

ЕЛФИМОВ КИРИЛЛ АРТЕМОВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСТРОЙ СТАДИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ СУБ-
СУБТИПОМ А6 И CRF63_02А6 ВИЧ-1

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Научный руководитель:	Гашникова Наталья Матвеевна , кандидат биологических наук, и.о. заведующей отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Официальные оппоненты:	Денисов Евгений Владимирович , доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования РФ Шаршов Кирилл Александрович , кандидат биологических наук, руководитель лаборатории Молекулярной эпидемиологии и биооразнообразия вирусов ФГБНУ ФИЦ ФТМ.
Ведущая организация:	Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «09» октября 2026 г. в 12-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2026 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. ВИЧ-инфекция является одной из наиболее значимых социальных инфекций. Несмотря на эффективность современной антиретровирусной терапии, позволяющей подавлять репликацию ВИЧ-1 и предотвращать развитие терминальной стадии заболевания, ВИЧ-инфекция остается неизлечимой. В связи с этим сохраняется необходимость изучения молекулярных механизмов вирусной персистенции, формирования провирусных резервуаров, взаимодействия вируса с клетками иммунной системы и факторов, определяющих прогрессирование заболевания.

Особое значение имеет исследование острой стадии ВИЧ-инфекции, поскольку именно в этот период формируются ключевые вирусологические и иммунологические особенности последующего течения заболевания. Иммунный ответ в острую стадию включает в себя сложные реакции отдельных клеток иммунной системы, их активность и эпигенетические изменения, а также межклеточные взаимодействия. Внедрение высокопроизводительных технологий, включая секвенирование нового поколения и секвенирование РНК единичных клеток, существенно расширило возможности изучения иммунного ответа на ВИЧ-инфекцию, транскриптомных изменений иммунных клеток и межклеточных сигнальных взаимодействий. Однако комплексные данные, объединяющие вирусологическую характеристику клинических изолятов, оценку провирусного ландшафта и анализ транскриптома единичных клеток в острую стадию инфекции, остаются ограниченными.

Одной из важных характеристик ВИЧ-1, имеющей как фундаментальное, так и клиническое значение, является тропность вируса, то есть способность использовать корецепторы CCR5 (R5) или CXCR4 (X4) для проникновения в клетку-мишень. Область V3 петли gp120 является основным детерминантом этого взаимодействия. На ранних стадиях инфекции обычно доминируют R5-тропные варианты, тогда как появление X4-тропных или R5/X4-штаммов с двойной тропностью связано с ускоренным снижением числа CD4⁺ Т-лимфоцитов и более быстрым прогрессированием заболевания. Кроме того, определение тропности необходимо перед назначением антагонистов CCR5, включая маравирик. В связи с этим точная оценка тропности клинических изолятов ВИЧ-1 имеет важное значение как для понимания патогенеза инфекции, так и для выбора терапевтической тактики.

В последние годы все большее внимание уделяется субтип-специфическим особенностям генетических вариантов ВИЧ-1, включая редкие и локально

распространенные субтипы и некоторые CRF (D, CRF02_AG). Наиболее распространенным геновариантом ВИЧ-1 в Российской Федерации является суб-субтип А6, тогда как в Сибирском Федеральном Округе после 2010 года развитие эпидемии определяет циркулирующая рекомбинантная форма CRF63_02A6. Параллельная циркуляция этих геновариантов создает условия для возникновения новых рекомбинантных форм. Несмотря на эпидемиологическую значимость А6 и CRF63_02A6, их молекулярно-биологические и вирусологические свойства, особенно в острую стадию инфекции, изучены недостаточно. В частности, отсутствуют комплексные данные о тропности вирусов-основателей, провирусном ландшафте, транскриптомном профиле иммунных клеток и особенностях межклеточной коммуникации при инфекции, вызванной этими генетическими вариантами.

Дополнительной нерешенной проблемой является ограниченная применимость существующих биоинформатических инструментов генотипического предсказания тропности к российским геновариантам ВИЧ-1. Большинство таких алгоритмов разрабатывалось преимущественно на последовательностях субтипов В и С, что снижает их эффективность при анализе не-В субтипов и некоторых рекомбинантных форм. Это обосновывает необходимость разработки специализированных моделей, адаптированных к суб-субтипу А6 и CRF63_02A6. Таким образом, актуальность настоящего исследования определяется необходимостью комплексной характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной регионально значимыми вариантами ВИЧ-1, а также разработкой подходов, позволяющих более точно оценивать их тропность, провирусный резервуар и влияние на иммунные клетки периферической крови.

Цель исследования – комплексная характеристика молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1.

Задачи исследования:

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать клинико-лабораторные показатели острой ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6, у лиц на стадиях 2Б– 2В (по классификации Покровского)/стадиях I-V по классификации Fiebig и создать коллекцию моноклеаров периферической крови, обеспечивающую все последующие молекулярно-генетические и вирусологические этапы работы.

2. Провести вирусологическую характеристику клинических изолятов ВИЧ-1, выделенных в острой стадии инфекции: на основе полногеномного секвенирования идентифицировать их генетические варианты и сформировать панель фенотипированных

штаммов как основу для разработки и валидации алгоритма генотипического предсказания тропности.

3. Оценить тропность клинических изолятов ВИЧ-1 генотипическими методами (*in silico*) и вирусологическими методами (*in vitro*). Разработать и валидировать модель генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1 для суб-субтипа А6 и CRF63_02A6 на основе нуклеотидной последовательности V3 gp120.

4. Получить количественную характеристику провирусного ландшафта ВИЧ-1 в мононуклеарных клетках периферической крови, включая оценку общего числа, дефектных и интактных провирусных геномов.

5. Исследовать транскриптомный профиль единичных мононуклеаров периферической крови и особенности межклеточной коммуникации при острой ВИЧ-инфекции, вызванной вариантами А6 и CRF63_02A6.

Научная новизна. В настоящей работе впервые выполнена комплексная вирусологическая и молекулярно-генетическая характеристика острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной эпидемически значимыми для Российской Федерации генетическими вариантами ВИЧ-1 - суб-субтипом А6 и циркулирующей рекомбинантной формой CRF63_02A6. Получены новые данные о тропности клинических изолятов ВИЧ-1 на ранней стадии инфекции, проведено сопоставление фенотипического определения тропности *in vitro* с результатами генотипического прогнозирования *in silico*. Впервые систематически оценена применимость существующих алгоритмов генотипического предсказания тропности к изолятам А6 и CRF63_02A6 и показана необходимость разработки специализированных моделей для российских геновариантов ВИЧ-1.

Разработана и валидирована модель машинного обучения HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1 на основе последовательности V3-петли gp120. Впервые для острой инфекции, вызванной А6 и CRF63_02A6, получена количественная характеристика провирусного ландшафта методом анализа интактной провирусной ДНК, включая оценку общего числа, дефектных и интактных провирусных геномов. С использованием секвенирования РНК единичных клеток впервые охарактеризованы транскриптомные изменения мононуклеаров периферической крови при острой инфекции, вызванной данными вариантами ВИЧ-1, выявлены изменения клеточного состава, перестройка межклеточной коммуникации с формированием центральной роли неклассических моноцитов, а также нарушения сигнальных взаимодействий в регуляторных популяциях иммунных клеток.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы определяется получением комплексных данных о молекулярно-генетических и

вирусологических особенностях острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной эпидемически значимыми для Российской Федерации генетическими вариантами ВИЧ-1 - суб-субтипом А6 и циркулирующей рекомбинантной формой CRF63_02А6. Полученные результаты расширяют представления о патогенезе ранней стадии ВИЧ-инфекции, включая особенности тропности клинических изолятов, формирование провирусного ландшафта и изменения транскрипционного профиля моноклеаров периферической крови. Выявленные изменения клеточного состава, экспрессии генов и межклеточной коммуникации уточняют механизмы ранней иммунной дисфункции при инфекции, вызванной регионально значимыми вариантами ВИЧ-1.

Практическая значимость исследования связана с разработкой и валидацией инструмента HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности ВИЧ-1 на основе последовательности V3-петли gp120. Программа реализована в виде автономного приложения с графическим интерфейсом для операционной системы Windows и может использоваться в работе вирусологических лабораторий без необходимости специальной биоинформатической подготовки. Применение HIV-V3Augur позволяет оценивать тропность изолятов суб-субтипа А6 и CRF63_02А6, что имеет значение для обоснованного назначения антагонистов CCR5 и оценки риска быстрого прогрессирования заболевания.

Разработанный подход к количественной оценке провирусного ландшафта методом цифровой ПЦР с использованием праймеров и зондов, адаптированных для российских геновариантов ВИЧ-1, может быть использован для мониторинга общего, дефектного и интактного пулов провирусной ДНК. Полученные данные о транскриптомных профилях иммунных клеток при острой ВИЧ-инфекции создают основу для дальнейшего поиска биомаркеров прогрессирования заболевания и потенциальных мишеней для иммунотерапевтических вмешательств. Результаты исследования также могут быть использованы при планировании дальнейших работ по эпидемиологическому надзору, прогнозированию течения инфекции и разработке субтип-специфичных подходов к анализу регионально значимых вариантов ВИЧ-1.

