦР-подхода было изучено 265 нимф и имаго клещей видов *I. ricinus* и *I. persulcatus*, собранных в зоне их симпатрии на территории Эстонии. В части случаев результаты ПЦР-РВ подтверждены клонированием и секвенированием соответствующего участка генома. При этом обнаружение в индивидуальном образце ДНК используемых маркеров ядерной ДНК (ITS2) двух видов трактовалось автором как свидетельство обнаружения межвидового гибрида. Противоречие между предполагаемой видовой принадлежностью маркера митохондриального гена и ядерного маркера ITS2 трактовалось как свидетельство интрогрессии. Результаты представлены и обсуждены в разделе 4.4.

Надо отметить, что исследования по блокам 1 и 2 непосредственно с друг другом не связаны, т.е. не были ни характеризованы геномы клещей, в которых была найдена РНК ВКЭ, ни проведен поиск РНК ВКЭ у клещей известного "генотипа" или "геновида".

Из раздела 3.5. "Исследование генетической структуры клещей *I. persulcatus*" следует, что изучение 1-2 консервативных генов 28S рРНК и

12S рРНК недостаточно ни для построения филогенетического дерева клещей рода *Ixodes*, ни для характеристики генетического разнообразия субпопуляций клещей *I. persulcatus*. Результат ожидаемый, поскольку с подобными целями обычно используют схемы генотипирования по 5-10 генам. Однако и отрицательный результат полезен.

Раздел 3.1. "Разработка типоспецифической ОТ-ПЦР и молекулярно - эпидемиологическая характеристика популяций ВКЭ на территории Среднего Урала" посвящен технологически устаревшей и практически неудавшейся попытке разработки (гено)типоспецифической ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией. Чувствительность этого метода относительно видоспецифической ПЦР составила в руках соискателя всего 50%. Следует отметить, что высокочувствительная и (гено)типоспецифическая ОТ-ПЦР в режиме реального времени была разработана и испытана более 10 лет назад (см. ссылку 31. Л. Карань, С. Браславская, А. Мязин. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита на основе амплификационных технологий // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52. – № 6. – С. 17-22.) и с тех пор широко используется в вирусологических, клинических и эпидемиологических исследованиях.

Раздел 3.4. "Референсный штамм *Sofjin* вируса клещевого энцефалита и проблема его аутентичности" бесспорен по результатам и вытекающим из них рекомендациям (необходима генетическая паспортизации всех коллекционных штаммов, которая, по нашему мнению, должна проводиться методами полногеномного секвенирования «новых поколений»), но существенно выпадает из структуры диссертации в целом.

Наконец, в разделе 4.3. выдвигается оригинальная гипотеза "Квантовой эволюция вируса клещевого энцефалита", в случае верности которой сроки образования современных генотипов ВКЭ переносятся из "древности" (3000-1000 лет назад, как предполагают практически все остальные исследователи) в "современность" (600-300 лет назад) и легче ассоциируются с хозяйственной деятельностью человека, такой как освоение Сибири русскими.

По мнению оппонента, основное содержание работы сосредоточено в двух блоках, упомянутых первыми, и в гипотезе "квантовой эволюции"; следовательно, именно на их основе надо обсуждать такие характеристики диссертации, как научная новизна и методический уровень исследований, теоретическая и практическая значимость, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Результаты генетической характеристики 500 российских штаммов ВКЭ, безусловно, новы. Полнота их характеристики обусловлена компромиссом, типичным и вполне допустимым для времени выполнения работы: описан сравнительно малый участок генома ВКЭ (один прогон секвенирования по Сэнгеру, т.е. 5% генома), зато у представительной коллекции штаммов. При анализе данных большее внимание можно было бы уделить проблеме адекватности (и неадекватности) использования этого фрагмента: для флавивирусов хорошо известно, что филогенетические деревья, построенные по полному геному и по его фрагментам, не всегда конгруэнтны, а скорость эволюции различных генов различается в разы. "Кластеронный подход", активно продвигаемый автором, является вполне законным, но суррогатным языком описания. Фактически это старый известный способ формализованной классификации на основе небольшого счетного количества не взаимосвязанных дискретных признаков. В генетике микроорганизмов его применение иногда было методически

