

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека

*На правах рукописи*

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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Гашникова Наталья Матвеевна

Кольцово  
2026

## **Оглавление**

|  |    |
|--|----|
| Оглавление .....   | 2  |
| Введение.....  | 6  |
| Научная новизна.....   | 10 |
| Теоретическая и практическая значимость .....  | 11 |
| Методология и методы исследования.....   | 14 |
| Основные положения, выносимые на защиту.....   | 15 |
| Соответствие паспорту научной специальности .....  | 16 |
| Степень достоверности и апробация результатов .....  | 16 |
| Декларация личного участия автора .....  | 17 |
| Публикации.....  | 18 |
| Структура и объем диссертации .....  | 18 |
| Глава 1. Обзор литературы.....   | 20 |
| 1.1 Общая характеристика вируса иммунодефицита человека.....   | 20 |
| 1.2 Эпидемиология ВИЧ-1 в мире и в России.....   | 25 |
| 1.3 Появление и эпидемиология суб-субтипа А6 ВИЧ-1.....  | 29 |
| 1.4 CRF63_02A6: образование и распространение.....   | 30 |
| 1.5 Острая фаза ВИЧ-инфекции .....   | 34 |
| 1.6 Тропность штаммов ВИЧ-1, клиническая значимость выбора тропности и<br>способы её лабораторного определения ..... | 40 |
| 1.7 Омиксные технологии в исследовании ВИЧ-инфекции .....  | 50 |
| Глава 2. Материалы и методы.....   | 59 |
| 2.1 Когорты исследования.....  | 59 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2 Выделение и криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови .....                   | 60 |
| 2.3 Выделение РНК и секвенирование полного генома ВИЧ-1 .....                                      | 61 |
| 2.4 Генотипирование клинических изолятов ВИЧ-1 .....   | 62 |
| 2.5 Изоляция клинических штаммов ВИЧ-1 и фенотипическое определение тропности .....                | 62 |
| 2.6 Формирование референсных наборов нуклеотидных последовательностей V3 gp120 ВИЧ-1 из LANL ..... | 63 |
| 2.7 Генотипические методы предсказания тропности .....   | 65 |
| 2.8 Создание признаковых пространств для машинного обучения.....                                   | 66 |
| 2.9 Создание собственных моделей машинного обучения.....   | 69 |
| 2.10 Графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur.....                                       | 71 |
| 2.11 Статистический анализ.....  | 72 |
| 2.12 Подготовка и секвенирования библиотек транскриптома единичных клеток крови.....               | 74 |
| 2.13 Предобработка и аннотация данных секвенирования РНК единичных клеток крови.....               | 75 |
| 2.14 Pseudo-bulk анализ дифференциальной экспрессии генов мононуклеаров периферической крови.....  | 78 |
| 2.15 Исследование сетей межклеточных коммуникаций.....   | 79 |
| 2.16 Дизайн наборов праймеров и зондов для исследования числа провирусных резервуаров ВИЧ-1 .....  | 79 |
| 2.17 Конструкция плазмид для положительного контроля и валидации результатов цифровой ПЦР.....     | 81 |
| 2.18 Цифровая ПЦР .....  | 81 |
| Глава 3. Результаты собственных исследований .....   | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.1 Формирование выборки биологического материала ВИЧ-положительных пациентов .....                           | 85  |
| 3.2 Генотипирование штаммов ВИЧ-1.....  | 88  |
| 3.3 Изоляция и фенотипирование штаммов ВИЧ из клинического материала .....                                    | 91  |
| 3.4 Оценка эффективности существующих моделей генотипического предсказания тропности .....                    | 93  |
| 3.5 Разработка и валидация модели HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1 ..... | 99  |
| 3.6 Графический интерфейс HIV-V3Augur .....   | 103 |
| 3.7 Провирусный ландшафт ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии инфекции .....                           | 106 |
| 3.8 Профилирование транскриптомов единичных клеток.....   | 109 |
| 3.9 CD4+ Т-клетки центральной памяти (CD4+ Tcm).....  | 113 |
| 3.10 CD8+ Т-клетки центральной памяти (CD8+ Tcm).....   | 116 |
| 3.11 CD8+ эффекторные Т-клетки памяти (CD8+ Tem) .....  | 118 |
| 3.12 Неклассические моноциты (CD14+CD16++) .....  | 121 |
| 3.13 Натуральные киллеры (НК-клетки) .....  | 123 |
| 3.14 Перепрограммирование сигнальных каскадов в мононуклеарных клетках на острой стадии ВИЧ-инфекции .....    | 125 |
| 3.15 Межклеточная коммуникация МПК во время острой стадии ВИЧ-инфекции .....                                  | 132 |
| Глава 4. Обсуждение полученных результатов .....  | 135 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 140 |
| ВЫВОДЫ.....   | 144 |