Методология и методы исследования. В работе использован комплекс молекулярно-биологических, вирусологических, биоинформатических и статистических методов. Исследование включало формирование когорты пациентов с острой ВИЧ-инфекцией, выделение и криоконсервацию моноклеарных клеток периферической крови, выделение геномной РНК ВИЧ-1 из плазмы крови, получение полногеномных последовательностей вируса методом секвенирования нового поколения, генотипирование и филогенетический анализ клинических изолятов. Вирусологический блок методов включает изоляцию инфекционного вирусного изолята в культуре моноклеарных клеток

и фенотипическое определение тропности с использованием клеточных линий, экспрессирующих корецепторы CCR5 или CXCR4. Для оценки тропности ВИЧ-1 были сопоставлены существующие генотипические алгоритмы и разработаны собственные модели машинного обучения на основе признаков, рассчитываемых по последовательности V3-петли gp120, с последующей реализацией программного инструмента HIV-V3Augur. Количественную оценку общего, дефектного и интактного пулов провирусной ДНК проводили методом цифровой ПЦР с использованием подхода анализа интактной провирусной ДНК. Транскриптомный профиль моноклеаров периферической крови изучали методом секвенирования РНК единичных клеток с последующей биоинформатической обработкой, аннотацией клеточных популяций, анализом дифференциальной экспрессии генов и реконструкцией сетей межклеточной коммуникации. Статистический анализ включал методы оценки эффективности моделей генотипического предсказания тропности, анализ дифференциальной экспрессии и коррекцию батч-эффектов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6, обнаруживаются штаммы вируса всех видов тропности, что не характерно для ранней стадии ВИЧ-инфекции.
2. В острой стадии ВИЧ-инфекции происходит формирование гетерогенного провирусного резервуара с преобладанием дефектных провирусных копий.
3. Фенотипическая оценка тропности изолятов ВИЧ-1 в сочетании с разработкой собственной модели генотипического предсказания по последовательности V3 позволяет создать специализированный инструмент для оценки тропности ВИЧ-1 субтипа A6 и CRF63_02A6, более точный для российских вариантов вируса, чем универсальные алгоритмы, изначально разработанные преимущественно для других генетических вариантов ВИЧ-1, распространяющихся в мире.
4. Для острой ВИЧ-инфекции характерна выраженная перестройка транскриптома ключевых антивирусных популяций моноклеарных клеток (Т-клеток памяти, неклассических моноцитов, NK-клеток, дендритных клеток и т.д.). При этом транскриптомный профиль нельзя однозначно охарактеризовать как негативный или положительный – присутствуют гены, ассоциированные и с устойчивостью к заболеванию, и с его прогрессией.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертация отвечает требованиям, предъявляемым к научной специальности 1.5.10 «Вирусология»

(биологические науки). Её содержание соответствует пунктам 3, 4, 6, 9 паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных молекулярно-биологических, вирусологических, биоинформатических и статистических методов, стандартизованных протоколов, валидированных референсных наборов данных, критериев включения пациентов в исследование, а также применением цифровой ПЦР, секвенирования нового поколения, секвенирования РНК единичных клеток и методов машинного обучения; основные результаты работы были представлены на всероссийских и международных научных конференциях и опубликованы в рецензируемых научных изданиях.

Апробация результатов. Тема диссертации утверждена на ученом совете ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 6 мая 2026 г. Апробация диссертации состоялась 10 июня 2026 г. на научном семинаре ФБУН ГНЦ ВБ Вектор (Протокол №3).

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на 3 всероссийских и международных научных конференциях: IV Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 22–26 июня 2025 г.), XII Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2025» (Москва, 11–13 ноября 2025 г.), XXVI Всероссийской научно-практической конференции «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией» (Суздаль, 8–10 октября 2025 г.).

Декларация личного участия автора. Автор принимал непосредственное участие во всех ключевых этапах выполнения диссертационного исследования: формулировке цели и задач, разработке критериев включения пациентов, планировании экспериментальных и аналитических этапов, систематизации клинического и лабораторного материала.

Автором лично выполнена значительная часть лабораторной работы, включая выделение РНК из плазмы крови, изоляцию моноклеарных клеток периферической крови, выделение ДНК из моноклеаров, а также участие в фенотипическом определении тропности клинических изолятов ВИЧ-1.

Автором проведена оценка эффективности существующих методов генотипического определения тропности, разработаны и валидированы модели машинного обучения для предсказания тропности изолятов суб-субтипа А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, а также создан графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur.

Работы, связанные с подготовкой клеточного материала к секвенированию транскриптома единичных клеток, включая получение суспензии единичных клеток, обратную транскрипцию, амплификацию кДНК, очистку и отбор фрагментов, а также

подготовку библиотек, выполнялись при непосредственном участии автора и совместно с коллегами под его кураторством.

Автором совместно с коллегами выполнены предобработка, биоинформатическая и статистическая интерпретация данных секвенирования РНК единичных клеток, анализ дифференциальной экспрессии генов, аннотация клеточных популяций, обобщение и интерпретация полученных результатов, а также подготовка основных разделов диссертации. Научные публикации по теме диссертационного исследования подготовлены лично автором. Суммарное личное участие автора в выполнении диссертационной работы составило не менее 80 %.

Общее руководство работой осуществлялось и.о. заведующей отделом ретровирусов, к.б.н. Н.М. Гашниковой. Работа была выполнена в 2022-2026 гг.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 6 научных работ, из них - 3 статьи, опубликованных в высокорейтинговых журналах, индексируемых в базах РИНЦ, Web of Science и Scopus, а также 3 тезиса в сборниках материалов всероссийских и международных конференций и конгрессов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 180 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», результатов собственных исследований, обсуждения проведенной работы, заключения, выводов и списка литературы, включающего 207 источников отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 31 рисунком и содержит 5 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования. В исследование были включены ВИЧ-положительные пациенты в острой стадии инфекции и здоровые доноры крови без антител к ВИЧ и антигенов ВИЧ. Критериями включения ВИЧ-положительных лиц являлись документированный временной интервал инфицирования, не превышающий четырех недель на момент забора крови, отрицательные или неопределенные результаты иммуноблоттинга, высокая вирусная нагрузка, а также наличие клинико-эпидемиологических данных в анамнезе. Все участники предоставили письменное информированное согласие; протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» г. Владивостока. Биологическим материалом служила цельная периферическая кровь, из которой выделяли моноклеарные клетки периферической крови (МПК) с их последующей криоконсервацией. Для контрольной группы при анализе транскриптома единичных клеток использовали данные МПК здоровых доноров из ранее проведенного исследования.

Получение полногеномных нуклеотидных последовательностей изолятов ВИЧ-

1. Для молекулярно-генетической характеристики клинических изолятов ВИЧ-1 из плазмы крови выделяли вирусную РНК, после чего получали последовательности, охватывающие почти полный геном вируса, с использованием двухэтапной гнездовой ПЦР и секвенирования нового поколения на платформе Illumina MiSeq. Сборку вирусных геномов выполняли с применением специализированных программных пакетов, множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием MAFFT, а генотипирование и филогенетический анализ осуществляли на основе сравнения с референсными последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международных баз данных. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия с оценкой надежности топологии бутстреп-анализом; наличие рекомбинационных событий анализировали с использованием инструмента RIP v. 3.0, который доступен на сайте Los Alamos National Laboratory.

Фенотипическое определение тропности изолятов ВИЧ-1. Вирусологическую характеристику клинических штаммов ВИЧ-1 проводили путем их выделения из моноклеарных клеток периферической крови ВИЧ-положительных пациентов при совместном культивировании с МПК ВИЧ-отрицательных доноров. Репликативную активность изолятов оценивали по накоплению вирусного белка p24 в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа. Фенотипическое определение тропности выполняли с использованием клеточных линий U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4; изоляты классифицировали как R5-, X4- или R5/X4-тропные в зависимости от способности вируса реплицироваться в соответствующих клеточных культурах.

Сравнение генотипических инструментов предсказания тропности ВИЧ-1 и разработка собственного инструмента на основе машинного обучения HIV-V3Augur. Для оценки применимости существующих генотипических методов предсказания тропности были сформированы референсные наборы последовательностей V3-петли gp120 ВИЧ-1 с фенотипически подтвержденной тропностью из базы данных Los Alamos National Laboratory. В анализ включали последовательности основных генетических вариантов группы М ВИЧ-1, а также последовательности фенотипированных изолятов суб-субтипа А6 и CRF63_02A6, полученные в ходе настоящего исследования. Для генотипического предсказания тропности использовали как простые правила, основанные на аминокислотных позициях и суммарном заряде V3-петли, так и существующие машинно-обучаемые алгоритмы. Собственные модели машинного обучения строили на основе признаков, рассчитанных по нуклеотидной и аминокислотной последовательности V3

gp120, включая аминокислотный состав, суммарный заряд, относительное использование синонимичных кодонов и псевдоаминокислотный состав. Для классификации использовали алгоритмы RandomForest, SVM и ансамблевые подходы; качество моделей оценивали с применением стратифицированной кросс-валидации и стандартных метрик бинарной классификации. На основе разработанных моделей был создан графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur для генотипирования и предсказания тропности изолятов ВИЧ-1.

