

ОТЗЫВ

официального оппонента,

доктора биологических наук Денисова Евгения Владимировича на диссертационную работу **Елфимова Кирилла Артемовича** «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02А6 ВИЧ-1», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

Актуальность темы диссертационной работы

ВИЧ-инфекция остается одной из наиболее значимых хронических вирусных инфекций человека. Несмотря на существенные достижения в области антиретровирусной терапии, эффективное подавление репликации ВИЧ-1 не приводит к полной элиминации вируса вследствие формирования провирусных резервуаров и сложных механизмов взаимодействия вируса с иммунной системой хозяина. Дополнительную сложность представляет высокая генетическая изменчивость ВИЧ-1 и существование многочисленных субтипов и рекомбинантных форм, способных различаться по своим биологическим свойствам.

Особое значение эта проблема имеет для Российской Федерации, где важную роль в эпидемии ВИЧ-инфекции играет суб-субтип А6 и циркулирующая рекомбинантная форма CRF63_02А6 ВИЧ-1. Несмотря на их широкое распространение, молекулярно-биологические и вирусологические свойства этих генетических вариантов, особенно в ранний период инфекционного процесса, остаются изученными значительно хуже, чем свойства глобально распространенных вариантов ВИЧ-1 (субтипа В, С, CRF01_AE и др.).

Исследование острой стадии ВИЧ-инфекции представляет особый интерес, поскольку именно в этот период происходят интенсивная репликация вируса, формирование провирусного резервуара и масштабная перестройка иммунной системы. Изменения, возникающие в данный период, могут иметь существенное значение для последующего течения заболевания.

Современный этап исследований вирусных инфекций характеризуется активным внедрением высокопроизводительных молекулярно-генетических и омиксных технологий. Секвенирование нового поколения позволяет детально исследовать генетическое разнообразие вируса, тогда как транскриптомика единичных клеток дает возможность выявлять изменения функционального состояния отдельных клеточных популяций, оценивать функциональность их антивирусного ответа и реконструировать сети межклеточной коммуникации. Совместное использование этих методов с классическими вирусологическими и молекулярно-генетическими подходами позволяет комплексно исследовать взаимодействие вирус-хозяин с разных сторон инфекционного процесса.

В связи с этим диссертационная работа К.А. Елфимова, объединяющая генетическую и фенотипическую характеристику клинических изолятов ВИЧ-1, исследование корецепторного тропизма, количественную оценку провирусного пула и анализ транскриптома единичных иммунных клеток, является актуальным современным исследованием.

Цель работы заключается в комплексной характеристике молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02А6 ВИЧ-1. Для достижения цели сформулировано пять взаимосвязанных задач, последовательное решение которых позволило автору рассмотреть особенности раннего инфекционного процесса с точки зрения вирусологии и генетики.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Для решения поставленных задач соискателем использован комплекс современных вирусологических, молекулярно-генетических, клеточных, биоинформатических и статистических методов. В работе применены полногеномное секвенирование и генотипирование ВИЧ-1, выделение клинических изолятов и фенотипическое определение их тропности, цифровая ПЦР, секвенирование РНК единичных клеток, а также современные методы обработки многомерных данных.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием стандартизованных экспериментальных протоколов, четкими критериями формирования исследуемой когорты, фенотипической верификацией тропности клинических изолятов и адекватной статистической обработкой. При анализе данных секвенирования РНК единичных клеток применены контроль качества клеток, коррекция батч-эффектов, референс-ориентированная и ручная аннотация клеточных популяций, pseudo-bulk анализ и оценка устойчивости полученных результатов.

Научные положения и выводы логически следуют из представленных экспериментальных данных, соответствуют поставленным задачам и являются обоснованными и достоверными.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы Елфимова К.А. определяется комплексным исследованием острой ВИЧ-инфекции, вызванной эпидемически значимыми для Российской Федерации вариантами ВИЧ-1 - суб-субтипом А6 и CRF63_02A6.

Автором проведено полногеномное генотипирование и фенотипическая характеристика клинических изолятов ВИЧ-1. Показано присутствие на острой стадии инфекции не только R5-, но также X4- и R5/X4-тропных вариантов. Проведена сравнительная оценка существующих методов генотипического предсказания тропности и разработана модель машинного обучения HIV-V3Augur, адаптированная в том числе для генетических вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Российской Федерации.

