

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Елфимова Кирилла Артемовича
«Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. «Вирусология»

ВИЧ-инфекция – сложный процесс, развитие которого определяется не только молекулярно-генетическими особенностями вируса, но и свойствами различных популяций клеток организма хозяина. ВИЧ использует клеточные рецепторы, внутриклеточные сигнальные и метаболические системы, изменяет функциональное состояние клеток и формирует провирусные резервуары. Поэтому применение адекватных клеточных моделей и исследование клеточной гетерогенности имеют принципиальное значение для современной экспериментальной вирусологии.

Работа Кирилла Артемовича посвящена изучению ранней стадии ВИЧ-инфекции, когда на фоне интенсивной репликации вируса происходит первичное формирование провирусных резервуаров, изменение абсолютного и относительного количества клеток иммунной системы, а также и их функционального состояния. В дальнейшем именно эти ранние события могут оказывать существенное влияние на жизненный цикл вируса и нарушение иммунитета.

Дополнительную актуальность работе соискателя придает исследование генетических вариантов ВИЧ-1, имеющих эпидемиологическое значение для Российской Федерации, а именно суб-субтипа А6 и циркулирующей рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1. Их биологические свойства изучены значительно слабее, чем свойства других широко распространенных вариантов ВИЧ-1.

Сильной стороной представленной работы является сочетание молекулярно-генетических методов с непосредственным исследованием клеточных и вирусологических фенотипов. Автор не ограничивается анализом последовательностей вирусного генома, а получает инфекционные клинические изоляты, проводит их наработку в клеточной культуре, экспериментально определяет тропность, количественно оценивает клеточно-ассоциированную провирусную ДНК и, в соответствии с современными методическими подходами, характеризует транскриптом отдельных клеточных популяций мононуклеарных клеток периферической крови.

Большой интерес представляет вирусологическая часть работы, в которой для всех пациентов основной когорты были получены инфекционные изоляты ВИЧ-1. Выделение вируса осуществлялось с использованием стимулированных мононуклеаров периферической крови, а динамика репликации контролировалась по накоплению капсидного белка p24 ВИЧ-1. Получение клинических вирусных изолятов непосредственно от пациентов – достоинство исследования, так как это позволяет воссоздать весь жизненный цикл вируса.

Для фенотипического определения корецепторной тропности использованы клеточные линии U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4. Репликация вируса на этих клеточных моделях позволила классифицировать клинические изоляты по тропности. В общей фенотипированной выборке автором выявлено 11 R5-тропных, один X4-тропный и семь R5/X4-тропных изолятов. Особого внимания заслуживает наличие вариантов, использующих корецептор CXCR4, уже в острую стадию заболевания. В основной когорте X4- или R5/X4-тропные вирусы были выявлены у 8 из 14 пациентов.

Полученные результаты подчеркивают значение экспериментального фенотипирования. Вычислительный анализ последовательности является важным и удобным инструментом, однако клеточная модель позволяет установить функциональные свойства вируса экспериментально и использовать эти данные в качестве референса для последующей разработки генотипического предиктора.

Автором показано, что существующие алгоритмы определения тропности на основании последовательности области V3 gp120 гена *env* HIV-1 имеют ограниченную применимость к суб-субтипу A6 и особенно к CRF63_02A6. Для последнего варианта наиболее успешные существующие подходы демонстрировали точность около 72 %, а высокая специфичность ряда моделей сочеталась с недостаточной чувствительностью.

Для решения данной проблемы автор разработал модель HIV-V3Augur, использующую субтип-специфический подход. Для суб-субтипа A6 чувствительность, специфичность и точность модели составили приблизительно 79 %, 79 % и 77 % соответственно, а для CRF63_02A6 - 87 %, 100 % и 95 % соответственно. Данные экспериментального клеточного фенотипирования были основой для оценки эффективности генотипического предсказания.

Интерес представляет также исследование провирусных резервуаров. Методом цифровой ПЦР показано, что уже на раннем этапе инфекционного процесса в мононуклеарах периферической крови формируется значительный и гетерогенный пул провирусной ДНК. Преобладание дефектных провирусных геномов показывает гетерогенность клеток, содержащих вирусный генетический материал.

Также автором были проанализированы транскрипты отдельных мононуклеаров периферической крови от трех ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии инфекции. После интеграции данных и кластеризации были идентифицированы основные популяции CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, NK-клеток, В-клеток, моноцитов, дендритных и регуляторных клеток. Одно из достоинств секвенирования транскриптомов единичных клеток – нет усреднения сигналов, как при анализе всего транскриптома. Это особенно важно для иммунной системы, состоящей из множества функционально различных и динамически изменяющихся субпопуляций.

Автором выявлено снижение доли наивных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, Treg- и MAIT-клеток при одновременном увеличении доли CD8+ эффекторных Т-клеток памяти, NK-клеток и пролиферирующих Т/NK-клеток. Эти изменения свидетельствуют о выраженной перестройке клеточного состава уже в первые недели инфекционного процесса. На уровне транскриптома показана активация генов, связанных с воспалением, клеточным стрессом и внутриклеточной передачей сигнала, включая *NR4A1*, *NR4A2*, *NR4A3*, *DUSP1*, *DUSP2*, *RGS1*, *THBS1*, *OLR1*, *ATF3* и *IER3*. Одновременно обнаружены изменения генов, связанных с организацией цитоскелета, клеточной миграцией и метаболизмом.