Исследование ландшафта провирусных резервуаров ВИЧ-1. Для количественной характеристики провирусного ландшафта ВИЧ-1 в МПК была адаптирована схема анализа интактной провирусной ДНК методом цифровой ПЦР. Праймеры и зонды для вирусных мишеней были подобраны с учетом полногеномных последовательностей геновариантов A6, B и CRF63_02A6, циркулирующих на территории стран бывшего СССР, а их консервативность оценивали биоинформатически. В качестве клеточной мишени использовали ген RPP30, позволяющий оценивать количество анализируемых клеток и степень фрагментации ДНК. Цифровую ПЦР выполняли на системе QIAcuity, а анализ результатов проводили в программном обеспечении QIAcuity Software Suite; количество общего, дефектного и интактного пула провирусной ДНК рассчитывали на 10^6 МПК.

Исследование транскриптома единичных мононуклеаров периферической крови. Транскриптомный профиль единичных МПК исследовали с использованием технологии 10x Genomics. Получение суспензии единичных клеток, обратную транскрипцию, амплификацию кДНК, подготовку библиотек и секвенирование выполняли по протоколам производителя с последующим контролем качества кДНК и библиотек. Необработанные данные секвенирования обрабатывали с помощью CellRanger; контроль качества, фильтрацию клеток, нормализацию, интеграцию данных, коррекцию батч-эффектов, кластеризацию и визуализацию выполняли в среде R с использованием пакетов Seurat и Harmony. Аннотацию клеточных популяций проводили на основе сочетания ручного анализа канонических маркеров и референс-ориентированного подхода Azimuth. Дифференциальную экспрессию генов анализировали как на уровне отдельных клеточных популяций, так и с применением pseudo-bulk подхода; функциональное обогащение оценивали по терминам Gene Ontology. Сети межклеточной коммуникации реконструировали с использованием пакета CellChat на основе лиганд-рецепторных взаимодействий.

Статистический анализ результатов исследования. Статистическую обработку данных выполняли в среде R и Python. Для оценки эффективности моделей генотипического предсказания тропности рассчитывали точность, чувствительность,

специфичность, коэффициент корреляции Мэтьюса, AUC и каппу Коэна. Сравнение моделей проводили с использованием обобщенных линейных смешанных моделей с учетом субтипа вируса и парной структуры данных. Для транскриптомных данных применяли методы анализа дифференциальной экспрессии, коррекцию множественных сравнений, оценку устойчивости результатов с использованием подвыборок клеток, а также визуализацию данных с помощью UMAP, тепловых карт, вулкан-графиков и графов межклеточных взаимодействий.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование были включены пациенты с острой ВИЧ-инфекцией, для которых был сформирован клинико-вирусологический массив, включающий результаты генотипирования, фенотипирования изолятов, анализа провирусной ДНК и профилирования единичных мононуклеаров периферической крови. Для разработки и валидации моделей генотипического предсказания тропности дополнительно использовали образцы пациентов с другими стадиями инфекции, однако эти данные служили исключительно для обучения и тестирования классификаторов. В качестве контрольной группы при анализе scRNA-seq использовали данные мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, сопоставимых по основным демографическим характеристикам.

Генотипирование изолятов ВИЧ-1. Генотипирование изолятов (Рисунок 1) по последовательностям почти полных геномов показало, что в собранной выборке преобладали штаммы CRF63_02A6 - 11 из 19 изолятов (57,9 %). Изоляты суб-субтипа A6 составили 4 из 19 (21,1 %). Кроме того, были выявлены уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1, суммарно представленные 4 изолятами (21,1 %): URF_A6/C/B - 1 изолят (5,3 %), URF_63/A6 — 1 изолят (5,3 %) и URF_A6/B — 2 изолята (10,5 %). Таким образом, исследованная выборка включала как основные эпидемически значимые для Российской Федерации геноварианты ВИЧ-1, так и несколько уникальных рекомбинантных форм.

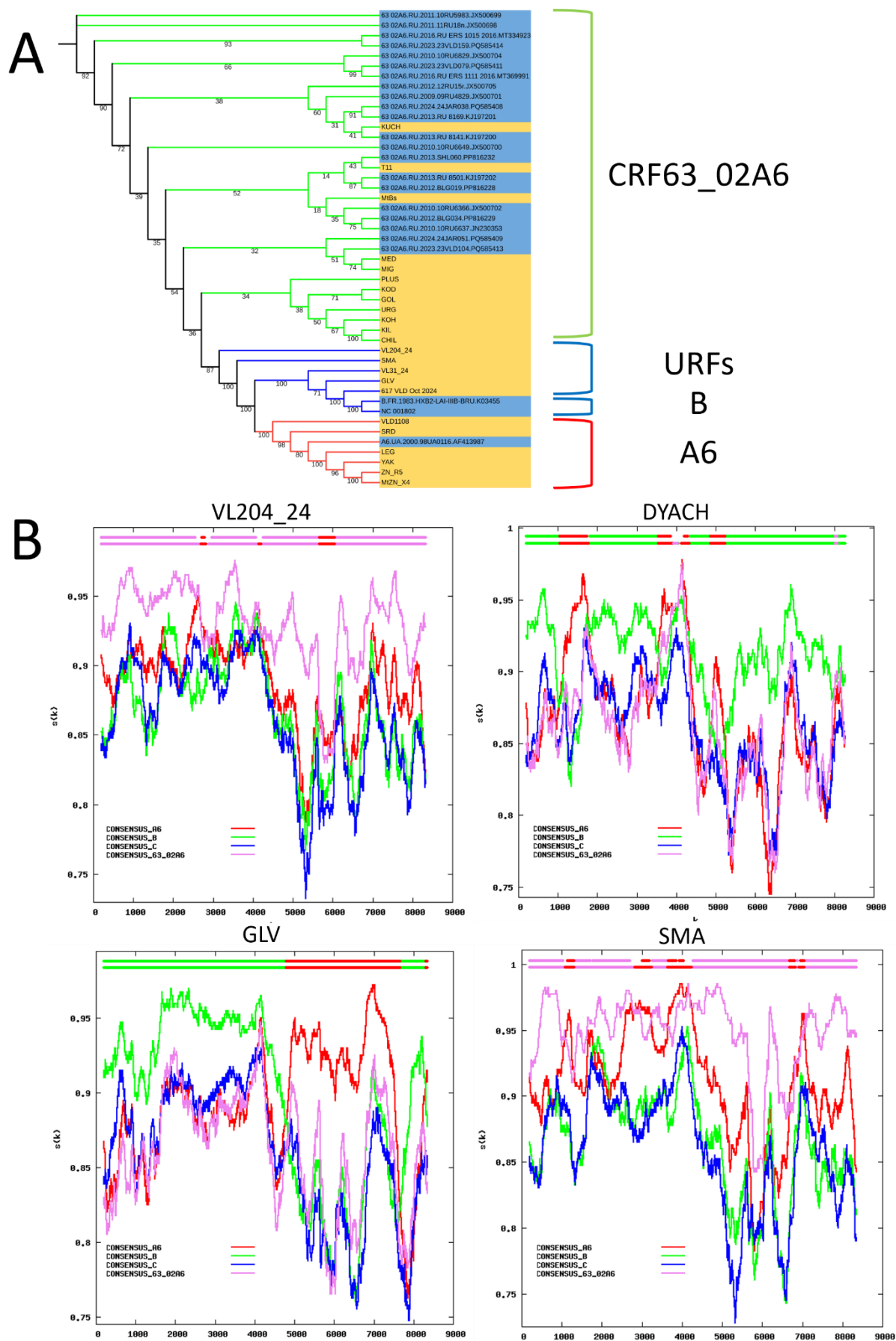


Рисунок 1 - Филогенетический анализ лабораторных последовательностей с определенным фенотипом тропности: (а) - филогенетическое дерево (Maximum Likelihood, bootstrap = 1000) на основе

полногеномных последовательностей ВИЧ-1. Желтым цветом отмечены лабораторные последовательности, синим - референсные. Генотип указан в квадратных скобках; (b) - RIP графики для изолятов, генотипированных как URF. Вертикальные линии указывают на области генома родительского варианта, цвет указывает на родительский генотип. Все изоляты имели область V3 (7092-7310) без участков рекомбинации и были отнесены в тестовой выборке к геноварианту, который сформировал участок V3.

Для дальнейшего анализа тропности особое значение имело происхождение участка гена *env*, включающего область V3 gp120. Анализ рекомбинантных изолятов показал, что область V3 gp120 не содержала участков рекомбинации, что позволило использовать ее для последующего фенотипического и генотипического анализа тропности. У изолята URF_A6/C/B и двух изолятов URF_A6/B область *env* происходила от суб-субтипа A6, тогда как у изолята URF_63/A6 — от CRF63_02A6. В связи с этим при формировании тестовых выборок рекомбинантные изоляты были отнесены к генетическому варианту, от которого была унаследована область *env*: URF_A6/C/B и URF_A6/B включены в группу A6, а URF_63/A6 — в группу CRF63_02A6. После такого распределения группа A6 составила 7 из 19 изолятов (36,8 %), а группа CRF63_02A6 - 12 из 19 изолятов (63,2 %).

