

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук Шаршова Кирилла Александровича на диссертационную работу Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

Актуальность темы диссертационной работы

Одной из характерных особенностей современной эпидемии ВИЧ-1 является выраженная географическая неоднородность в доминировании тех или иных генетических вариантов ВИЧ-1. Если значительная часть накопленных фундаментальных и прикладных данных о биологии ВИЧ-1 получена для глобально распространенных субтипов, прежде всего В и С, то эпидемия на территории Российской Федерации имеет собственную генетическую специфику. Основным геновариантом ВИЧ-1 в России является суб-субтип А6, а для Сибирского региона особое значение приобрела циркулирующая рекомбинантная форма CRF63_02A6. Продолжающаяся совместная циркуляция этих вариантов сопровождается появлением новых рекомбинантных форм, в связи с чем их исследование имеет значение не только для общей вирусологии, но и для молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции.

При этом эпидемиологическая распространенность генетического варианта сама по себе не дает исчерпывающего представления о его биологических свойствах. Для понимания возможного влияния генетической структуры вируса на течение инфекции необходимо сопоставление данных секвенирования с экспериментально определяемыми характеристиками клинических изолятов. В этом отношении существенный интерес представляет изучение корецепторного тропизма, а также хозяйского иммунного ответа на генетические варианты А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, поскольку эти характеристики влияют на патогенез ВИЧ-инфекции.

Подходящим предметом для подобных исследований является острая стадия ВИЧ-инфекции. В этот период исследователь имеет возможность анализировать свойства вирусных вариантов в начале инфекционного процесса, когда одновременно наблюдаются высокая вирусная нагрузка, активная репликация вируса, формирование провирусного пула и интенсивная перестройка клеточного иммунного ответа без влияния антиретровирусной терапии.

Отдельного внимания заслуживает проблема определения корецепторной тропности изолятов ВИЧ-1. Большинство широко применяемых генотипических алгоритмов было разработано и валидировано на последовательностях генети-

ческих вариантов ВИЧ-1, значительно лучше представленных в международных базах данных, чем суб-субтип А6 и CRF63_02A6. В результате перенос подобных моделей на регионально распространенные варианты вируса не всегда обеспечивает одинаковую чувствительность и специфичность определения R5- и X4 вариантов. Следовательно, экспериментальное фенотипирование российских изолятов и создание на его основе специализированных обучающих и тестовых наборов представляют самостоятельную научную и методическую задачу.

Важной стороной диссертационной работы является также попытка связать характеристику самого вируса с молекулярными событиями в клетках хозяина. Использование цифровой ПЦР для количественной оценки различных компонентов провирусного пула и секвенирования РНК единичных клеток для анализа иммунных популяций позволяет проследить ранние изменения на нескольких уровнях — от провирусной ДНК до транскрипционных программ отдельных типов клеток и реконструируемых межклеточных взаимодействий.

Таким образом, диссертационная работа К.А. Елфимова посвящена актуальной для отечественной вирусологии задаче - экспериментальной и молекулярно-генетической характеристике эпидемически значимых для России вариантов ВИЧ-1 с учетом их изоляции во время раннего инфекционного процесса. Существенным достоинством выбранного направления является сочетание множества методов, включая молекулярную биологию, молекулярную вирусологию и практическую вирусологию.

Цель работы сформулирована как комплексная характеристика молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1. Для достижения поставленной цели автором сформулировано пять последовательных задач, решение которых позволило рассмотреть исследуемую проблему на нескольких уровнях организации инфекционного процесса.

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

Генетическая характеристика клинических изолятов выполнялась на основании последовательностей практически полного генома и филогенетического анализа, что является преимуществом исследования, поскольку высокая частота рекомбинации ВИЧ-1 может сделать недостоверным генотипирование по фрагментам вирусного генома. Тропность изолятов также определялась наиболее надежным фенотипическим методом – с помощью клеточных культур, экспрессирующих CD4 и CCR5 или CXCR4. Наличие фенотипически охарактеризованных изолятов позволило выявить истинные значения эффективности у существу-

ющих инструментов предсказания тропности по отношению к изолятам суб-суб-типа A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1.

Отдельно следует отметить методическую проработку биоинформатической части исследования. При построении собственных моделей использованы субтип-специфичные наборы данных, различные признаки последовательности V3 gp120, методы балансировки классов и кросс-валидация. Автор не ограничивается представлением общей точности классификаторов, а рассматривает также чувствительность и специфичность, что особенно важно при выраженном дисбалансе R5- и X4-тропных последовательностей в используемой базе данных нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1 LANL.