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| Благодарности.....                  | 146 |
| Список используемых сокращений..... | 147 |
| Список источников .....             | 151 |

## Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является одним из наиболее широко распространенных РНК вирусов в человеческой популяции. Будучи лентивирусом, ВИЧ характеризуется способностью интегрировать свой геном в хромосомную ДНК клетки-хозяина, что лежит в основе его пожизненной персистенции и хронического течения заболевания [1]. Жизненный цикл вируса, от связывания с рецептором CD4 и корецепторами (CCR5 или CXCR4) на поверхности клетки-мишени [2] до интеграции провирусной ДНК и сборки новых вирионов, включает множество этапов, на каждом из которых вирус взаимодействует с клеточными факторами хозяина, используя их для распространения, репликации или уклонения от гуморального и клеточного иммунного ответа [3]. Несмотря на успехи антиретровирусной терапии (АРТ), позволяющей эффективно подавлять репликацию вируса и предотвращать развитие терминальной стадии заболевания - синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). ВИЧ-инфекция остается неизлечимой, а её молекулярные механизмы продолжают быть предметом интенсивных исследований, направленных на поиск путей к полной эрадикации вируса [4].

Современный этап исследований ВИЧ-инфекции ознаменован активным внедрением высокопроизводительных омиксных технологий, открывающих беспрецедентные возможности для изучения биологии вируса и его взаимодействия с хозяином на системном уровне. Геномные технологии, включая секвенирование нового поколения (NGS), позволили детально охарактеризовать генетическое разнообразие ВИЧ, идентифицировать ключевые участки генома, связанные с патогенезом и лекарственной устойчивостью. Методы транскриптомики, и особенно транскриптомика единичных клеток (scRNA-seq), сыграли свою роль в понимании гетерогенности клеточных популяций иммунной системы и позволили в деталях описать транскрипционные перестройки, происходящие в различных типах клеток на разных стадиях инфекции. Этот подход позволяет

идентифицировать новые факторы, влияющие на персистенцию вируса и исход заболевания. Дальнейшее развитие мультиомиксного подхода, включающего интеграцию данных транскриптомики, метаболомики и протеомики, является ключом к раскрытию сложных регуляторных сетей, управляющих патогенезом ВИЧ-инфекции.

Иммунный ответ, развивающийся в острую стадию ВИЧ-инфекции, представляет собой сложную и многокомпонентную реакцию, вовлекающую практически все субпопуляции МПК. Внедрение технологий секвенирования РНК единичных клеток (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) позволило исследовать транскриптомные профили отдельных иммунных клеток и выявить специализированные «модули ответа», включающие гены интерферонового ответа, маркеры пролиферации и провоспалительные сигналы [5, 6]. Сравнительные исследования транскриптомов ВИЧ-положительных и здоровых доноров продемонстрировали, что мононуклеары периферической крови ВИЧ-положительных лиц экспрессируют больше генов, связанных с клеточной миграцией, иммунными сигнальными системами и онкогенами, при этом полной нормализации транскриптомного профиля даже на фоне эффективной АРТ не происходит [7, 8].

Другой важной характеристикой штаммов ВИЧ-1, имеющей как фундаментальное, так и клиническое значение, является тропность, то есть способность вируса использовать хемокиновые корцепторы CCR5 или CXCR4 для проникновения в клетку-мишень. Область V3 петли гликопротеина gp120 ВИЧ-1 служит основным детерминантом этого взаимодействия. На ранних стадиях инфекции доминируют R5-тропные варианты, тогда как появление X4- или двойных R5/X4-тропных штаммов ассоциировано с ускоренным снижением числа CD4+ Т-лимфоцитов и быстрым прогрессированием заболевания [9, 10]. Определение тропности является обязательной процедурой перед назначением антагонистов CCR5, в

частности маравирика, согласно современным клиническим рекомендациям [11].

