

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Бобковой Марины Ридовны на диссертационную работу Власовой Виолетты Викторовны «Особенности метаболизма CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных лиц, принимающих антиретровирусную терапию», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы исследования. Диссертационное исследование Власовой В.В. посвящено фундаментальным вопросам, связанным с патогенезом ВИЧ-инфекции, и, в первую очередь, с дефицитом CD4⁺ Т-лимфоцитов – основных мишеней ВИЧ. Успехи разработок в области фармакотерапии ВИЧ-инфекции дают возможность ограничивать размножение вируса в организме человека и, как следствие, восстанавливать функции иммунитета, однако достичь максимально эффективного иммунологического ответа удастся не всегда, и у многих пациентов иммунодефицит сохраняется, несмотря на видимое прекращение репликации ВИЧ (дискордантный иммунологический ответ). Причины этого явления не расшифрованы, а механизмы потери/невосстановления иммунных клеток при ВИЧ-инфекции изучены пока еще очень мало.

Конкретной задачей диссертационной работы стало исследование нарушений регенерации CD4⁺ Т-клеток и особенностей их метаболизма у пациентов, не достигающих иммунологического успеха лечения. Клинические риски серьезных болезней – инфекционных и неинфекционных, таких как сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, нейродегенеративные расстройства и др., у таких пациентов существенно повышены по сравнению с не инфицированными ВИЧ людьми. Актуальность подобного рода исследований в целом и диссертационной работы Власовой В.В. в частности очевидна, поскольку сведения, полученные в ходе работы, могут составить основу для создания принципиально новых препаратов и индивидуализированных алгоритмов лечения, а значит, внести заметный вклад в преодоление последствий и предотвращение развития эпидемии ВИЧ-инфекции.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Все научные выводы и положения, выносимые на защиту, правомерны и основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованность которых не вызывает сомнений.

Результаты исследования представлены в убедительной форме, выводы диссертационной работы полностью соответствуют ее содержанию.

Данные, полученные в работе, опубликованы в ведущих отечественных и международных научных изданиях по соответствующей диссертации тематике, неоднократно были доложены научному сообществу как в виде научных публикаций, так и в форме активного участия в работе международных и российских научных конференций, где автором были сделаны научные сообщения в форме устных либо постерных докладов.

Использованные автором методы и полученные ею результаты исследования однозначно позволяют утверждать, что работа полностью соответствует паспорту специальности 3.2.7. Иммунология и относится к отрасли биологические науки.

Достоверность и новизна полученных результатов. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждена уровнем публикаций. Все методы анализа выбраны адекватно задачам, соответствуют современным международным стандартам, использовано современное оборудование и тест-системы; публикации содержат материал исследований, представленный в международно принятой форме.

Научная новизна полученных результатов заключается в установлении нескольких ранее неизвестных фактов, в частности, впервые исследованы особенности метаболизма CD4⁺ Т-клеток у иммунологических неответчиков; продемонстрирована связь нарушений метаболизма с низкой эффективностью регенерации CD4⁺ Т-клеток и их истощением. Впервые показано, что повышенное потребление субстратов CD4⁺ Т-клетками памяти у неответчиков не реализуется повышением их биоэнергетической активности.

Значимость для науки и практики результатов диссертационного исследования. Научная значимость проведенного исследования носит фундаментально-прикладной характер, так как его результаты проливают свет на ранее неизвестные причины несоответствия вирусологического и иммунологического ответа на терапию ВИЧ-инфекции. Как показано автором, эти причины связаны с метаболизмом CD4⁺ Т-лимфоцитов и его влиянием на пролиферативные возможности этих клеток. Выяснено, что, несмотря на повышенное потребление субстратов, процессы клеточного дыхания в

CD4+ Т-лимфоцитах ослаблены, что непосредственно связано с истощением CD4+ Т-клеток; отметим, что феномен истощения применительно к CD4+ Т-клеткам пока еще изучен очень мало, и полученные данные очень важны.

Результаты анализа метаболизма CD4+ Т-клеток памяти у ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков способствуют расшифровке причин невосстановления числа и функции этих клеток и, следовательно, нарушения функционирования иммунной системы в целом у лиц, получающих антиретровирусную терапию (АРТ) и достигших эффективного вирусологического ответа. Оценка показателей метаболизма CD4+ Т-клеток памяти на практике может дать возможность в будущем прогнозировать иммунологический неответ и вовремя корректировать схемы лечения. Полученные результаты обсуждаются в ходе образовательного процесса на биологическом факультете ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 8 – в научных журналах, которые включены в Перечень ВАК по специальности 3.2.7. Иммунология, биологические науки, и/или индексируются в международных базах Web of Science и Scopus.

Оценка содержания работы. В качестве основного объекта исследования была выбрана клиническая группа ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ, у которых численность CD4+ Т-клеток восстанавливается недостаточно на протяжении всего периода вирусологически эффективного лечения («иммунологические неответчики»). Целью исследования стало определение особенностей метаболизма CD4+ Т-лимфоцитов у таких пациентов как возможной причины невосстановления числа и функции клеток.