Изоляция и фенотипирование штаммов ВИЧ из клинического материала. Для всех пациентов основной когорты, включавшей 14 ВИЧ-положительных лиц в острой стадии инфекции, были получены инфекционные штаммы ВИЧ-1. Для расширения фенотипической характеристики тропности ВИЧ-1 и последующего использования данных при разработке моделей генотипического предсказания вируса в анализ также были включены изоляты дополнительной когорты ВИЧ-положительных пациентов с хронической стадией инфекции. Таким образом, общая фенотипированная выборка составила 19 изолятов ВИЧ-1.

Фенотипическое определение тропности показало, что в исследованной выборке преобладали штаммы с одиночной R5-тропностью - 11 из 19 изолятов (57,9 %). Один изолят обладал одиночной X4-тропностью - 1 из 19 (5,3 %), тогда как двойная R5/X4-тропность была выявлена у 7 из 19 изолятов (36,8 %). Следовательно, в выборке были представлены все основные фенотипические варианты тропности ВИЧ-1: R5-, X4- и R5/X4-тропные штаммы. Выявление X4-тропных и вариантов с двойной тропностью среди изолятов, полученных от пациентов в острой стадии инфекции, вызванной A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, указывает на раннее присутствие вирусов, способных использовать CXCR4-зависимый путь проникновения в клетку, и подчеркивает необходимость точной оценки тропности при характеристике патогенетического потенциала клинических изолятов ВИЧ-1 и разработки генотипических предикторов.

Оценка эффективности существующих моделей генотипического предсказания тропности. Для оценки применимости существующих подходов к генотипическому предсказанию тропности ВИЧ-1 были протестированы восемь моделей и правил, основанных на анализе последовательности V3-петли gp120. В сравнительный анализ вошли классические правила 11/25, 11/24/25 и 5/11/25, правило суммарного заряда V3-петли NetCharge с различными пороговыми значениями, комбинированные правила Delobel и Garrido, а также более сложные алгоритмы Geno2pheno, PhenoSeq, T-CUP 2.0 и WebPSSM (Рисунок 2). Оценку эффективности проводили по точности, чувствительности, отражающей способность выявлять X4-тропные варианты, и специфичности, отражающей способность правильно определять R5-тропные варианты.

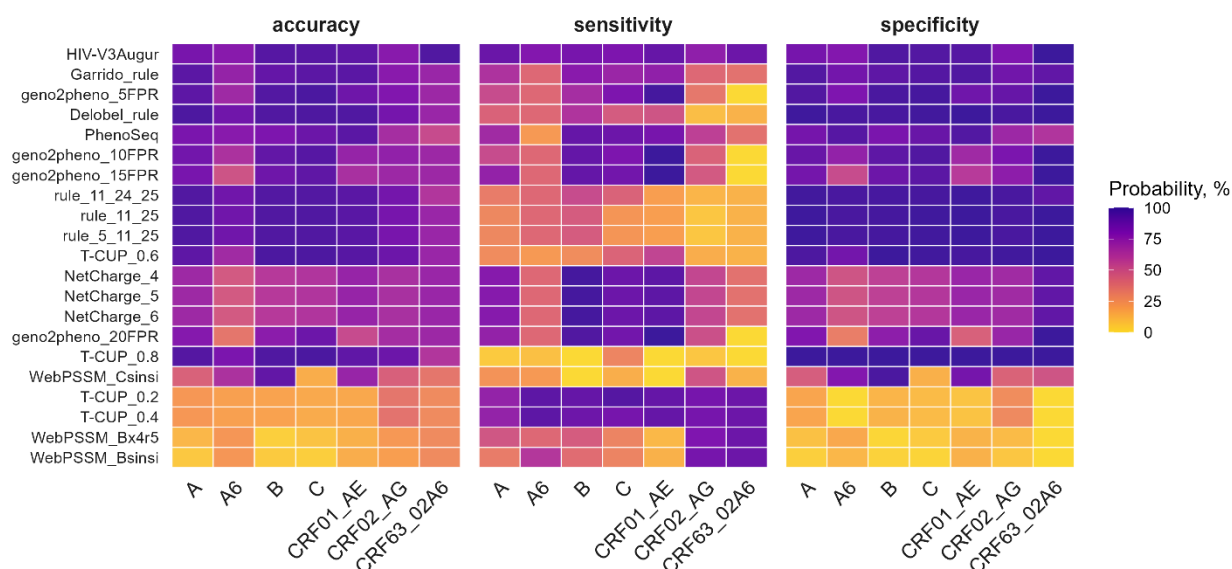


Рисунок 2 - Тепловая карта метрик качества моделей (точность, чувствительность и специфичность) для генотипического предсказания тропности штаммов ВИЧ-1 на основе нуклеотидных/аминокислотных последовательностей V3 gp120. Каждая ячейка окрашена в соответствии с величиной метрики: от желтого цвета (низкие значения, близкие к 0%) до тёмно-синего (высокие значения, близкие к 100 %). Данные получены на подвыборках последовательностей каждого субтипа или суб-субтипа (A, A6, B, C, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF63_02A6).

На общей выборке наибольшую точность среди существующих подходов продемонстрировало правило Delobel - 91,13 %, однако его высокая точность была обусловлена преимущественно специфичностью, достигавшей 99,81 %, тогда как чувствительность составляла только 34,45 %. Близкие значения точности показали классические правила 11/25, 11/24/25 и 5/11/25, а также T-CUP 2.0 с порогом 0,6, однако все эти подходы также характеризовались низкой чувствительностью, находившейся в диапазоне 22–28 %. Максимальную чувствительность показал T-CUP 2.0 с порогом 0,2 - 87,59 %, но при этом его специфичность была крайне низкой и составляла 0,12 %, что

ограничивает практическую применимость такого подхода. Наиболее сбалансированные показатели среди существующих простых правил были получены для комбинации NetCharge с порогами 4 и 5: чувствительность составила 77,33 %, специфичность — 68,64 %.

При анализе отдельных генетических вариантов было показано, что многие существующие инструменты демонстрируют высокую точность на глобально распространенных вариантах ВИЧ-1. Так, для субтипа В наилучшие результаты были получены для T-CUP 2.0 с порогом 0,6, для субтипа С - для Geno2pheno с FPR 5 %, а для CRF01_AE - для правила Delobel; точность этих подходов находилась на уровне 95–96 %. Однако при переходе к генетически отличающимся вариантам, значимым для Российской Федерации и стран бывшего СССР, эффективность моделей снижалась. Для CRF02_AG наилучшая точность составляла 86,41 %, а для CRF63_02A6 несколько наиболее удачных существующих моделей, включая Delobel, Garrido, NetCharge, правило 11/25 и T-CUP 2.0 с порогом 0,6, показывали точность только 71,76 %. При этом для суб-субтипа A6 и CRF63_02A6 даже модели с высокой специфичностью не обеспечивали одновременно приемлемую чувствительность. Следовательно, ни один из протестированных существующих инструментов не позволял надежно и сбалансированно предсказывать тропность изолятов A6 и CRF63_02A6, что обосновало необходимость разработки специализированной модели генотипического предсказания тропности для российских геновариантов ВИЧ-1.

Разработка и валидация модели HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1. Для предсказания тропности ВИЧ-1 на основе последовательности V3-петли gp120 была разработана модель HIV-V3Augur, включающая субтип-специфичные классификаторы. Для большинства генетических вариантов использовался ансамблевый подход, объединяющий алгоритмы Random Forest и SVM, а для CRF63_02A6 была применена отдельная модель, обученная с учетом происхождения области *env* от CRF02_AG (Рисунок 3).

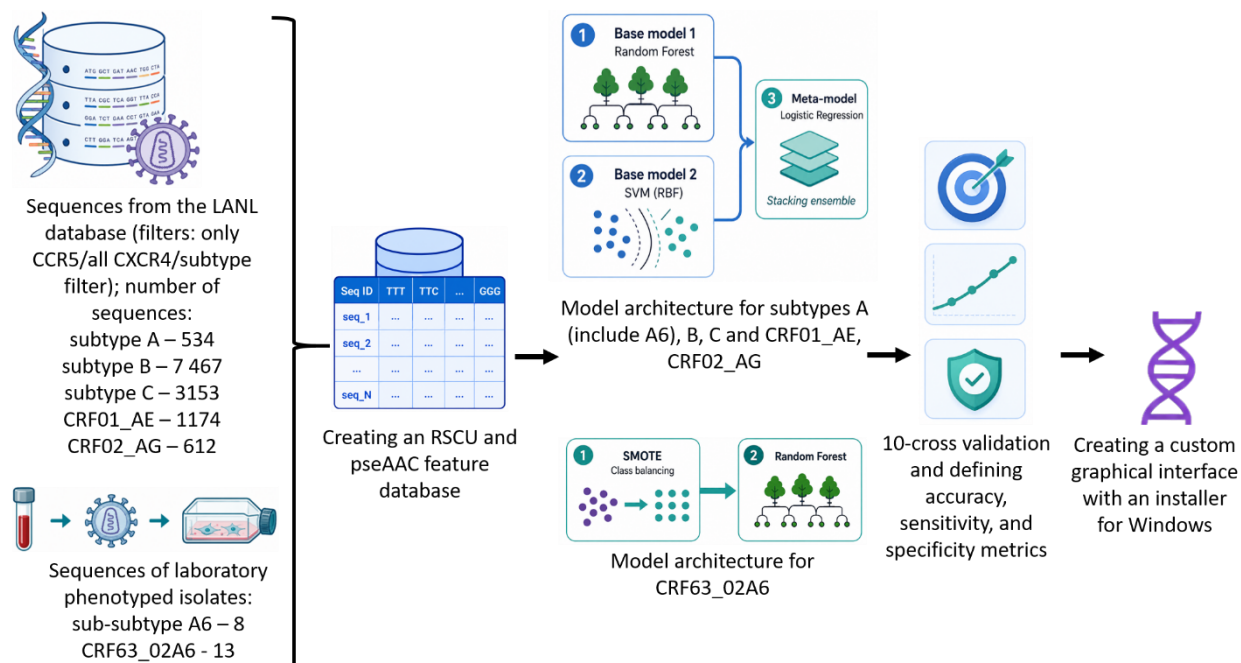


Рисунок 3 - Схема разработки модели HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1. Нуклеотидные последовательности области V3 gp120 использовались для расчета признаков, на основе которых выполнялось субтип-специфичное предсказание тропности. Для большинства генетических вариантов ВИЧ-1 применялся стекинг-ансамбль, включающий базовые модели Random Forest и SVM с логистической регрессией в качестве мета-классификатора. Для CRF63_02A6 использовалась отдельная схема классификации с балансировкой классов методом SMOTE и моделью Random Forest, обученной с учетом происхождения области env от CRF02_AG. Итогом анализа являлось предсказание корецепторной тропности изолята и оценка качества классификации.