весьма оправдано (в методе мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) видов бактерий, которым свойственна высокая скорость рекомбинации геномов). Так, с помощью метода МЛСТ с 1997 г. уже изучены и описаны сотни тысяч штаммов десятков видов бактерий (<http://pubmlst.org/>). Однако даже в бактериологии осуществляется переход к полногеномному секвенированию и BigData анализу. Для вирусологии базовое достоинство "кластерного подхода" - это простота и наглядность, что отмечает и автор: "Необходимо отметить, что кластерный подход имеет свои ограничения и не может рассматриваться в качестве альтернативы филогенетическому анализу. Важным его достоинством является формализация наших представлений о структуре вирусных популяций и возможность использовать не только в научных исследованиях, но и службами эпидемиологического надзора", стр. 165. Строгое представление фактических данных (по типу "штаммы кластера 4А преимущественно выявляются в районах Ш и Щ") бесспорно, их интерпретация (по типу "потому что через районы Ш и Щ 300 лет назад проходила дорога из М в Т") - чрезвычайно любопытна и вдохновляюща, но не верифицируема и не фальсифицируема, то есть не полностью научна.

Результаты работы по второму блоку - генетическая характеристика сотен особей трех "российских" видов иксодовых клещей (переносчиков ВКЭ) с целью поиска их гибридов - также, безусловно, новы, масштабны и интересны. Однако проблема классификации близкородственных видов, особенно видов, представители которых способны к гибридизации - это проклятие энтомологии, в том числе современной "молекулярной" энтомологии. Международный (и российский) опыт показывает, что однозначная идентификация видовой принадлежности членистоногих на основе 1-2 генетических маркеров, как правило, невозможна - необходимо использование от 3 до 10 фрагментов генома, желательно связанных с

ключевыми аспектами физиологии и экологии конкретного вида. При этом доказательства надежности маркеров должно добываться интерактивно. "Кандидаты в маркеры" могут быть намечены на основе изучения представителей видов и их потенциальных гибридов, отловленных в природе (желательно в географически и экологически отличных биотопах). Затем необходимо получение по возможности "чистых линий", их скрещивание (обычно неоднократное) в лабораторных условиях и наблюдение за судьбой маркеров у потомков. Только затем можно вернуться к изучению природных популяций на основе отобранных надежных маркеров. В диссертации пройдена только часть этого пути. Поэтому вновь строгое представление фактических данных (по типу "в клещах, морфологически отнесенных к виду *I. ricinus*, маркеры А и Б и их комбинации выявляются с такой-то частотой, а клещах, морфологически отнесенных к виду *I. persulcatus*, маркеры А и Б и их комбинации выявляются с иной частотой) бесспорно и критически необходимо для дальнейших исследований, но их интерпретация (по типу "в зоне симпатрии *I. ricinus* и *I. persulcatus* выявляется до 25% гибридов этих видов, которые морфологически выглядят как *I. ricinus*") - чрезвычайно любопытна, но недостаточно достоверна.

Как и всякая радикально новая гипотеза, гипотеза "квантовой эволюция вируса клещевого энцефалита", согласно которой «новые генотипы ВКЭ вируса (отличающиеся на 15% генома и более) возникли за короткий по эволюционным меркам промежуток времени (предположительно, несколько лет)» стр. 180, противоречит существующим «стандартным» теоретическим положениям и не имеет прямых экспериментальных подтверждений, что вовсе не является недостатком. Проблема в том, что, в отличие от гипотез «первого порядка», базирующихся на фактах, она является гипотезой «второго порядка»,

базирующейся исключительно на других гипотезах и экспериментально не подтвержденных предположениях. Список этих предположений находится на стр. 174-182 диссертации и слишком длинен, чтобы его рассматривать в отзыве. Однако автор подчёркивает, что «предлагаемая гипотеза носит универсальный характер и дает возможность объяснить и спрогнозировать появление не только новых субтипов, но и новых видов арбовирусов, что, несомненно, может иметь важнейшее практическое значение», стр. 182. Можно надеяться, что «сообщество арбовирусологов» обратит внимание на данную гипотезу и в обозримом будущем найдет основания для ее подтверждения или опровержения. Идею «решающего эксперимента» формулирует сам автор: «если гипотеза верна, то в межвидовых гибридах клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* или в смешанных культурах их клеток в присутствии штамма ВКЭ-Сиб возможно зарегистрировать как возникновение нового вируса, так и его переходные формы», стр. 182. Технологически подобный эксперимент в настоящее время вполне может быть реализован.

Главное достоинство рассмотренных выше результатов заключается в то, что они, в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК к докторским диссертациям, задают новые, в будущем взаимосвязанные, направления экспериментальных исследований ВКЭ и клещей-переносчиков, а также, в теоретическом плане, привлекают внимание к роли хозяйственной деятельности человека в эпидемиологии ВКЭ.