В последние годы значительное внимание уделяется изучению менее распространенных генетических вариантов ВИЧ-1 (в сравнении с глобально распространенными субтипами В и С). Это касается и вариантов, циркулирующих на территории России и стран бывшего СССР. Суб-субтип А6, произошедший от африканского суб-субтипа А1, является наиболее распространённым геновариантом ВИЧ-1 в России, где его доля достигает 80,6% от всех случаев ВИЧ-инфекции [12, 13]. Наряду с суб-субтипом А6, значительное распространение в Сибирском регионе получила циркулирующая рекомбинантная форма CRF63\_02А6, образовавшаяся в результате рекомбинации между суб-субтипом А6 и центральноазиатской линией CRF02\_AG [14, 15]. В настоящее время CRF63\_02А6 детектируется более чем в 80% новых случаев ВИЧ-инфекции в Сибири [16]. Продолжающаяся коциркуляция суб-субтипа А6 и CRF63\_02А6 создаёт условия для возникновения новых рекомбинантных форм, включая недавно описанную CRF173\_63А6, активно распространяющуюся на Дальнем Востоке России [17].

Несмотря на доминирование А6 и CRF63\_02А6 в российской эпидемии ВИЧ-инфекции, их молекулярно-биологические и вирусологические характеристики, в особенности в острую стадию инфекции, остаются изученными недостаточно. В частности, отсутствуют комплексные данные о провирусном ландшафте, транскриптомном профиле иммунных клеток и особенностях тропности этих генетических вариантов. Большинство существующих биоинформатических инструментов для генотипического предсказания тропности обучены на последовательностях субтипа В и демонстрируют сниженную эффективность при анализе не-В субтипов и рекомбинантных форм, что подчёркивает необходимость разработки специализированных моделей для российских геновариантов ВИЧ-1.

Цель исследования: комплексная характеристика молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63\_02А6 ВИЧ-1.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать клинико-лабораторные показатели острой ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63\_02А6, у лиц на стадиях 2Б–2В (по классификации Покровского)/стадиях I-V по классификации Fiebig и создать коллекцию мононуклеаров периферической крови, обеспечивающую все последующие молекулярно-генетические и вирусологические этапы работы.
2. Провести вирусологическую характеристику клинических изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на 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 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\_02А6 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\_02А6.

## Научная новизна

В настоящей работе впервые выполнено комплексное исследование вирусологических и молекулярно-генетических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и рекомбинантной формой CRF63\_02A6, с применением цифровой ПЦР и секвенирования транскриптома единичных клеток. Кроме того, впервые проведена систематическая оценка эффективности существующих методов генотипического предсказания тропности ВИЧ-1 применительно к данным генетическим вариантам. До настоящего времени комплексные данные о тропности, провирусном ландшафте и транскриптомных перестройках в клетках периферической крови при инфекции, вызванной этими вариантами, отсутствовали.

С применением метода анализа интактной провирусной ДНК (IPDA) впервые получена количественная характеристика провирусного ландшафта при острой инфекции, вызванной А6 и CRF63\_02A6. Установлено, что общее число провирусных копий в мононуклеарах периферической крови высоко, однако подавляющее большинство из них представлено дефектными геномами, тогда как доля интактных, потенциально репликационно-компетентных провирусов относительно невелика. Эти результаты впервые для российских геновариантов подтверждают раннее формирование гетерогенного пула провирусов с доминированием нефункциональных копий.

Разработан и валидирован новый инструмент для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1 - модель машинного обучения HIV-V3Augur. В отличие от существующих алгоритмов, обученных преимущественно на субтипе В или С, предлагаемая модель использует ансамблевый подход на основе комбинации признаков, рассчитываемых по нуклеотидной последовательности V3-петли gp120. Для суб-субтипа А6 и CRF63\_02A6 модель демонстрирует сбалансированные показатели чувствительности и специфичности, существенно превосходя существующие

инструменты. HIV-V3Augur реализован в виде автономного приложения с графическим интерфейсом, что делает его доступным для лабораторий без специальной биоинформатической подготовки.

Впервые с использованием технологии секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) охарактеризован транскриптомный профиль мононуклеаров периферической крови у пациентов с острой ВИЧ-инфекцией, вызванной вариантами А6 и CRF63\_02А6. Выявлены значительные изменения клеточного состава, включая изменение доли субпопуляций Т-лимфоцитов и моноцитов, перестройка сетей межклеточной коммуникации с формированием центрального регуляторного узла в виде популяции неклассических моноцитов. Обнаружены ранее не описанные для этих геновариантов изменения экспрессии генов, связанных с регуляцией иммунного ответа, клеточным метаболизмом и противовирусной защитой, а также ослабление сигнальных взаимодействий в регуляторных популяциях с функцией контроля воспалительного ответа. Эти данные впервые раскрывают молекулярные механизмы ранней иммунной дисфункции и персистенции вируса при острой инфекции, вызванной регионально значимыми геновариантами ВИЧ-1.