Разработанная модель показала сбалансированные характеристики: медианная точность по всем субтипам составила 88,3 %, чувствительность - 83,29 %, специфичность - 98,91 % (Рисунок 4).

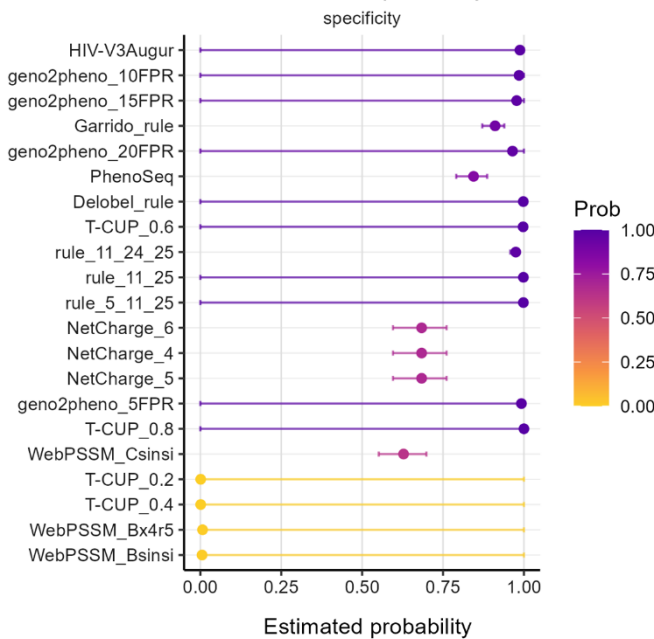
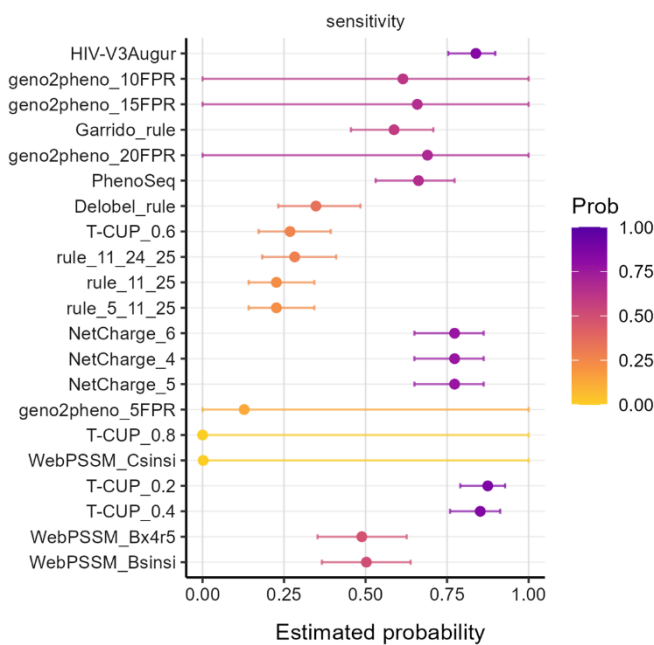
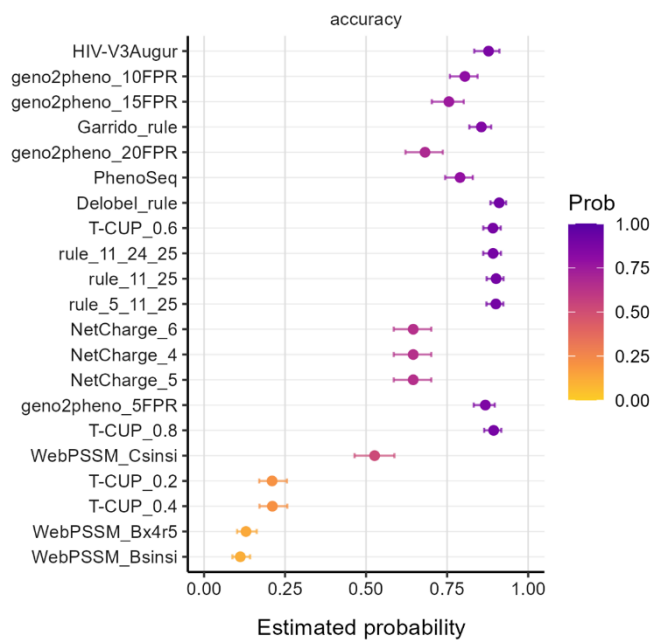


Рисунок 4 - Сравнение эффективности HIV-V3Augur и существующих генотипических методов предсказания тропности ВИЧ-1. Представлены оцененные вероятности для трех метрик качества классификации: точности, чувствительности и специфичности. Точками обозначены значения метрик для каждой модели или правила, горизонтальными линиями — интервалы неопределенности оценки; цветовая шкала отражает величину оцененной вероятности. HIV-V3Augur демонстрирует сбалансированное сочетание точности, чувствительности и специфичности, тогда как для ряда существующих методов высокая специфичность сопровождается снижением чувствительности или общей точности.

Наибольшее преимущество HIV-V3Augur было выявлено при анализе последовательностей суб-субтипа A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1. Для суб-субтипа A6 модель обеспечила более сбалансированное соотношение чувствительности и специфичности по сравнению с существующими инструментами, а для CRF63_02A6 достигла точности 94,91 %, чувствительности 86,6 % и специфичности 100 %. При анализе сбалансированной выборки HIV-V3Augur продемонстрировала наилучшие результаты для A6 и CRF63_02A6, что подтверждает целесообразность применения специализированного подхода к генотипическому предсказанию тропности российских геновариантов ВИЧ-1.

Графический интерфейс HIV-V3Augur. На основе разработанных моделей был создан графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur в виде автономного Windows-приложения. Программа позволяет загружать нуклеотидные последовательности в формате FASTA, выполнять автоматическое или ручное генотипирование, предсказывать тропность с использованием соответствующих субтип-специфичных моделей и сохранять результаты в формате CSV. Наличие графического интерфейса делает инструмент пригодным для использования в лабораторной практике без необходимости работы с командной строкой или самостоятельной настройки биоинформатических пайплайнов.

Провирусный ландшафт ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии инфекции. Количественная оценка клеточно-ассоциированной провирусной ДНК показала высокую представленность вирусных резервуаров в мононуклеарах периферической крови в период острой ВИЧ-инфекции. Медианное значение общего числа провирусных копий составило 26 034 копии на 10^6 клеток, при этом преобладающую часть составляли дефектные провирусные геномы — медиана 24 443 копии на 10^6 клеток. Медианное число интактных провирусных геномов было существенно ниже и составило 405 копий на 10^6 клеток (Рисунок 5).