К сожалению, в отзыве нельзя ограничиться стандартными оценками «научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы» и т.д. Некоторые выводы (1-й и 8-й) и «положения, выносимые на защиту» (2-е, 4-е и 5-е) выглядят недостаточно убедительными не потому, что на основании работы нельзя сделать

требуемого количества убедительных и важных выводов, а потому что текущая формулировка выводов избыточно "значима". Поскольку, как это обычно и бывает, «задачи» сформулированы под «выводы», 2-ю, 4-ю, 5-ю и, в особенности, 6-ю задачу нельзя признать полностью решенными. Характерно, что при этом **цель исследования можно с полным правом считать достигнутой**: система классификации ВКЭ в пределах субтипа (возможно, не идеальная) – **разработана**; гипотеза о времени происхождения, путях распространения и механизмах эволюции ВКЭ – **предложена**. Это расхождение отражает уже отмеченное расхождение между фактическими результатами исследования и способом их представления.

В результате образовался редкий парадокс: если читать работу критически, подвергая сомнению многие интерпретации своих и чужих результатов, предложенные автором, – **в масштабной и актуальной работе нет никаких недостатков** – ни технических, ни концептуальных. Если допустить, что потенциальный читатель поверит автору на слово, что «Предлагаемая концепция происхождения, распространения и эволюции ВКЭ дает возможность детально реконструировать эволюционную историю ВКЭ как во времени, так и пространстве. Данные, полученные в результате такой реконструкции, однозначно указывают на экономическую деятельность человека как основной фактор распространения ВКЭ на территории Евразии», стр. 43 автореферата и т.п. – работа изобилует недостатками.

В порядке научной дискуссии предыдущий абзац можно проиллюстрировать таким примером. Автор особое внимание уделяет "Проблеме «смены» генотипа вируса клещевого энцефалита на Среднем Урале за последние 60 лет.", раздел 3.3.2.

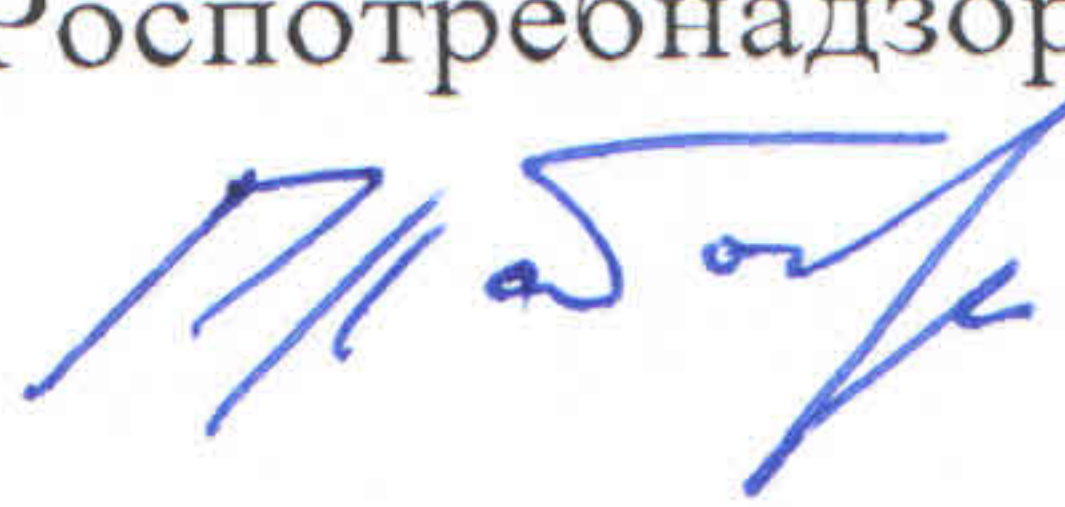
Проблема смены генотипа ВКЭ, которая произошла не только на Урале, но, насколько можно судить по имеющимся данным, практически по всему ареалу распространения *I. persulcatus* кроме собственно Дальнего Востока, основывается на простом, но неизвестном до начала работ по генотипированию ВКЭ в 2000-е годы, фактическом наблюдении. Подавляющее большинство штаммов ВКЭ, которые были выделены в СССР в 1940-х годах (здесь и далее имеются в виду только «недальневосточные» регионы европейской и азиатской частей РФ), принадлежали дальневосточному генотипу. Но были и единичные находки сибирского генотипа (первая по времени - штамм Volkhov-2-43 (#FJ214148) от военнослужащего в 1943, наиболее отдаленная – штамм 10 от клеща *I. ricinus* в 1955 в Австрии). Среди штаммов, выделенных с конца 50-х до начала 90-х годов (Л.С. Карань с соавторами в первую очередь были исследованы штаммы из Екатеринбургской, Курганской, Кемеровской, Омской областей, имеется также большой массив данных, полученных В.И. Злобиным с соавторами), представители сибирского и дальневосточного генотипа встречались приблизительно в равном количестве. В 21 веке штаммы сибирского генотипа составляют 95-100% находок, что убедительно подтверждено и диссертантом на примере Свердловской области. Наиболее естественная трактовка этого наблюдения, разделяемая большинством специалистов, и мной в том числе: и штаммы сибирского генотипа, и штаммы дальневосточного генотипа присутствовали в 20 веке в Евразии, но циркуляция сибирского генотипа была каким-то образом относительно «подавлена». С 1960-х годов штаммы сибирского генотипа получили по непонятным и уже трудно поддающимся изучению причинам преимущество и практически вытеснили штаммы дальневосточного генотипа. Чтобы оспорить эту трактовку автором используется несколько утверждений. 1) «Аргумент 4. Из рисунка 3.8 и приложения III видно, что расположение мест выделения штаммов ВКЭ-Дв