Впервые для исследуемых генетических вариантов количественно охарактеризован провирусный ландшафт в острой стадии инфекции и показано формирование гетерогенного пула провирусов с выраженным преобладанием дефектных геномов.

Особого внимания заслуживает использование метода секвенирования РНК единичных клеток. Автором охарактеризован транскриптомный профиль основных антивирусных популяций моноклеарных клеток периферической крови и выявлены изменения клеточного состава, экспрессии генов и активности сигнальных путей во время острой стадии ВИЧ-инфекции. Показана выраженная перестройка транскрипционных программ CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, NK-клеток и неклассических моноцитов. Анализ межклеточной коммуникации выявил изменение структуры сигнальных взаимодействий с формированием центральной роли неклассических моноцитов и снижением активности ряда регуляторных клеточных популяций (gdT, dnT, MAIT). Полученные результаты расширяют представления о ранних механизмах иммунной дисфункции при ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Результаты диссертационной работы К.А. Елфимова имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Полученные данные расширяют представления о биологических свойствах суб-субтипа А6 и CRF63_02A6 в ранний период ВИЧ-инфекции, в том числе за счет сопоставления генетических характеристик клинических изолятов с их фенотипическими свойствами. Полногеномные последовательности и сформированная коллекция фенотипированных изолятов представляют ценность для дальнейших молекулярно-эпидемиологических исследований и совершенствования методов предсказания тропности ВИЧ-1. Практический интерес представляет разработанное программное

обеспечение HIV-V3Augur, которое после дополнительной независимой валидации может быть использовано в научно-исследовательских и вирусологических лабораториях.

Значительный фундаментальный интерес представляют результаты профилирования транскриптома единичных клеток. Выявленные клеточные популяции, гены и сигнальные взаимодействия формируют основу для дальнейшей экспериментальной проверки механизмов ранней иммунной дисфункции при ВИЧ-инфекции. Разработанные подходы к оценке провирусного пула также могут использоваться при исследованиях формирования и динамики резервуаров ВИЧ-1.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, включая 3 статьи в научных журналах, индексируемых в РИНЦ, Web of Science и Scopus, и 3 тезиса докладов международных и всероссийских научных конференций.

Основные результаты работы были представлены и обсуждены на профильных научных мероприятиях, посвященных высокопроизводительному секвенированию, молекулярной диагностике и эпидемиологическому надзору за ВИЧ-инфекцией. Таким образом, результаты диссертационного исследования получили необходимую апробацию и в достаточной степени представлены научному сообществу.

Структура и оформление работы

Диссертационная работа К.А. Елфимова изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 31 рисунок и 5 таблиц. Библиографический список включает 207 источников отечественных и зарубежных авторов. Работа построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы.

Во «Введении» обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи работы, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения о достоверности, апробации и личном участии автора.

В главе «Обзор литературы» изложены современные представления о биологии и генетическом разнообразии ВИЧ-1, эпидемиологии суб-субтипа A6 и CRF63_02A6, особенностях острой стадии инфекции и корецепторного тропизма. Отдельное внимание уделено современным омиксным технологиям и возможностям их применения при исследовании ВИЧ-инфекции.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание когорт исследования (ВИЧ-положительные лица в острой стадии ВИЧ-инфекции и люди с ВИЧ-отрицательным статусом) и широкого комплекса экспериментальных и аналитических методов. Наряду с классическими вирусологическими и молекулярно-генетическими подходами подробно представлены получение и обработка данных секвенирования транскриптома единичных клеток. Автором описаны критерии контроля качества, нормализация и интеграция данных, аннотация клеточных популяций, анализ дифференциальной экспрессии, функциональное обогащение и реконструкция межклеточной коммуникации.

В главе «Результаты собственных исследований» последовательно представлены результаты генотипирования и фенотипирования клинических изолятов, оценки и разработки моделей предсказания тропности, исследования провирусного пула и транскриптомного профилирования единичных клеток. Значительную часть главы составляет анализ отдельных субпопуляций иммунных клеток и сигнальных путей, с помощью которых они потенциально могут взаимодействовать друг с другом.