Для достижения сформулированной цели автор поставил четыре задачи исследования, которые включали анализ особенностей метаболизма популяций CD4+ Т-лимфоцитов «иммунологических неответчиков» в состоянии покоя и при пролиферации; оценку уровня потребления субстратов и аутофагии в CD4+ Т-клетках; определение интенсивности процессов клеточного дыхания; анализ возможной ассоциации между метаболизмом, уровнем пролиферации и степенью истощения CD4+

Т-лимфоцитов памяти у «неответчиков».

Работа в целом написана по стандартной форме, научное содержание не вызывает вопросов и возражений. Текст написан уверенно, со знанием дела, на общепринятом научном языке. Оформление диссертации и списка использованной литературы полностью соответствует требованиям к подобным работам.

Содержание диссертации, в свою очередь, полностью отвечает ее целям и задачам. Введение содержит все необходимые структурные разделы, включая актуальность, цели и задачи, новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, положения, выносимые на защиту, методологию, степень достоверности, внедрение результатов исследования в практику, а также информацию о публикациях и выступлениях автора.

Обзор литературы (глава 1) содержит краткую характеристику причин иммунодефицита, формирующегося в ходе естественного патогенеза ВИЧ-инфекции. Затронуты вопросы состояния отдельных иммунных клеток при ВИЧ-инфекции, описаны возможные механизмы хронической неспецифической активации иммунной системы, роль апоптоза и пироптоза в гибели CD4⁺ Т-клеток. Отдельно рассматривается важный вопрос о роли нарушения архитектуры лимфатических узлов в дезорганизации миграции и контактов между иммунными клетками, приводящей к иммунодефициту. Приводится сравнение динамики событий в популяциях CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток и роль хронической иммунной активации в гибели этих клеток.

Значительное внимание уделено теме АРТ и изменениям иммунной системы на фоне ее эффективного применения. Обсуждается роль гомеостатической пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти в восстановлении численности клеток. Далее автор переходит к описанию проблемы неэффективного иммунологического ответа и непродуктивной пролиферации CD4⁺ Т-клеток у «неответчиков», указывая на отсутствие полного понимания этого феномена и его причин. Подробно обсуждается роль процессов клеточного дыхания в биосинтезе макромолекул, необходимых для обеспечения размножения клеток. Автор подходит к выводу о том, что нарушение метаболизма может стать причиной остановки пролиферации, при этом успешная АРТ в заметной, но не полной, степени восстанавливает метаболические процессы в CD4⁺ Т-клетках; у «неответчиков» изменение метаболизма CD4⁺ Т-клеток выражено в большей

степени, чем у пациентов со стандартным ответом на терапию. Наконец, причиной нарушения пролиферации может быть истощение популяций Т-лимфоцитов, связанное с метаболическими нарушениями; такая возможность обсуждается в заключении обзора.

В главе «Материалы и методы» (глава 2) автор дает полную характеристику объектам и материалам, использованным в работе, включая группы пациентов и критерии их подбора; подробно описаны анализ субпопуляций Т-лимфоцитов, анализ показателей истощения клеток, оценка потребления метаболических субстратов и аутофагии, определение активности митохондриального дыхания и гликолиза и другие лабораторные методы, а также методы статистического анализа результатов. Выбор методов полностью оправдан целью и задачами исследования.

В главе «Результаты и обсуждение» (глава 3) автор переходит к описанию полученных им экспериментальных результатов. Этот раздел работы содержит полный набор и анализ данных, полученных в ходе исследований.

Подробно и последовательно изложен ход экспериментов, посвященных решению всех задач исследования. В частности, приведены результаты оценки митотической активности CD4⁺ Т-лимфоцитов с использованием маркеров пролиферации Ki-67 и CD71. Показано, что уровень гомеостатической пролиферации у ВИЧ-инфицированных пациентов повышен по сравнению с контролем, при этом доля пролиферирующих элементов была наибольшей в группе «неответчиков», а основным источником регенерации явились клетки памяти. Кроме этого, CD4⁺ Т-клетки памяти «неответчиков» активно экспрессируют ингибиторные рецепторы PD-1 и TIM-1, что может быть свидетельством их истощения.

Поскольку метаболические нарушения могут приводить к уменьшению содержания «строительного материала» для синтеза макромолекул, необходимых для пролиферации Т-клеток, дальнейшие исследования были сосредоточены на анализе метаболизма. В частности, показано, что в пролиферирующих CD4⁺ Т-клетках уровень захвата глюкозы повышен; покоящиеся CD4⁺ Т-клетки памяти «неответчиков» (но не наивные клетки) обладают повышенной метаболической активностью и легко могут перейти в состояние деления. Повышенное потребление глюкозы не приводит к повышению аэробного гликолиза и, предположительно, биосинтеза нуклеотидов, белков и липидов, необходимых для пролиферации. Дополнительно к этому

продемонстрировано активное потребление других субстратов Т-клетками «неответчиков», в частности, экзогенных жирных кислот; повышение уровня экспрессии транспортера глутамина; усиление аутофагии. Все это может указывать на интенсификацию метаболических путей, связанных с биосинтезом, который, впрочем, может оказаться незавершенным.

