

ОТЗЫВ официального оппонента на диссертационную работу Литвинова Андрея Николаевича «Митохондриальная геномика популяций русского населения Восточной Европы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

Исследования структуры и разнообразия генофондов народов, основанные на анализе изменчивости генетических систем, наследуемых по одной из родительских линий – митохондриальной ДНК (мтДНК) и Y-хромосомы, получили широкое распространение в последние десятилетия, и поэтому прогресс в этой области эволюционной и популяционной генетики наиболее ощутим. За годы исследований созданы базы данных об изменчивости гипервариабельных участков митохондриального генома во многих популяциях мира, однако благодаря развитию технологий секвенирования ДНК сейчас происходит новый этап накопления популяционных данных о полиморфизме мтДНК – уже на уровне целых митогеномов. Восточная часть Европы в этом отношении изучена намного слабее, чем западная, в связи с чем диссертационное исследование Литвинова Андрея Николаевича представляется чрезвычайно актуальным. Целью диссертационной работы является изучение структуры и разнообразия митохондриального генофонда популяций русского населения Восточной Европы, основываясь на данных об изменчивости целых митохондриальных геномов.

Диссертационная работа изложена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы с результатами работы и их обсуждением, а также заключения, выводов, списка цитируемой литературы и Приложения. Работа изложена на 231 странице машинописного текста, из них 75 страниц составляет Приложение. Диссертация проиллюстрирована 16 таблицами и 55 рисунками, Приложение включает в себя 3 таблицы и 52 рисунка. Список литературы представлен 236 источниками (в том числе 50 работ на русском языке).

Во «Введении» диссертант обосновывает актуальность проведенного исследования, определяет цели и задачи исследования, научную новизну и практическое значение работы. Цели и задачи, поставленные в исследовании А.Н. Литвинова, представляются вполне актуальными, поскольку митохондриальные генофонды популяций Восточной Европы, включая русское население, нуждаются в исследованиях как в отношении структуры и разнообразия, так и в плане филогеографии отдельных гаплогрупп мтДНК, распространенных среди населения Северной Евразии.

Обзор литературы состоит из трех основных разделов. В Обзоре автором приводятся сведения о структурно-функциональной организации и изменчивости митохондриального генома человека, описывается история исследований полиморфизма мтДНК в популяциях и отмечаются направления исследований, проводимых в настоящее время. Большое внимание в Обзоре уделяется филогеографическому подходу в исследованиях изменчивости мтДНК, развитию филогенетической классификации вариантов полиморфизма, истории исследований митохондриальных «молекулярных часов», т.е. тех вопросов, которые изучаются и в диссертационной работе. В Обзоре учтены результаты исследований не только современного, но древнего населения Европы, что в целом способствует более обоснованной трактовке генетической истории европейцев, реконструируемой по данным о полиморфизме мтДНК. На основе опубликованных данных в Обзоре также рассматривается вопрос о популяционной специфичности компонентов митохондриальных генофондов как монофилетических групп митохондриальных гаплотипов, распространенных в определенных популяциях, этнических группах и их общностях. Тем самым диссертант предваряет собственные исследования в этом направлении, изложенные в диссертации. В Обзоре приводятся также сведения об истории формирования русского народа по данным археологии, антропологии и лингвистики; раздел небольшой, но емкий, и вполне достаточный для ознакомления с историей происхождения славян и русских в частности.

В главе «Материалы и методы» описаны материалы исследования, приводится таблица с указанием территориальной принадлежности и размеров выборок, использованных для анализа межпопуляционных взаимоотношений и филогеографического анализа гаплотипов мтДНК. Кроме выборок русских индивидуумов, для которых были секвенированы целые митохондриальные геномы, аналогичные данные были получены диссертантом и для популяций сербов и венгров, что объясняется необходимостью расширения материала для сравнительного межпопуляционного и филогеографического анализа. Методы статистической обработки полученных популяционных данных о полиморфизме мтДНК полностью соответствуют задачам диссертационной работы; все методы достаточно современные и стандартные для исследований в области популяционной митохондриальной геномики. Особо необходимо отметить синтез молекулярно-филогеографического подхода, позволяющего выявлять популяционно-специфичные компоненты митохондриального генофонда, и байесовского анализа динамики эффективной численности популяций, что позволило диссертанту получить сведения о моментах роста численности для отдельных генетических компонентов, специфичных для русских и для славян в целом. Данное сочетание подходов для

анализа структуры митохондриальных генофондов с учетом их иерархической организации ранее другими исследователями не применялось.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит результаты собственных исследований, представленных в семи разделах. Диссертантом получены первые популяционные данные о разнообразии митохондриальных генофондов отдельных русских популяций Восточной Европы, основываясь на результатах секвенирования целых митогеномов. Изучено население шести областей, представляющих северо-запад и в основном юго-запад европейского ареала русских. Для проведения филогеографического анализа получены результаты секвенирования целых митогеномов представителей русского населения еще пяти областей России и, в итоге, диссертантом сформирована база данных о полногеномном полиморфизме мтДНК у 466 представителей русского населения. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank, а также прошли проверку на качество секвенирования в судебно-генетической базе данных EMPOP, что дополнительно свидетельствует о надежности сформированной базы данных.