Для оценки провирусной ДНК применена цифровая ПЦР с наборами праймеров и зондов, адаптированными с учетом генетического разнообразия исследуемых вариантов ВИЧ-1. Транскриптомный блок работы включает контроль качества данных, интеграцию образцов, аннотацию клеточных популяций с использованием референсных и ручных подходов, pseudo-bulk анализ дифференциальной экспрессии и дополнительную проверку устойчивости полученных результатов на отдельных субвыборках клеток. Такой комплекс процедур валидации представляется адекватным, поскольку омиксные данные обычно требуют проверки и строго контроля качества.

Следует положительно оценить и то, что в обсуждении автор отдельно обозначает ограничения исследования, включая размер выборок, необходимость дальнейшей независимой проверки модели HIV-V3Augur и ограничения интерпретации данных, полученных для клеток периферической крови. Наличие такой критической оценки повышает обоснованность представленных выводов и позволяет отделить непосредственно полученные экспериментальные результаты от их дальнейшей биологической интерпретации.

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

Научная новизна исследования и полученных результатов

Существенной составляющей научной новизны работы является получение экспериментально охарактеризованного материала по изолятам ВИЧ-1, которые недостаточно представлены в существующих международных наборах данных. Автором получены практически полногеномные последовательности

клинических изолятов и проведено их фенотипирование, что позволило сопоставить генетическую принадлежность вируса с его биологическими свойствами.

При анализе изолятов, выделенных от пациентов в острой стадии инфекции, установлено присутствие не только R5-тропных, но также X4- и R5/X4-тропных вирусов. Особенно интересным представляется выявление изолятов с X4 тропностью уже на раннем этапе заболевания, поскольку это наблюдение отличается от классического представления о преимущественном распространении R5-вирусов на ранних стадиях инфекции. Кроме того, в исследованной коллекции показаны различия репликативной активности изолятов: для CRF63_02A6 чаще наблюдался фенотип высокой репликативной активности по сравнению с изолятами суб-субтипа A6. Эти данные требуют дальнейшего подтверждения на расширенных выборках, однако сами по себе представляют значительный интерес для изучения биологических особенностей регионально распространенных геновариантов ВИЧ-1.

Отдельным результатом является систематическое сравнение существующих способов генотипического предсказания тропности применительно к различным субтипам и рекомбинантным формам ВИЧ-1. Работа показывает, что высокая эффективность алгоритма не гарантирует сохранения заявленных характеристик для суб-субтипа A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1. На основании этого анализа автором разработан инструмент HIV-V3Augur с субтип-специфичными классификаторами. Представляется важным, что автор оценивает не только суммарную точность, но и баланс чувствительности и специфичности: именно по этому показателю собственный подход дает преимущество при анализе целевых для работы российских вариантов ВИЧ-1. Для CRF63_02A6 получены особенно высокие показатели классификации, хотя вследствие небольшого числа доступных фенотипированных последовательностей этот результат обоснованно требует последующей независимой валидации.

Самостоятельный блок новых данных получен при исследовании провирусного ландшафта. Для острой стадии инфекции, вызванной исследуемыми генетическими вариантами, количественно охарактеризованы общий, дефектный и интактный пулы провирусной ДНК. Показано, что выраженный провирусный пул формируется уже на раннем этапе инфекции и характеризуется резким преобладанием дефектных копий. Ценность этого результата заключается прежде всего в получении соответствующих количественных данных непосредственно для вариантов A6 и CRF63_02A6.

Значительный интерес представляет транскриптомная часть диссертации. С использованием секвенирования РНК единичных клеток автором исследованы изменения различных популяций мононуклеаров периферической крови. Наряду с общей активацией воспалительных и противовирусных программ пока-

заны неодинаковые направления перестройки отдельных клеточных популяций. В частности, выявлены изменения транскрипционных программ CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти и НК-клеток, тогда как наиболее выраженный активированный провоспалительный профиль наблюдался в популяции неклассических моноцитов.

Таким образом, новизна диссертации определяется не только применением современных методов к малоизученным генетическим вариантам ВИЧ-1, но и получением взаимосвязанного набора собственных экспериментальных данных: геномных, вирусологических, омиксных (транскриптомных).