В завершение работы была произведена оценка активности дыхательной цепи митохондрий CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти. Как оказалось, скорость потребления кислорода, так же как и резервная дыхательная емкость митохондрий, были снижены у пациентов с дискордантным ответом на АРТ. Авторы высказывают предположение о том, что функциональные нарушения в работе митохондрий в исследованной группе пациентов могут быть связаны с сигнализацией через ингибиторные рецепторы и отражаются на пролиферативном потенциале клеток.

В разделах «Заключение» рассматриваются основные результаты, полученные в работе, и обосновываются главные выводы. Автор кратко описывает феномен иммунологического «неответа» и современные представления о его причинах, подчеркивая роль CD4⁺ Т-клеток эффекторной памяти и их способности к регенерации. Основной вопрос работы состоял в том, чтобы определить причины неспособности CD4⁺ Т-клеток памяти у «неответчиков» к восстановлению численности популяции при наличии высокого пролиферативного потенциала. Кратко суммируя полученные результаты, автор подходит к выводам о том, что CD4⁺ Т-клетки памяти «неответчиков» характеризуются метаболическими нарушениями, при этом высокий уровень потребления эндогенных и экзогенных субстратов не реализуется в виде интенсивного клеточного дыхания. Недостаточная эффективность биоэнергетических путей приводит к снижению регенераторного потенциала CD4⁺ Т-клеток памяти.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с традиционными требованиями к оформлению диссертаций и включает введение, обзор литературы, главы с описанием материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический список, включающий 423 ссылки на источники литературы, а также перспективы дальнейшей разработки темы, практические рекомендации и список сокращений и условных обозначений. Результаты работы иллюстрированы 30-ю рисунками и 2-мя таблицами.

Значительные объемы исследования и разнообразие последовательно проведенных экспериментальных работ с использованием широкого круга лабораторных методов позволили получить исчерпывающую информацию из каждого эксперимента и выбрать наиболее перспективные направления для будущих исследований. Исследование, проведенное автором работы, характеризуется как цельное, тщательно спланированное и завершенное. Личный вклад автора можно оценить как высокий.

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы нет.

Вопросы:

1. Как часто в вашей практике встречались «иммунологические неответчики»?
2. В работе обсуждается роль хронической активации в формировании иммунодефицита, однако исследования этого показателя не производили. Планируете ли вы провести эксперименты по оценке традиционных маркеров активации у «иммунологических неответчиков»?
3. Какие существуют перспективы в отношении возможности коррекции метаболических нарушений у «иммунологических неответчиков»?

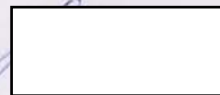
Указанные вопросы не связаны с какими-либо недостатками работы, а вызваны исключительно любопытством оппонента.

Заключение. Диссертация Власовой Виолетты Викторовны на тему: «Особенности метаболизма CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных лиц, принимающих антиретровирусную терапию», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология, является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой решена научная задача, имеющая существенное значение для специальности 3.2.7. Иммунология, биологические науки, заключающаяся в определении метаболических свойств CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов со стандартным и дискордантным иммунологическим ответом на антиретровирусную терапию.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Власовой В.В. полностью соответствует требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного Постановлением

правительства РФ № 842 от 24.09.2013, с изм. и доп. от 30.07.2014 г., 21.04.2016 г., 02.08.2016 г., 29.05.2017 г., 28.08.2017 г., 01.10.2018 г., 20.03.2021 г., 11.09.2021 г., 26.09.2022 г., 26.01.2023 г., 18.03.2023 г., 26.10.2023 г., 25.01.2024 г., 16.10.2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Власова Виолетта Викторовна, достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук,
главный специалист лаборатории
биологии лентивирусов
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»



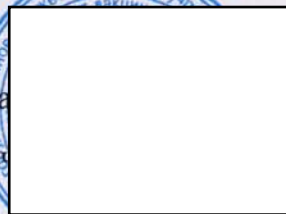
М.Р. Бобкова

«20.03» 2025 года

Подпись д.б.н. Бобковой М. Р.

ЗАВЕРЯЮ

Начальник ОК ФГБНУ «Научно-исследова
институт вакцин и сывороток им. И.И. Меч



Е. В. Лукачева

Название и адрес организации: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова». Адрес: 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, д.5а. Тел. +7(495) 917-49-00, E-mail: mech.inst@mail.ru

Отзыв официального оппонента Бобковой М.Р. поступил «25» марта 2025 г.

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента ознакомлена «25» марта 2025 г.

Соискатель



В.В. Власова