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей мтДНК включал стандартные процедуры расчета числа полиморфных сайтов, количества гаплотипов, нуклеотидного разнообразия, среднего числа попарных нуклеотидных различий, тестирования нейтральности изменчивости мтДНК. Для проведения сравнительного межпопуляционного анализа диссертантом используются опубликованные данные для пяти европейских популяций, а также полученные в рамках диссертационного исследования данные о полиморфизме мтДНК у сербов и венгров. Результаты межпопуляционных сравнений показали, что русские популяции (как по отдельности, так и в целом русские) мало отличаются от других европейских популяций по параметрам генетического разнообразия. Наиболее отличающейся является самая восточная из изученных русских выборок – владимирская. Подобно другим европейцам, русские характеризуются бимодальным характером распределения попарных нуклеотидных различий мтДНК, что может свидетельствовать о генетической подразделенности популяций и эпизодах смешения различных популяций в истории европейцев. Анализ динамики эффективной численности популяций, выполненный на данных о полиморфизме целых митогеномов, продемонстрировал, что в истории предков русского населения были периоды снижения и роста численности, а особенно большой 10-кратный рост численности произошел в бронзовом веке, примерно 4.3 тысяч лет тому назад. Это согласуется с археологическими данными, согласно которым в это время началось распространение носителей курганной культуры из степей Восточной Европы в Центральную Европу.

Диссертантом проведен анализ характера молекулярной эволюции митохондриальных геномов у европейцев. Для этого использовано несколько подходов: тестирование нейтральности полиморфизма мтДНК, Ka/Ks -тест, а также филогенетический анализ распределения синонимичных и несинонимичных замен в генах мтДНК. В итоге, обнаружено, что изменчивость мтДНК имеет скорее нейтральный характер, хотя для некоторых генов выявлено ослабление отрицательного отбора.

Большое внимание в диссертации уделяется филогеографическому анализу гаплотипов мтДНК, обнаруженных у русских. Диссертантом проведен детальный филогенетический анализ митохондриальных геномов, что позволило определить положение гаплотипов, выявленных у русских, в митохондриальном древе, идентифицировать их в соответствии с существующей классификацией мтДНК и определить ближайших филогенетических родственников. Результаты филогеографического анализа митохондриальных гаплотипов хорошо проиллюстрированы: 45 рисунков с фрагментами филогенетических деревьев помещены в самой диссертации, еще 52 рисунка находятся в Приложении. По результатам анализа диссертантом установлено, что гаплотипы мтДНК, распространенные среди русских, относятся к 170 гаплогруппам и их подгруппам, а также выявлена 51 новая подгруппа мтДНК. Поскольку в филогеографическом анализе используется довольно большой массив данных (около 50 тысяч митогеномов различного происхождения, представленных в GenBank), то такой анализ позволяет выявлять монофилетические кластеры гаплотипов, распространенные в пределах определенных популяций, этнических групп и их общностей. Диссертантом установлено, что в митохондриальном генофонде русских около 10% митогеномов входят в состав подгрупп мтДНК, специфичных только для русских. Несколько выше частота вариантов мтДНК, специфичных для славян – 14.2%. В диссертации приводятся также оценки распространенности среди русских других компонентов генофонда, специфичных для славян и германоязычных популяций, славян и финноязычных популяций. Кроме этого, проведено молекулярное датирование возраста популяционно-специфичных кластеров митохондриальных геномов, что позволило обнаружить, что формирование многих такого рода подгрупп мтДНК приходится на эпоху бронзового и железного веков, что совпадает с данными, полученными в ходе анализа динамики эффективной численности популяций с помощью байесовского подхода.

В главе «Заключение» автор кратко резюмирует итоги проведенных исследований и сопоставляет полученные результаты с литературными данными.

Рассматривая работу в целом, можно заключить, что полученные в диссертационном исследовании А.Н. Литвинова результаты вносят важный вклад в базу данных о структуре и разнообразии генофондов народов Северной Евразии и в решение проблем популяционной

генетики и истории формирования русского народа. Выводы диссертации согласуются с полученными в ней результатами, отвечают сформулированной цели и задачам исследования. Результаты получены на большом фактическом материале, обработка которого проводилась с использованием современных филогенетических и статистических методов, которые достаточны для решения поставленных задач. Результаты диссертационной работы достаточно полно представлены в научной печати; опубликованы 22 работы, в том числе, 9 статей в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций.