В «Обсуждении результатов» автор сопоставляет полученные данные с опубликованными исследованиями, рассматривает возможные механизмы обнаруженных различий и обозначает технические ограничения выполненной работы. Представляется

положительным, что результаты транскриптомного анализа интерпретируются в контексте известных механизмов иммунного ответа при ВИЧ-инфекции, а также сопоставляются с вирусологическими характеристиками исследованных изолятов.

Выводы сформулированы четко, соответствуют поставленным задачам и отражают основные результаты исследования. Диссертация написана научным языком, логично структурирована и достаточно хорошо иллюстрирована.

Автореферат достаточно полно и адекватно отражает содержание диссертационной работы, ее основные положения и полученные результаты. Представленные в нем сведения о методах, результатах и выводах соответствуют содержанию диссертации.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях молекулярных и клеточных механизмов иммунного ответа при острой ВИЧ-инфекции. Выявленные изменения клеточного состава мононуклеаров периферической крови, транскрипционного профиля отдельных субпопуляций и активности сигнальных путей представляют основу для последующей валидации генов-кандидатов, потенциально связанных с прогрессированием заболевания, противовирусным ответом и персистенцией ВИЧ-1.

Особый интерес представляют данные о перестройке межклеточной коммуникации, включая изменение функциональной роли неклассических моноцитов, НК-клеток и регуляторных Т-клеточных популяций. Эти результаты могут быть использованы при планировании дальнейших исследований на иных когортах пациентов, а также для последующего функционального подтверждения выявленных сигнальных взаимодействий с применением клеточных, молекулярно-биологических и других методов.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Работа заслуживает положительной оценки. Вместе с тем при ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов.

1. При интерпретации транскриптомных изменений в работе большое внимание уделяется функциональному обогащению Gene Ontology и активности сигнальных путей. Поскольку анализ их активности строится на данных о наличии и уровне экспрессии отдельных генов, а не всех участников сигналинга, возникает вопрос, являются ли достоверными выявленные изменения сигнальных путей? Какие сигнальные пути из обнаруженных в работе наиболее биологически значимы?

2. Полученные транскриптомные данные демонстрируют одновременную активацию провоспалительных и противовирусных программ и повышение активности ряда негативных регуляторов сигналинга и стресс-ответа. Как автор интерпретирует такое сочетание противоположно направленных процессов: преимущественно как механизм компенсаторной регуляции чрезмерной иммунной активации или как раннее формирование функциональной дисрегуляции иммунных клеток?

Указанные вопросы имеют преимущественно дискуссионный характер, не ставят под сомнение основные результаты и выводы диссертационной работы и в значительной степени определяют перспективные направления дальнейших исследований.

Заключение

Диссертационная работа Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - Вирусология, представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, посвященную решению актуальной задачи современной вирусологии.

В работе получены новые данные о молекулярно-генетических и биологических свойствах эпидемически значимых для Российской Федерации вариантах ВИЧ-1, проведена фенотипическая характеристика корцепторного тропизма клинических изолятов и разработан специализированный инструмент для его генотипического предсказания. Впервые для исследуемых вариантов охарактеризован провирусный ландшафт во время острой стадии ВИЧ-инфекции. Существенным научным результатом является выявление изменения клеточного состава, транскрипционных программ отдельных иммунных популяций и межклеточной коммуникации с использованием технологии анализа транскриптома единичных клеток.

Использованный комплекс современных экспериментальных и аналитических методов соответствует поставленным задачам, а основные выводы обоснованы представленными результатами.

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, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор, Елфимов Кирилл Артемович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - вирусология.

Официальный оппонент:

Заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ, доктор биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, профессор РАН

11.09.2026

 Денисов-Евгений Владимирович

Контактные данные:

Телефон: 8 (3822) 28-26-76, доб. 3375

Email: d_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Адрес места работы: 634009 г. Томск, пер. Кооперативный 7/1

Полное название организации: Научно-исследовательский институт онкологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Подпись д.б.н., Денисова Е.В. заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», кандидат биологических наук



 Хитринская Ирина Юрьевна

Адрес: 634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Сайт: <https://www.tnmc.ru/>

Телефон: 8 (3822) 46-95-66; Email: center@tnmc.ru