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Диссертационная работа соискателя представляет собой самостоятельное законченное исследование, результаты которого имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

С фундаментальной точки зрения важным результатом является расширение экспериментальной базы данных о суб-субтипе A6 и CRF63_02A6. Для этих вариантов получены полногеномные последовательности, дополненные сведениями о фенотипической тропности и репликативных свойствах соответствующих изолятов. Подобная фенотипическая аннотация повышает ценность последовательностей для дальнейших молекулярно-эпидемиологических и эволюционных исследований, в том числе для анализа новых рекомбинантных вариантов, возникающих при совместной циркуляции A6 и CRF63_02A6.

Методическое значение имеет проведенная автором оценка переносимости существующих алгоритмов определения тропности между генетическими вариантами ВИЧ-1. Полученные результаты наглядно демонстрируют необходимость учитывать генетический контекст последовательности при разработке подобных инструментов. Созданный HIV-V3Augur представляет собой практически реализованный результат этой части работы: программа объединяет генотипирование и субтип-специфичное предсказание тропности и выполнена в форме автономного приложения с графическим интерфейсом. После независимой валидации на расширенных наборах фенотипированных изолятов данный инструмент может представлять интерес для исследовательских и вирусологических лабораторий.

Практически значим и адаптированный к исследуемым геновариантам подход цифровой ПЦР для оценки различных компонентов провирусного пула. Возможность количественно оценивать общий, дефектный и предполагаемый интактный провирусный пул создает основу для последующих исследований

динамики вирусных резервуаров и сравнительного анализа различных генетических вариантов ВИЧ-1.

Наконец, результаты scRNAseq имеют скорее фундаментальную и поисковую ценность. Выявленные изменения экспрессии генов и лиганд-рецепторных взаимодействий позволяют выделить конкретные клеточные популяции и молекулярные мишени, которые могут вносить существенный вклад в патогенез ВИЧ-инфекции. Особенно перспективным представляется последующее исследование функциональной роли неклассических моноцитов, а также причин снижения коммуникационной активности Treg-, MAIT- и других регуляторных популяций при острой инфекции.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

По теме диссертационного исследования Елфимовым Кириллом Артемовичем 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.

Полученные результаты были представлены на научных конференциях по высокопроизводительному секвенированию, молекулярной диагностике и эпидемиологическому надзору за ВИЧ-инфекцией.

Структура и оформление работы.

Диссертация 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», главы результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического списка.

Во «Введении» сформулирована общая логика исследования: указан пробел в исследовании биологии ВИЧ-1, а также патогенеза ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1. Представлены цель и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, сведения об апробации и личном участии автора.

Обзор литературы охватывает необходимые для интерпретации результатов аспекты биологии ВИЧ-1. Последовательно рассмотрены генетическое разнообразие вируса, происхождение и распространение суб-субтипа A6 и CRF63_02A6, особенности острой стадии инфекции и молекулярные основы

детерминации корцепторной тропности у ВИЧ-1. Отдельные разделы посвящены современным методам его определения и возможностям омиксных технологий. Такой подбор литературы формирует обоснование для последующих экспериментальных разделов диссертации.

Глава «Материалы и методы» демонстрирует широкий спектр использованных методов. Помимо описания клинического материала и классических вирусологических процедур, подробно представлены получение практически полных геномов ВИЧ-1, фенотипирование изолятов, формирование референсных наборов последовательностей, построение признаков пространств и моделей машинного обучения. Самостоятельные разделы посвящены цифровой ПЦР и обработке данных секвенирования РНК единичных клеток. Степень детализации в целом позволяет проследить последовательность экспериментального и аналитического этапов исследования.

Логика главы «Результаты собственных исследований» заслуживает положительной оценки. Автор начинает с характеристики исследуемых пациентов и вирусных изолятов, после чего переходит от их генотипа и экспериментального фенотипа к анализу эффективности существующих алгоритмов и созданию HIV-V3Augur. Вторая часть главы посвящена уже событиям ВИЧ-инфекции *in vivo*: формированию провирусного пула, изменению состава и транскриптома иммунных клеток и перестройке их межклеточных взаимодействий. Такое построение позволяет последовательно перейти от свойств вируса к реакции клеток хозяина.

В главе «Обсуждение полученных результатов» автор рассматривает полученные данные в контексте ранее опубликованных исследований. Наиболее подробно обсуждаются высокая репликативная активность части изолятов CRF63_02A6, обнаружение CXCR4-использующих вариантов в ранний период инфекции, ограничения существующих способов генотипического предсказания тропности, особенности провирусного пула и изменения иммунных клеток. Положительно следует оценить наличие отдельного обсуждения ограничений выполненного исследования и направлений, требующих последующего подтверждения на более крупных независимых выборках.