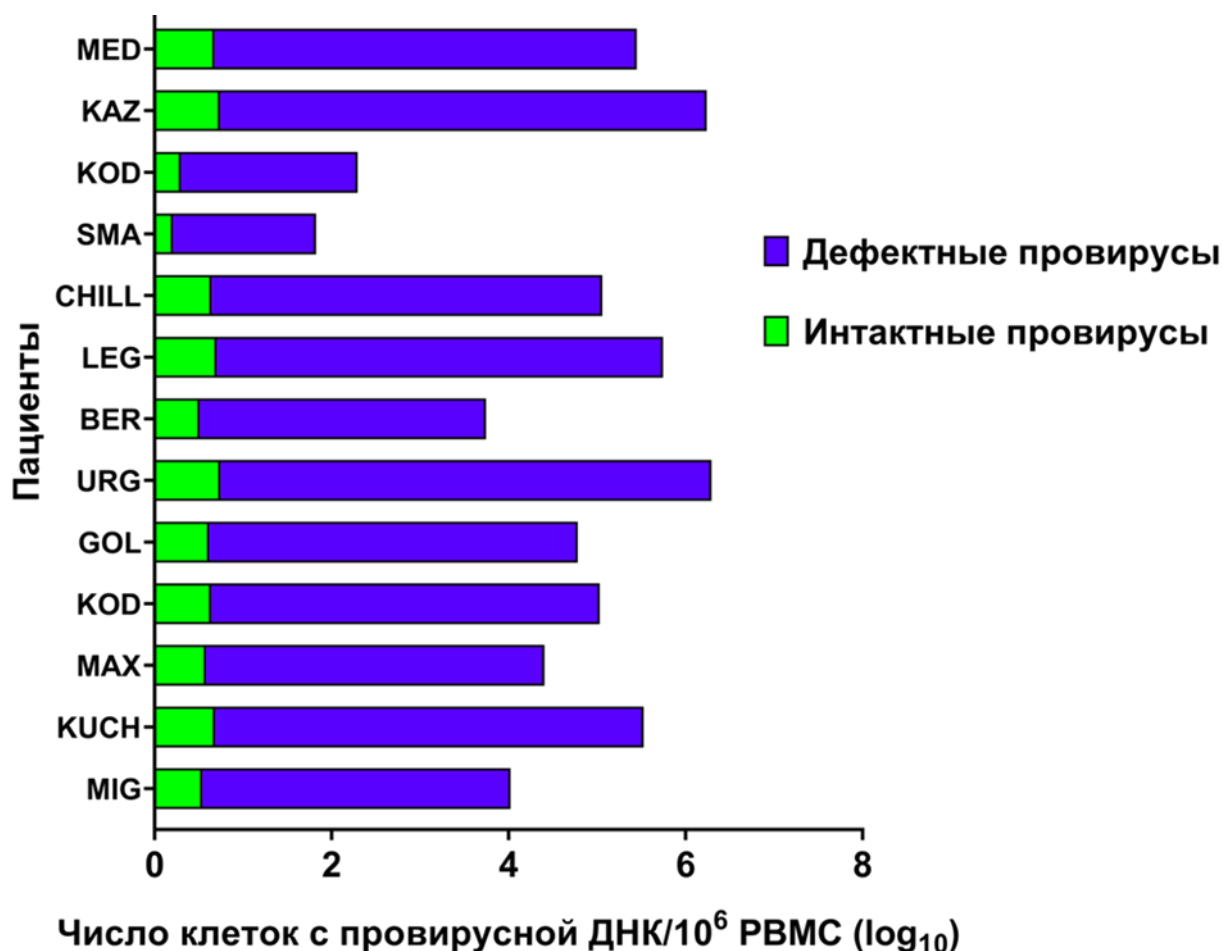


Рисунок 5 - Количественная характеристика провирусного ландшафта ВИЧ-1 в мононуклеарах периферической крови пациентов в острой стадии ВИЧ-инфекции. Представлено число копий клеточно-ассоциированной провирусной ДНК ВИЧ-1, нормализованное на 10⁶ мононуклеарных клеток периферической крови. Для каждого пациента показано соотношение интактных и дефектных провирусных геномов. Основную часть провирусного пула составляли дефектные провирусные копии, тогда как количество интактных провирусных геномов было существенно ниже.

Таким образом, уже в острую стадию инфекции формируется выраженный и гетерогенный провирусный пул, в котором доминируют дефектные геномы, потенциально способные участвовать в поддержании иммунной активации.

Профилирование транскриптома единичных мононуклеаров периферической крови. Для характеристики иммунного ответа в острую стадию ВИЧ-инфекции были проанализированы транскриптомы 13 845 единичных клеток от трех ВИЧ-положительных индивидуумов, а в качестве контроля использованы данные мононуклеаров периферической крови трех здоровых доноров без признаков заболеваний и антигенов к ВИЧ-1 и антител к ним. После интеграции данных и кластеризации были аннотированы основные популяции мононуклеаров периферической крови, включая субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, НК-клетки, дендритные клетки, моноциты, В-клетки и

регуляторные клеточные популяции. Анализ клеточного состава выявил снижение доли наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, увеличение доли CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти, NK-клеток и пролиферирующих Т/NK-клеток, а также снижение доли Treg- и MAIT-клеток. Эти изменения указывают на выраженную иммунную активацию и перестройку клеточного состава МПК уже на ранней стадии инфекции.

Pseudo-bulk анализ дифференциальной экспрессии показал повышение экспрессии генов, связанных с иммунной активацией, негативной регуляцией сигналинга, воспалительным ответом и клеточным стрессом, включая *NR4A1*, *NR4A2*, *NR4A3*, *DUSP1*, *DUSP2*, *RGS1*, *THBS1*, *SRGN*, *OLR1*, *ATF3* и *IER3* (Рисунок 6).

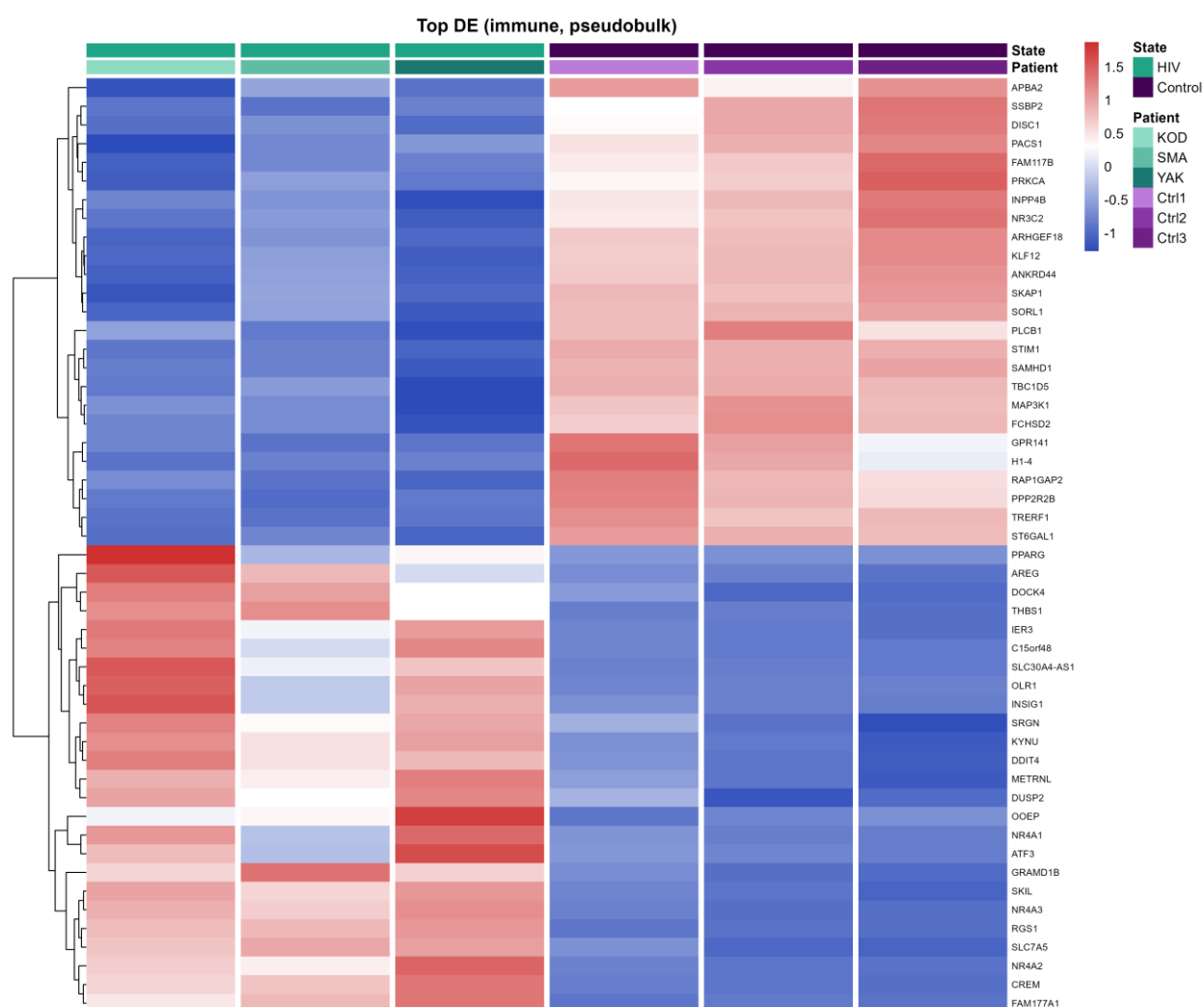


Рисунок 6 - Pseudo-bulk анализ дифференциальной экспрессии генов в мононуклеарах периферической крови при острой ВИЧ-инфекции. На тепловой карте представлены 50 генов с наиболее выраженными различиями экспрессии между ВИЧ-положительными пациентами и контрольной группой. Цветовая шкала отражает относительный уровень экспрессии генов после нормализации: красный цвет соответствует повышенной, синий — сниженной экспрессии. Верхняя аннотация указывает принадлежность образцов к группе ВИЧ-положительных пациентов или контролю.

Среди генов со сниженной экспрессией были выявлены регуляторы организации цитоскелета, клеточной миграции, G-белкового и пуринаргического сигналинга, а также метаболизма сфинголипидов. Совокупность этих изменений указывает на раннюю перестройку транскриптомного профиля МПК, сочетающую признаки воспалительной активации, клеточного стресса и нарушения регуляторных программ.