Результаты диссертационной работы А.Н. Литвинова представляют интерес для специалистов различных областей знаний: популяционных генетиков, археологов, антропологов, этнологов, историков, а также специалистов в области криминалистики и судебной генетики. Результаты исследования могут быть использованы в научных учреждениях, занимающихся проблемами популяционной и этнической генетики, а также в высших учебных заведениях.

Однако при анализе диссертационной работы возникли следующие вопросы и замечания:

1. Как видится рецензенту, наиболее яркий результат диссертационной работы заключается в описании всплеска эффективного размера популяции митохондриальной ДНК в период неолита. Во-первых, автору следовало бы четко указать, что N_e в его работе представляет собой эффективный размер не всей исследуемой популяции, а только популяции митохондриальной ДНК, что не учитывает возможную демографическую динамику мужского населения. Во-вторых, следовало бы четко указать на то, какие параметры кроме N_e варьировались, каковы их априорные и постериорные распределения. В-третьих, из текста диссертации непонятно, какую модель использовал соискатель *coalescent skyline* или *birth-death skyline*.
2. Рисунок 55 и Рисунок 6 указывает нам на графики временной зависимости эффективного размера популяции митохондриальной ДНК у русских, на Рисунке 55 добавлен анализ N_e для митохондриальных геномов, чьи гаплогруппы характерны для славян. Каково количество геномов, которое участвовало в данном анализе? В случае, если эти числа различаются, то необходимо сделать *downsampling*, выровнять числа геномов, провести такого рода анализ для набора случайных выборок геномов.
3. Был ли проведен анализ временной динамик N_e для сербов и венгров? Эти данные не приведены. Более общий вопрос заключается в том, что никому ранее на основании полных

митохондриальных геномов не удалось детектировать неолитический всплеск у европейцев. Рецензент не нашел обсуждения этого феномена в тексте. Это специфика митохондриальных геномов русских?

4. Очень жаль, что автор не проводит калибровку молекулярных часов самостоятельно. Использование данных о митохондриальных геномах древних людей, проживавших на территории современной России, могло скорректировать скорость мутаций для конкретной климатической и географической территории. Такой подход стал бы альтернативой использованию опубликованной мутационной скорости (Soares 2009, Perego 2009).
5. К недочету следует отнести крайнюю скупость в описании идеологии, используемых параметров и характера их априорного распределения для BEAST и BEAUti.
6. На странице 6 автор утверждает, что именно в представленной работе впервые определены митохондриальные геномы русских. Конечно же это не так. Возможности NGS методов позволяют легко получать последовательности мтДНК из коротких ридов путем де ново сборки. Геномы русских были секвенированы и депонированы в проект 1000 геномов. Очевидно, что полная последовательность мтДНК там также была установлена. Первые полные геномы русских депонированы в международные базы данных аж в 2010 году.
7. Расчет F_{st} и построение PCA в том случае, когда используются частоты гаплотипов, является, по моему мнению, весьма странной процедурой. К примеру, для 376 митохондриальных геномов русских 361 является уникальным, т.е. частота этих гаплотипов в векторе частот русских составит 100%. И только 15 геномов будут иметь частоты отличные от 100% (как пишет автор 50%). Это тривиальный вектор и анализ по частотам гаплотипов в таком случае представляется малоинформативным. Чего не сказать про данные, которые получены с использованием попарных нуклеотидных замен. Тем не менее значения p -value (так полагаю, что под p в тексте диссертации понимается именно p -value) равное 0 несколько удивительно, и скорее еще раз подчеркивает тривиальность частотных векторов.

Приведенные замечания не меняют в целом моё положительное отношение к работе соискателя.

Заключение. Таким образом, диссертация Литвинова Андрея Николаевича «Митохондриальная геномика популяций русского населения Восточной Европы» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение проблем в области изучения структуры митохондриального генофонда популяций русского населения Восточной

Европы по данным об изменчивости целых митохондриальных геномов. По актуальности, достоверности и новизне исследования и полученных результатов, значимости выводов для науки и практики диссертация имеет важное фундаментальное значение и отвечает требованиям пп. 9-11 и 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней» и постановлений Правительства РФ № 1024 от 28 августа 2017 г., № 1168 от 1 октября 2018 г. и № 426 от 20 марта 2021 г.), а ее автор, Литвинов Андрей Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Заведующий лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Доктор биологических наук

Егор Борисович Прохорчук

3.12.2021



Контактная информация:

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина

117312 Российская Федерация

г. Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1

Telephone +7 (499) 135-73-19

Fax +7 (499) 135-05-71

e-mail prokhortchouk@biengi.ac.ru

Подпись д.б.н. Прохорчука Е.Б.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук

Александр Федорович Орловский