на территории Среднего Урала и Европейской части бывшего СССР носит мозаичный характер без очевидной связи между собой, что говорит в пользу их случайного появления» «в ходе реализации Программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц» с Дальнего Востока, «Время выделения большинства из них (почти 90%) приходится на годы существования Советского Союза», стр. 100. По нашему мнению, мозаичность естественно и полностью определяется недостаточной изученностью территории СССР в отношении ВКЭ в этот период. Если бы везде, как на настоящем этапе, преобладал сибирский генотип – он и должен был выявляться в изученных, мозаично расположенных местах (чего не наблюдалось). 2) Аргумент 3. «...можно сделать заключение о том, что значительная доля штаммов начала 40-х годов была получена из клинического материала. ... Очевидно, что делать достоверные выводы о распределении генотипов ВКЭ на основе таких штаммов нельзя, т. к. выборка не является случайной. Известно, что КЭ, вызванный вирусами разных субтипов, может существенно отличаться по клиническому проявлению. ... Объективно оценить распределение генотипов ВКЭ на отдельно взятой территории можно только по штаммам, выделенным из природного материала.» Это, само по себе спорное, рассуждение очевидным образом опровергается следующим фактом: в настоящее время в РФ (повторюсь – вне Дальнего Востока) практически все клинические случаи заболевания человека ВКЭ, включая тяжелые и даже летальные, вызываются именно сибирским генотипом. То есть мы вполне можем сравнивать подобное с подобным: больных в 1940-е и больных в 2010-е годы. 3) Ранее, в Аргументе 1, автор пишет: «можно утверждать, что современная популяция штаммов ВКЭ-Сиб на территории Свердловской области формировалась на протяжении нескольких столетий, а не в последние 60 лет, как следует из выводов авторов обсуждаемой гипотезы (смены генотипа)». Зачем понадобилось приписывать оппонентам такое

заведомо неверное утверждение, как «современная популяция штаммов ВКЭ-Сиб на территории Свердловской области формировалась ... в последние 60 лет» - можно только догадываться.

Завершая отзыв, следует подчеркнуть, что диссертационная работа представляет собой профессиональное исследование на актуальную тему в ходе которого получены новые результаты, имеющие научную и, пока в основном потенциальную, практическую значимость. Интерпретация результатов автором вовлекает в научный оборот новые факты и соображения, стимулирует дискуссию и развитие научного направления в целом. Однако неудачная формулировка задач, выводов и «положений выносимых на защиту» вынуждает признать, что работа не в полной мере соответствует п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Несмотря на это, по мнению оппонента, Ковалев Сергей Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 Вирусология.

Заведующий лабораторией
эпидемиологии природно-очаговых инфекций
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
Д.б.н., профессор
12 января 2017 г.
Адрес: 111123, Москва, Новогиреевская ул. д.3А,
Тел. +7 495 974 96 46,
E-mail: platonov@pcr.ru



Платонов А.Е.

Подпись Платонова А.Е. заверяю,
Ученый секретарь ФБУН ЦНИИ
эпидемиологии Роспотребнадзора
Никитина Т.С.
12 января 2017 г.

