

ОТЗЫВ

официального оппонента,

кандидата биологических наук, доцента Алексеева Александра Юрьевича на диссертацию

Бабошко Дмитрия Алексеевича «Встречаемость и молекулярно-генетическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота в Республике Дагестан и Новосибирской области», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Актуальность темы диссертационной работы

На сегодняшний день вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) остается одной из глобальных проблем сельского хозяйства, как в России, так и во всем мире. Несмотря на достижения в эпизоотическом контроле, в России инфекция ВЛКРС занимает первое место среди причин смертности скота. По официальным данным, в целом по стране около 7% поголовья КРС инфицированы ВЛКРС. Учитывая применение рекомендованного типа диагностики (РИД, ИФА и ПЦР) с невыявлением недавно инфицированных животных, реальная инфицированность поголовья несомненно выше.

По данным глобальных и региональных исследований ВЛКРС представлен 12 генотипами G1 – G12, которые имеют территориальную специфику распределения. В России преобладают генотипы G4 и G7, также описана циркуляция ВЛКРС G1 и G8. Молекулярная характеристика ВЛКРС (генотипирование) в мире проводится по области гена *env-gp51*. Пополнение базы данных последовательностей гена *env-gp51* позволяет улучшать точность диагностики и выявлять эпизоотологическую трассировку источников и путей распространения инфекции.

В России представлена лишь ограниченная информация о встречающихся вариантах ВЛКРС, отсутствуют современные данные по генетическим особенностям циркулирующих ВЛКРС и их филогенетических связях. Дефицит актуальной информации о генетическом разнообразии ВЛКРС в России может приводить к снижению эффективности молекулярной диагностики, затруднять разработку и оценку вакцинных препаратов, а также ограничивать возможности эпизоотологического мониторинга, прогнозирования и контроля распространения инфекции.

Цель представленной работы заключалась в изучении особенностей географического распределения, генетического разнообразия и эволюционных связей вариантов ВЛКРС, циркулирующих на отдельных территориях России.

Безусловно, получение новых данных по генетическим вариантам ВЛКРС, их региональным особенностям циркулирования, особенности последовательностей впервые расшифрованных полных геномов российских геновариантов и результаты других задач, поставленные соискателем для решения, важны для понимания эпизоотической ситуации, для разработки новых эффективных мероприятий по диагностике ВЛКРС, оздоровлению стад и снижению общей зараженности поголовья КРС, поэтому актуальность проведения данного исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы Д.А. Бабошко определяется тем, что автором получены и проанализированы 634 новых последовательностей гена env ВЛКРС, из них 417 последовательностей депонированы в международную базу GenBank (NCBI) (эти данные расширили базу депонированных последовательностей из России вдвое). Получены новые данные о генетическом разнообразии вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего на территориях Новосибирской области и Республики Дагестан Российской Федерации. Установлено доминирование генотипа G4 и присутствие генотипа G7.

Впервые проведено масштабное филогенетическое исследование популяции вируса и описаны внутригенотипические филогенетические связи изолятов вируса G4 и G7 с использованием нескольких методов построения эволюционных отношений.

Впервые получены полногеномные последовательности ВЛКРС генотипов G4 для штаммов, циркулирующих на территории России. Впервые в мире получены последовательности полных геномов для генотипа G7, который не имеет в международной базе данных GenBank депонированных полногеномных последовательностей. Эти данные позволили охарактеризовать мутации во всех основных генах вируса (gag, pro, pol, env, tax/rex, R3, G4).

Практическая значимость исследования

На основе результатов генотипирования была разработана и внедрена стратегия поэтапного формирования ВЛКРС-свободного стада, включающая разделение поголовья по статусу инфицирования с двойным тестированием молодняка в 3 месяца и 6 месяцев, приоритетную выбраковку животных с высокой провирусной нагрузкой и систематический мониторинг методом ПЦР в реальном времени.