Транскриптомный профиль CD4⁺ Т-клеток центральной памяти. Анализ CD4⁺ Т-клеток центральной памяти показал, что при острой ВИЧ-инфекции их транскриптомный профиль смещается в сторону метаболической активации, окислительного фосфорилирования и усиления энергетических процессов. В этой популяции отмечалось повышение экспрессии генов, связанных с иммунной активацией и Т-клеточным сигналингом, включая *IL21R*, *ICOS*, *SOCs1*, *CXCR4* и *RGS1*, а также генов-регуляторов сигнального пути TGF- β - *SKIL*, *SMAD7* и *PMEPA1*. Одновременно наблюдалось снижение экспрессии *STIM1* и ряда генов, связанных с пролиферацией и внутриклеточной передачей сигнала, что может отражать нарушение кальциевой сигнализации и ограничение клональной экспансии CD4⁺ Т-клеток.

Транскриптомный профиль CD8⁺ Т-клеток центральной памяти. В CD8⁺ Т-клетках центральной памяти острая ВИЧ-инфекция сопровождалась смещением транскриптомного профиля в сторону адаптивного иммунного ответа, активации и дифференцировки Т-клеток. Были выявлены повышенные уровни экспрессии *CD38*, *IL21R*, *NFATC2*, *RGS1*, *SLA* и *NEAT1*, что отражает активацию противовирусного ответа, усиление цитокиновой чувствительности и посттранскрипционной регуляции. Снижение экспрессии *HLA-C* может указывать на изменение механизмов антигенной презентации и потенциальные особенности иммунного ускользания вариантов ВИЧ-1 в исследованной когорте.

Транскриптомный профиль CD8⁺ эффекторных Т-клетки памяти. В CD8⁺ Тем-клетках ВИЧ-положительных пациентов преобладали процессы, связанные с цитоплазматической трансляцией, окислительным фосфорилированием и митохондриальной генерацией АТФ, что отражает высокие энергетические потребности активированных эффекторных клеток. Среди генов с повышенной экспрессией были выявлены *RGS1*, *CD38*, *DUSP4*, *S1PR4*, *SMAD7*, *COPS9*, а также митохондриальные и рибосомные гены. Одновременно снижалась экспрессия *STIM1*, *AGAP1*, *MAP2K6*, *GPR141* и других регуляторов внутриклеточного сигналинга, транспорта и динамики цитоскелета. Эти изменения указывают на сочетание цитотоксической активации, метаболического напряжения и потенциальных признаков функциональной дисрегуляции CD8⁺ эффекторных клеток памяти.

Транскриптомный профиль неклассических моноцитов. Наиболее выраженное изменение транскриптомного профиля было выявлено в популяции неклассических моноцитов CD14⁺CD16⁺⁺. У ВИЧ-положительных пациентов эта популяция характеризовалась переходом от программ клеточного гомеостаза и внутриклеточного трафика к активированному фенотипу, связанному с продукцией цитокинов, адгезией лейкоцитов и воспалительным ответом. В неклассических моноцитах повышалась экспрессия *IL1B*, *IRAK2*, *IER3*, *DUSP2*, *AREG*, *RGS1*, *CXCR4*, *GPR183*, *CD69*, *VEGFA* и других генов, связанных с воспалением, миграцией, стрессом и активацией. Повышенная экспрессия *CD69*, *CXCR4*, *IL1B* и *IER3* указывает на активированное состояние неклассических моноцитов и их возможное участие в поддержании раннего провоспалительного ответа.

Транскриптомный профиль натуральных киллеров. Транскриптомный профиль НК-клеток в острой стадии ВИЧ-инфекции смещался от программ цитоскелетной организации и регуляции миграции к энергетическому метаболизму, окислительному фосфорилированию и синтезу АТФ. В НК-клетках ВИЧ-положительных пациентов повышалась экспрессия *IL21R*, *RGS1*, *CXCR4*, *NR4A3*, *BIRC3*, *CCL3*, *CCL4* и *GZMB*, что отражает активацию, хемотаксический и цитотоксический потенциал этих клеток. Одновременно снижалась экспрессия *STIM1*, *AGAP1*, *SAMHD1*, *NCAM1* и других генов, связанных с внутриклеточным сигналингом, транспортом, ограничением репликации ВИЧ-1, миграцией и адгезией. Эти данные указывают на сочетание функциональной активации НК-клеток с признаками нарушения регуляторных и миграционных программ.

Изменения сигнальных каскадов в мононуклеарных клетках на острой стадии ВИЧ-инфекции. Анализ межклеточного сигналинга показал, что острая ВИЧ-инфекция сопровождается уменьшением количества активных сигнальных путей при сохранении силы взаимодействий внутри оставшихся путей. У ВИЧ-положительных пациентов повышенную активность демонстрировали сигнальные каскады CCL, PARs, IFN-II, CD70, FASLG, ANNEXIN, BTLA и VISFATIN, тогда как BAFF, TRAIL, GALECTIN, TGFβ, APRIL, IL16, IL1, BAG, FLT3, GRN и ANGPTL были более выражены в контрольной когорте (Рисунок 7).

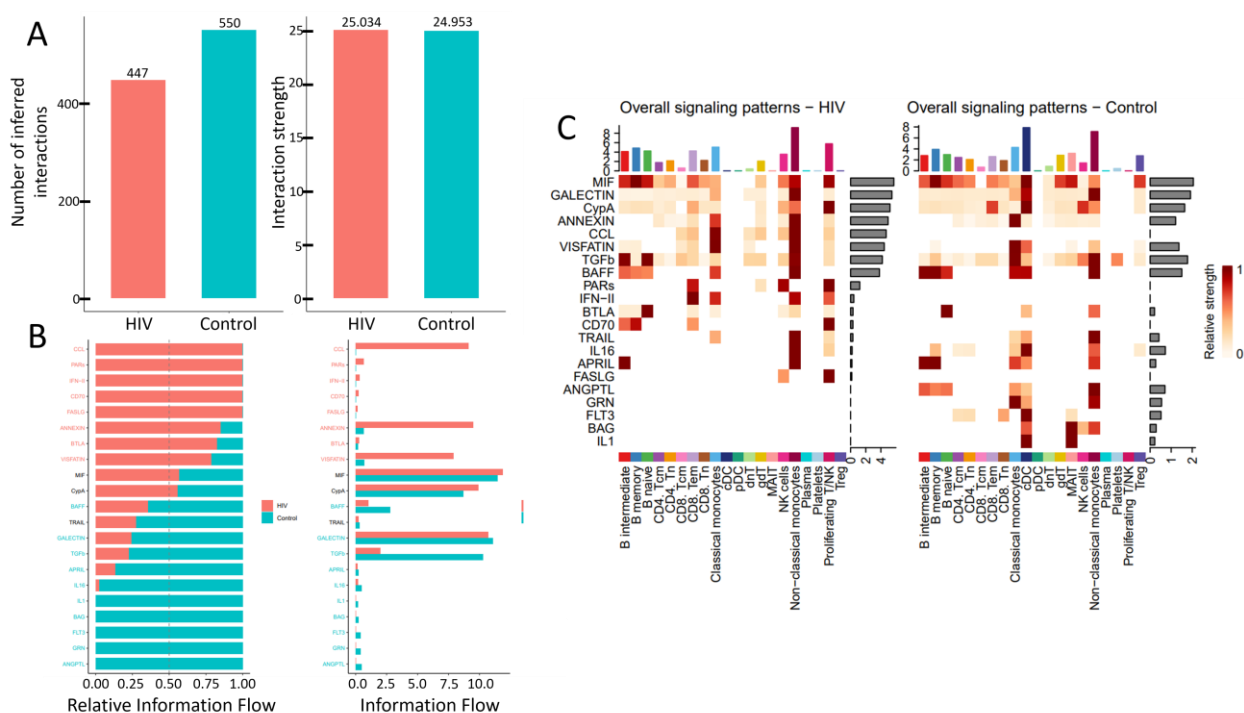


Рисунок 7 - Сигнальные пути межклеточной коммуникации при острой ВИЧ-инфекции. Показаны различия в количестве, суммарной силе и профиле межклеточных взаимодействий между ВИЧ-положительными пациентами и контрольной группой. При острой ВИЧ-инфекции отмечено уменьшение числа активных сигнальных путей при сохранении силы взаимодействий внутри оставшихся коммуникационных осей.

На уровне отдельных клеточных популяций наиболее устойчивую и широкую сигнальную активность сохраняли неклассические моноциты, тогда как дендритные клетки и регуляторные популяции демонстрировали выраженное снижение коммуникационной активности.

Неклассические моноциты оказались наиболее активными клетками как по количеству входящих, так и исходящих сигналов. Обогащение входящих взаимодействий MIF-(CD74+CXCR4), MIF-(CD74+CD44), ANXA1-FPR1 и CCL5-CCR1 указывает на усиление хемотаксиса, адгезии и провоспалительной активации, тогда как исходящие взаимодействия NAMPT-(ITGA5+ITGB1) и LGALS9-CD45 отражают усиление факторов, модулирующих межклеточные контакты и рецепторную чувствительность. NK-клетки также демонстрировали повышенную коммуникационную активность, включая MIF-, CCL5-, ANXA1- и PPIA-опосредованные взаимодействия. Напротив, Treg-, MAIT- и $\gamma\delta$ T-клетки характеризовались снижением активности по осям MIF-(CD74+CXCR4), MIF-(CD74+CD44), LGALS9-CD45 и LGALS9-CD44, что может ослаблять их противовирусный и регуляторный потенциал.