В «Заключении» обобщены основные результаты проведенной работы. Сформулированные пять выводов соответствуют поставленным задачам и в целом адекватно отражают результаты исследования.

Диссертация написана научным языком, логично структурирована и хорошо иллюстрирована. Представленные рисунки и таблицы в целом информативны и облегчают восприятие значительного объема экспериментальных данных.

Автореферат диссертации достаточно полно и адекватно отражает содержание диссертационной работы, ее основные положения и полученные результаты. В автореферате представлены задачи и цели исследования, используемые

методы, основные результаты, выводы и сведения об апробации работы. Его содержание соответствует основным положениям и выводам диссертации.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях молекулярной эпидемиологии и биологического разнообразия ВИЧ-1, в том числе при изучении суб-субтипа A6, CRF63_02A6 и возникающих с их участием рекомбинантных форм.

Сформированная коллекция полногеномных последовательностей и фенотипированных клинических изолятов представляет интерес для разработки и валидации методов определения корецепторного тропизма. HIV-V3Augur после дополнительной независимой валидации может использоваться в научно-исследовательских и вирусологических лабораториях. Полученные данные о провирусном резервуаре и транскриптомных изменениях иммунных клеток могут служить основой для дальнейших исследований механизмов персистенции ВИЧ-1 и ранней иммунной дисфункции.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Работа в целом оценивается положительно. Вместе с тем при ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний, преимущественно дискуссионного характера:

1. Одним из наиболее интересных результатов является высокая частота X4- и R5/X4-тропных вариантов уже на острой стадии ВИЧ-инфекции. В то же время число фенотипированных клинических изолятов относительно невелико. Насколько, по мнению автора, полученный результат можно экстраполировать на суб-субтип A6 и CRF63_02A6 в целом?

2. Для предсказания тропности CRF63_02A6 из-за недостатка фенотипированных последовательностей использована модель, обученная преимущественно на CRF02_AG, что обосновано происхождением области гена *env* ВИЧ-1, включая V3 gp120, от данного родительского варианта. Вместе с тем CRF63_02A6 является сложным рекомбинантным вирусом. Как автор оценивает возможность влияния особенностей генетического фона CRF63_02A6 за пределами V3 на проявление фенотипа тропности и какие данные, по мнению автора, потребуются для окончательной независимой валидации данного классификатора?

3. При использовании IPDA обнаруженные провирусные геномы обозначаются как интактные и потенциально репликационно-компетентные. Вме-

сте с тем данный метод оценивает сохранность определенных геномных мишеней и не является прямым функциональным тестом репликационной компетентности вируса. Было бы интересно уточнить, как автор оценивает возможную долю геномов, классифицированных как интактные методом IPDA, но содержащих дефекты за пределами анализируемых участков, и насколько это может влиять на количественную интерпретацию полученных результатов.

Указанные вопросы и замечания не носят принципиального характера, не ставят под сомнение основные результаты и выводы работы и в значительной степени определяют перспективные направления продолжения исследования.

Заключение

Диссертационная работа Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - Вирусология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача, имеющая существенное значение для вирусологии.

В диссертации получены новые экспериментальные данные о биологических свойствах генетических вариантов ВИЧ-1, имеющих важное эпидемиологическое значение для Российской Федерации. Сформирована и охарактеризована панель клинических изолятов, позволившая сопоставить их генетическую принадлежность с репликативными свойствами и корецепторной тропностью. Установлены ограничения существующих генотипических алгоритмов при работе с A6 и CRF63_02A6 и разработан субтип-ориентированный инструмент HIV-V3Augur. Количественно охарактеризован провирусный пул на раннем этапе инфекции, а исследование транскриптома единичных клеток выявило выраженную перестройку иммунных популяций и их коммуникационных связей, включая изменение роли неклассических моноцитов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных вирусологических, молекулярно-генетических, клеточных, биоинформатических и статистических методов. Выводы соответствуют поставленным задачам и представленным экспериментальным данным.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пунктов 9-14 «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:

руководитель лаборатории

молекулярной эпидемиологии и биооразнообразия

вирусов ФГБУ «Федеральный исследовательский центр

фундаментальной и трансляционной медицины»,

кандидат биологических наук



К.А. Шаршов

Личную подпись Шаршова К.А. заверяю
вед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
"18" 09 2026 г. подпись А.Б. Венедиктова