Разработан и валидирован метод мультиплексной каплевой цифровой ПЦР (цПЦР) на основе праймеров к генам pol и DRA для одновременного определения провирусной нагрузки ВЛКРС генотипов G4 и G7. Впервые с применением метода мультиплексной каплевой цифровой ПЦР проведено сравнительное определение уровня провирусной нагрузки (PVL)

ВЛКРС генотипов G4 и G7 в различных возрастных группах крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, что позволило установить достоверно более высокую провирусную нагрузку у животных, инфицированных генотипом G4, по сравнению с инфицированными генотипом G7.

Результаты практической интеграции молекулярно-генетических методов скрининга телят в систему противоэпизоотических мероприятий в ООО «Раздольное» подтверждают применимость данного подхода для формирования стада, свободного от ВЛКРС, в условиях крупного молочного хозяйства. Автором даны рекомендации по использованию в ветеринарных лабораториях для мониторинга провирусной нагрузки ВЛКРС и оценки эффективности оздоровительных мероприятий разработанного метода цифровой ПЦР.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Структура и содержание диссертации продиктованы целью и задачами настоящего исследования. Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 222 листах машинописного текста, подкреплённых 20 таблицами и иллюстрированных 21 рисунком. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка используемых сокращений, списка литературы, включающего 243 источника (в том числе 5 – на русском языке и 238 – на иностранных языках) и двух приложений.

Во введении автор логично и грамотно обосновывает актуальность работы, научную новизну и практическую значимость. Цель и поставленные задачи четко сформулированы согласно теме диссертации. Соискатель обозначил 7 крупных задач для реализации цели работы.

В обзоре литературы подробно представлен анализ современных данных по теме научной работы. В разделе, посвященном общей характеристике ВЛКРС и лейкоза КРС описаны формы лейкоза, пути его передачи, влияние на иммунитет животных и сопутствующее коинфицирование, экономические потери при лейкозе на примере разных стран. В разделе о структуре вирусной частицы и особенностях генома, автор приводит подробную информацию о строении вириона и генома ВЛКРС, подробно описаны структура генов и функции основных белков.

В разделе, описывающем патогенез, молекулярные механизмы онкогенеза и механизмы уклонения ВЛКРС от иммунного ответа подробно описаны молекулярные механизмы трансформации В-клеток, механизм иммунного ускользания провируса. В следующих разделах показан результат оценки распространения и генетического разнообразия ВЛКРС в разных странах мира, особенности аминокислотных

последовательностей и структуры белков ВЛКРС различных генотипов, описаны методы диагностики, современные методы профилактики и контроля ВЛКРС. Также присутствует раздел, анализирующий литературу о ВЛКРС как факторе возникновения онкологических заболеваний у человека.

Оценивая литературный обзор, необходимо отметить, что он основывается на современных научных источниках, изложен логично и позволяет получить полную информацию о состоянии вопросов, изучаемых автором.

Во второй главе дано подробное описание объекта исследования, способов получения и обработки биоматериала. Указаны использованные в работе методы биоинформатического и статистического анализа данных.

В главе 3 автором приведены результаты собственных исследований, подробно иллюстрированные таблицами и рисунками. Описание результатов исследования сопровождается интерпретацией полученных данных. Автор выявил генетическое разнообразие ВЛКРС, циркулирующих на территории Новосибирской области и Республики Дагестан – показана циркуляция геновариантов G4 и G7. Выполнен анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей ВЛКРС гена *env*, а также анализ мутаций этого гена. Дмитрием Алексеевичем представлен анализ мутаций в структурных, ферментативных, регуляторных генах полногеномных последовательностей ВЛКРС. Выполнен филогенетический анализ полных геномов, и анализ провирусной нагрузки ВЛКРС по возрастным группам животных.

Также описан результат создания здорового стада на основании ПЦР диагностики в ООО «Раздольное» Новосибирской области, что можно использовать как практический результат в диссертационной работе.

Глава 4 посвящена обсуждению полученных данных. Автор формулирует свое отношение к результатам проведенной работы и сопоставляет их с данными из современных литературных источников.

В разделах «Заключение» и «Выводы» представлены все полученные автором результаты. Выводы диссертации четко сформулированы, обоснованы, закономерно вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

Значительные объемы исследования и грамотный анализ данных позволили получить исчерпывающую информацию о молекулярно-генетическом разнообразии и эпизоотологических особенностях геновариантов вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующих в регионах России (Новосибирская область и Республика Дагестан). Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.10 – Вирусология: п. 4, п. 8, п. 10.,

по которой она представлена к защите, написана ясно и логично, а ее оформление отвечает существующим требованиям.