Межклеточная коммуникация мононуклеарных клеток периферической крови во время острой стадии ВИЧ-инфекции. Реконструкция сетей межклеточной коммуникации показала, что острая стадия ВИЧ-инфекции сопровождается общим сокращением количества и интенсивности взаимодействий между популяциями мононуклеаров. Дендритные клетки, Treg-, MAIT- и плазматические клетки демонстрировали минимальное участие в сети коммуникации, тогда как CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки и double-negative Т-клетки сохраняли ограниченное число взаимодействий. На фоне общего ослабления коммуникационной сети относительное сохранение взаимодействий наблюдалось у классических и неклассических моноцитов. При этом центральная роль в сети межклеточной коммуникации смещалась от классических к неклассическим моноцитам. Таким образом, острая ВИЧ-инфекция, вызванная A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, характеризуется не только выраженной иммунной активацией, но и глубокой перестройкой регуляторных и коммуникационных связей между клетками врожденного и адаптивного иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, расширяют представления о молекулярно-генетических, вирусологических и иммунологических особенностях острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной эпидемически значимыми для Российской Федерации генетическими вариантами ВИЧ-1 - суб-субтипом A6 и циркулирующей рекомбинантной формой CRF63_02A6. Сформированная когорта пациентов в острой стадии инфекции позволила охарактеризовать клинические изоляты ВИЧ-1, установить их генетическую принадлежность и фенотипическую тропность, а также показать, что уже на раннем этапе инфекции в исследуемой выборке присутствуют не только R5-тропные, но и X4- и R5/X4-тропные варианты вируса. Эти данные указывают на необходимость учета генетического варианта ВИЧ-1 и тропности вируса при оценке патогенетического потенциала клинических изолятов.

Методом цифровой ПЦР впервые для острой инфекции, вызванной A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, количественно охарактеризован провирусный ландшафт мононуклеаров периферической крови. Показано, что уже в острую стадию формируется выраженный пул провирусной ДНК с медианным числом 26 034 копии на 10⁶ МПК, при этом основная часть провирусных геномов представлена дефектными копиями, а медианное число интактных провирусов составляет 405 копий на 10⁶ клеток. В работе также проведена оценка существующих инструментов генотипического предсказания тропности и показано снижение их эффективности при анализе A6 и CRF63_02A6. На основании

полученных данных разработан и валидирован инструмент HIV-V3Augur, обеспечивающий более сбалансированное предсказание тропности для российских геновариантов ВИЧ-1 и реализованный в виде автономного приложения с графическим интерфейсом.

Анализ транскриптома единичных клеток показал, что острая ВИЧ-инфекция, вызванная A6 и CRF63_02A6, сопровождается выраженной перестройкой клеточного состава и транскрипционного профиля мононуклеаров периферической крови. Выявлены признаки генерализованной иммунной активации, снижение доли наивных Т-клеток, Treg- и MAIT-клеток, увеличение доли CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти, NK-клеток и пролиферирующих Т/NK-клеток, а также изменение экспрессии генов, связанных с воспалением, клеточным стрессом, миграцией, энергетическим метаболизмом и регуляцией сигнальных путей. Наиболее выраженные изменения были обнаружены в неклассических моноцитах, которые приобретают активированный провоспалительный профиль и становятся центральным узлом межклеточной коммуникации. Совокупность полученных данных свидетельствует, что острая стадия ВИЧ-инфекции, вызванная A6 и CRF63_02A6, характеризуется не только ранним формированием провирусного пула, но и сложным перепрограммированием иммунных клеток, что вносит вклад в понимание патогенеза регионально значимых геновариантов ВИЧ-1 и создает основу для дальнейшей разработки прогностических и диагностических подходов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в России и мире была применена технология цифровой ПЦР для оценки количества и целостности провирусной ДНК суб-субтипа A6 и CRF63_02A6. Выявлено, что медиана общего числа резервуаров ВИЧ-1 в 15 случаях острой ВИЧ-инфекции составляет 26 034 копий на 10⁶ клеток, дефектных – 24 443, интактных – 405, что указывает на раннее формирование выраженного провирусного резервуара в МПК с резким преобладанием дефектных провирусных геномов над интактными.

2. Впервые в России разработан и валидирован подход к генотипическому предсказанию тропности, сочетающий фенотипическую верификацию и V3-ориентированную модель машинного обучения. При этом модель имеет сбалансированные метрики чувствительности и специфичности в отношении предсказания тропности суб-субтипа A6 и CRF63_02A6 в сравнении с другими моделями. Чувствительность, специфичность и точность в отношении суб-субтипа A6 составили 79%, 79% и 77% соответственно. В отношении CRF63_02A6 – 87%, 100% и 95%. Данное программное обеспечение перспективно для использования в клинической практике и имеет высокую

значимость при использовании ингибиторов проникновения ВИЧ-1 и оценки вероятности прогрессирования ВИЧ-инфекции.

3. Впервые в мире охарактеризован транскриптом единичных клеток крови ВИЧ-положительных пациентов с ВИЧ-инфекцией, вызванной генетическими вариантами ВИЧ-1, циркулирующими в России. Показано, что острая стадия ВИЧ-инфекции, вызванная вариантами A6 и CRF63_02A6, приводит к активации провоспалительных путей (NF-κB, TNF, интерфероны I/II типов), повышению экспрессии генов миграции (CXCR4, CCR7) и усилению метаболической адаптации (окислительное фосфорилирование), а также к сложным изменениям в регуляции апоптоза (присутствию проапоптотических и антиапоптотических сигналов).

4. Выявлены специфические маркеры прогрессирования заболевания (CCR5, CXCR4, NFAT2, OLR1, IL1B) и потенциальные факторы, ограничивающие персистенцию вируса (NAF1, NEAT1, PIK3CD), что проявляется в одновременной активации генов, ассоциированных с прогрессией и устойчивостью к заболеванию.

5. Обнаружена выраженная дисрегуляция сигнальных путей TGF-β и mTOR, а также резкое снижение взаимодействий между цитотоксическими клетками (NK, CD8⁺ Tem) и антиген-презентирующими/регуляторными популяциями. Эти изменения указывают на признаки ранней иммунной дисфункции и истощения иммунных клеток, которое обычно наблюдается на более поздних стадиях ВИЧ-инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют предложить следующие практические рекомендации:

1. Для генотипического предсказания тропности изолятов A6 и CRF63_02A6 рекомендуется использовать подходы, адаптированные к данным генетическим вариантам ВИЧ-1. Разработанное программное обеспечение HIV-V3Augur может применяться как вспомогательный инструмент в вирусологических лабораториях при анализе последовательностей V3-петли gp120, с учетом необходимости дальнейшей валидации на расширенных выборках.

2. При планировании исследований провирусного резервуара ВИЧ-1 у пациентов с инфекцией, вызванной A6 и CRF63_02A6, может быть использован адаптированный подход цифровой ПЦР для количественной оценки общего, дефектного и интактного пулов провирусной ДНК в моноклеарах периферической крови.

3. Полученные данные о транскриптомных изменениях иммунных клеток в острой стадии ВИЧ-инфекции следует рассматривать как основу для дальнейшего поиска и

проверки потенциальных маркеров ранней иммунной дисфункции, прогрессирования заболевания и клеточных мишеней для последующих фундаментальных и прикладных исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Single-Cell Transcriptomic Profile Associated with Sub-Subtype A6 and CRF63-02A6 HIV-1 Strain Infection / **К. Elfimov**, A. Khozyainova, J. Gotfrid [et al.] // *Viruses*. – 2026. – Vol. 18, no. 2. – Article 204. – DOI: 10.3390/v18020204.

2. Сравнительная оценка эффективности генотипических методов предсказания корцепторной тропности ВИЧ-1 для суб-субтипа А6 и циркулирующей рекомбинантной формы CRF63_02A6 / **К. А. Елфимов**, Л. Г. Готфрид, М. П. Гашникова, А. П. Агафонов, Н. М. Гашникова // *Естественные и технические науки*. – 2026. – № 5 (216). – С. 79–85. – DOI: 10.25633/ETN.2026.05.06.

3. The Proviral Reservoirs of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection / A. I. Murzin, **К. А. Elfimov**, N. M. Gashnikova // *Pathogens*. – 2025. – Vol. 14, no. 1. – Article 15. – DOI: 10.3390/pathogens14010015.

Тезисы

Елфимов К. А. Анализ транскриптного профиля единичных мононуклеаров периферической крови в период острой стадии ВИЧ-инфекции // Материалы XII Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2025». – Москва, 11–13 ноября 2025 г.

Елфимов К. А. Транскриптный профиль единичных клеток при ВИЧ-инфекции: CRF63_02A6 ВИЧ-1 и его влияние на экспрессию генов мононуклеаров периферической крови // Материалы IV Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике». – Новосибирск, 22–26 июня 2025 г.

Елфимов К. А. Анализ иммунологических процессов острой стадии ВИЧ-инфекции с помощью секвенирования транскриптома единичных мононуклеаров периферической крови // Материалы XXVI Всероссийской научно-практической конференции «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией». – Суздаль, 8–10 октября 2025 г.