Раздельный анализ отдельных клеточных популяций показал, что в CD4+ Т-клетках центральной памяти выявлено повышение экспрессии *IL21R*, *ICOS*, *SOCS1*, *CXCR4* и *RGS1*, а также регуляторов пути TGF- β - *SKIL*, *SMAD7* и *PMEPA1*. Показаны изменения экспрессии генов, связанных с клеточным стрессом, апоптозом, пролиферацией и энергетическим метаболизмом. Данные результаты имеют особый интерес с точки зрения биологии клеточных резервуаров, поскольку CD4+ Т-клетки памяти представляют собой долгоживущую популяцию, способную поддерживать существование провируса в организме.

Наиболее выраженное изменение транскрипционного профиля обнаружено в неклассических моноцитах CD14⁺CD16⁺⁺. В этих клетках повышалась экспрессия *IL1B*, *IRAK2*, *IER3*, *DUSP2*, *RGS1*, *CXCR4*, *CD69*, *VEGFA* и других генов, связанных с воспалительным ответом, клеточной активацией, миграцией и стрессом.

Анализ межклеточной коммуникации показал, что при острой ВИЧ-инфекции происходит не только изменение состава клеточных популяций, но и перестройка взаимодействий между ними. Неклассические моноциты становятся одним из основных узлов входящих и исходящих сигналов, тогда как ряд регуляторных популяций демонстрирует снижение коммуникационной активности.

Таким образом, результаты диссертационной работы показывают, что острая ВИЧ-инфекция сопровождается существенной перестройкой клеточных состояний. При этом изменения затрагивают не только количество отдельных клеточных субпопуляций, но и внутриклеточные сигнальные программы, метаболизм, миграцию и межклеточную коммуникацию.

С методической точки зрения особенно важно, что в работе используются различные типы клеточных систем. Первичные мононуклеары пациентов служат источником клинических изолятов и материалом для анализа иммунных клеток, тогда как стандартизованные клеточные линии с контролируемой экспрессией *CCR5* и *CXCR4* используются для воспроизводимого определения конкретного вирусного фенотипа. Сочетание первичного материала и стандартизованной модельной системы позволяет сохранить сложность исследуемого объекта при этом уменьшив число неконтролируемых переменных при функциональном эксперименте.

Достоверность результатов обеспечивается использованием современных молекулярно-биологических, вирусологических и клеточных методов, стандартизированными процедурами обработки биологического материала, экспериментальным фенотипированием клинических изолятов, применением цифровой ПЦР и секвенированием транскриптома единичных клеток.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертационной работы, основные экспериментальные подходы, научную новизну и полученные результаты. Основные положения работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях и представлены на профильных научных конференциях.

Принципиальных замечаний к представленному автореферату нет, но есть некоторые вопросы:

1) При секвенировании транскриптома единичных клеток преаналитический этап влияет на клеточный состав и состояние отдельных популяций. В работе мононуклеары ВИЧ-положительных пациентов выделялись и криоконсервировались с последующим размораживанием перед подготовкой библиотек, а контрольные транскриптомные данные были взяты из ранее выполненного независимого исследования. Вопрос, как автор оценивал возможный вклад различий преаналитической обработки в выявленные изменения доли относительно чувствительных клеточных популяций – Treg- и MAIT-клеток? Можно ли оптимизировать дизайн эксперимента? Возможно использование полученных параллельно контрольных образцов позволило бы дополнительно валидировать результаты.

2) Нужен ли дополнительный контроль стабильности экспрессии *CCR5* и *CXCR4* в используемых культурах клеток при фенотипическом определении тропности? В работе используются линии клеток U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4, а оценка репликации проводится в ходе нескольких пассажей. Длительное культивирование потенциально создает условия для отбора отдельных вирусных вариантов, а функциональный фенотип может зависеть от уровня экспрессии соответствующего корецептора на клеточной поверхности.

Вопросы носят дискуссионный характер и не снижают высокой оценки выполненной работы.

Перечисленные замечания не снижают значимости работы, представленная в автореферате диссертация является завершенным научным исследованием, а полученные результаты представляют высокую научную ценность. Автореферат соответствует формальным требованиям и заслуживает положительной оценки.

На основании автореферата можно сделать вывод, что представленная работа соответствует требованиям пунктов 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Елфимов Кирилл Артемович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

29 сентября 2026 г.

Ведущий научный сотрудник,
заведующий сектором
клеточных коллекций,
канд. биол. наук (1.5.7 – генетика)



Мензоров Алексей Гаврилович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦИГ СО РАН)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10

Телефон: +7-383-363-49-63*1010

E-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Подпись Мензорова Алексея Гавриловича заверяю:
Ученый секретарь
ИЦИГ СО РАН



Орлова Галина Владимировна