В автореферате отражены основные результаты диссертационной работы.

Достоверность результатов, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-генетических, в том числе филогенетических, статистических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах. Достоверность поддерживается также большим объёмом анализа и применением нескольких методов представления эволюционных отношений полученных последовательностей ВЛКРС. Замечательно выполнен анализ эволюционных отношений с использованием метода Median Joining Network.

Надежность и валидность полученных результатов была обеспечена величиной уровня значимости не более 0,05.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы объёмом проведённых исследований, методическими подходами, использованием современных методов исследования. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывают сомнений.

Публикации и апробация результатов, представленных в диссертации.

Результаты работы отражены в 16 научных работах в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 3 – статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций по специальности 1.5.10 Вирусология.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 3 конференциях и конгрессах различного уровня.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

В целом, материал четко структурирован, стилистически хорошо изложен. Выполнен колоссальный объем работы. Тем не менее, автору следует обращать большее внимание на некоторые англицизмы, которые вполне можно заменить на русские термины. Ниже некоторые комментарии и вопросы, на которые хотелось бы получить ответы и мнение автора:

1. Почему, судя по списку используемой литературы автор провел преимущественный анализ иностранных источников информации? Почти полностью отсутствует анализ русскоязычной литературы.

2. В рисунке 10 не указано, последовательности каких генов или полного генома ВЛКРС взяты в анализ.

3. Обозначения в таблице 12 и описывающем её тексте не соответствуют друг другу. Новые, ранее не описанные замены аминокислот для ВЛКРС были выявлены в двух позициях. В таблице указана замена K41S, присутствующая у 3% образцов, а в тексте указана замена K41R, присутствующая у 96% образцов.

4. Также в таблице 12 и в ее описании не указано количество взятых в исследование генотипов G4 и G7. Например в таблице бросается в глаза странная встречаемость мутаций в позиции 15: A15T с встречаемостью 98% в генотипах G4 и G7 и A15I с встречаемостью 13% в генотипе G74. На первый взгляд кажется ошибкой, так как суммарный процент более 100. Чтобы все понять, приходится отдельно смотреть публикации автора диссертации, и только там находится ответ в статье в журнале Pathogen за 2026 год.

5. В автореферате и диссертации в разделе декларации личного участия указано «...совместно с работниками агрохолдинга ООО «Раздольное». Это ошибка, ООО «Раздольное» не является агрохолдингом. По тексту работы автор так и не определился с точным родом занятий хозяйства. Упоминается крупное животноводческое хозяйство, мясо-молочное хозяйство, крупное молочное хозяйство.

В целом, работа мною оценивается положительно, вопросы и комментарии не являются принципиальными, нисколько не умоляют ценности и качества работы.

Заключение

Диссертационная работа Бабошко Дмитрия Алексеевича «Встречаемость и молекулярно-генетическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота в Республике Дагестан и Новосибирской области», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - Вирусология (биология) является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основе выполненных автором исследований показано молекулярно-генетическое разнообразие вируса лейкоза крупного рогатого скота в Республике Дагестан и Новосибирской области, разработан прототип тест-системы на основе цифровой ПЦР и показано его успешное применение в программе снижения пораженности скота вирусом лейкоза в реальном хозяйстве Новосибирской области.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382, от 18.07.2026 № 905, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор, Бабошко Дмитрий Алексеевич, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент: ведущий научный сотрудник - руководитель лаборатории экспериментальной биологии патогенных микроорганизмов
ФГБУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии,
e-mail: al-alexok@yandex.ru
Тел. (383) 274-94-23
канд. биол. наук, доцент Алексеев Александр Юрьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, 630060, ул. Тимакова, д. 2
Тел: (383) 274-95-80, факс (383) 335-97-74.

Личную подпись Алексеева А. Ю. заверяю
Вед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
" 7 " октября 2026 г. подпись Е. В. Вендиктова