Совокупность полученных результатов представляет собой новые фундаментальные знания о вирусологических и молекулярно-генетических особенностях острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63\_02А6, и вносит вклад в понимание патогенеза ВИЧ-инфекции применительно к эпидемически значимым вариантам, циркулирующим на территории Российской Федерации.

### **Теоретическая и практическая значимость**

**Теоретическая значимость** выполненного исследования определяется получением комплексных данных о молекулярно-генетических и

вирусологических характеристиках острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной доминирующими на территории России генетическими вариантами - суб-субтипом А6 и циркулирующей рекомбинантной формой CRF63\_02А6. До настоящего времени систематические исследования этих вариантов ограничивались преимущественно эпидемиологическим и филогенетическим анализом, тогда как их тропность, провирусный ландшафт и транскриптомные перестройки в клетках-мишенях в острую фазу инфекции оставались практически не изученными. Работа заполняет этот пробел и расширяет фундаментальные представления о патогенезе ВИЧ-инфекции применительно к генетическим вариантам, характерным для Восточной Европы и постсоветского пространства.

Предложен и валидирован новый методологический подход к генотипическому предсказанию тропности ВИЧ-1, основанный на ансамблевом машинном обучении и комбинации признаков относительного использования синонимичных кодонов и псевдоаминокислотного состава, рассчитываемых по нуклеотидной последовательности V3-петли gp120. В отличие от существующих моделей, обученных преимущественно на субтипах В и С, разработанный подход адаптирован для генетически отличных вариантов А6 и CRF63\_02А6, что вносит вклад в развитие биоинформатических методов персонализированной оценки тропности вируса. Кроме того, полученные данные о низкой эффективности широко используемых алгоритмов (правила 11/25, Geno2pheno, WebPSSM и др.) при анализе российских изолятов уточняют границы применимости этих инструментов и обосновывают необходимость субтип-специфичных моделей.

С помощью технологии секвенирования транскриптома единичных клеток в работе впервые охарактеризованы транскрипционные перестройки в различных субпопуляциях мононуклеаров периферической крови при острой инфекции, вызванной А6 и CRF63\_02А6. Выявленные изменения клеточного состава, профилей экспрессии генов и сетей межклеточной коммуникации

расширяют существующие теоретические представления об патогенезе ранней стадии ВИЧ-инфекции. В частности, показано изменение коммуникационных ролей между клеточными популяциями и ослабление сигнальных взаимодействий в регуляторных звеньях, что может рассматриваться как один из механизмов ранней иммунной дисфункции. Эти результаты вносят вклад в понимание того, как изменяются сигнальные сети мононуклеаров периферической крови и связанных с ними клеток во время угасания иммунной компетентности.

**Практическая значимость** работы обусловлена разработкой и внедрением в лабораторную практику инструмента для генотипического предсказания тропности ВИЧ-1 - программного обеспечения HIV-V3Augur. Данное приложение реализовано в виде автономного графического интерфейса для операционной системы Windows, не требует специальных биоинформатических навыков и может быть использовано в рутинной работе вирусологических лабораторий, а в перспективе и клинико-диагностических лабораторий. HIV-V3Augur позволяет определять тропность изолятов суб-субтипа A6 и CRF63\_02A6 с высокой точностью, что необходимо для обоснованного назначения антагонистов CCR5 (маравирока) и оценки риска быстрого прогрессирования заболевания в соответствии с действующими клиническими рекомендациями.

Разработанный протокол оценки провирусного ландшафта методом цифровой ПЦР (IPDA) с использованием адаптированных для российских геновариантов праймеров и зондов может быть внедрён в лабораториях, проводящих мониторинг размера латентного резервуара ВИЧ-1. Количественная характеристика общего, дефектного и интактного пулов провирусной ДНК в мононуклеарах периферической крови имеет значение для оценки эффективности антиретровирусной терапии и может быть использована в клинических исследованиях, направленных на разработку стратегий эрадикации вируса. Полученные в работе данные о

транскриптомных профилях иммунных клеток при острой инфекции создают основу для поиска потенциальных биомаркеров прогрессирования заболевания и мишеней для иммунотерапевтических вмешательств.

Результаты исследования также имеют значение для эпидемиологического надзора и региональных программ по борьбе с ВИЧ-инфекцией. Установленные различия в репликативной активности между суб-субтипом А6 и CRF63\_02А6, а также данные о высокой частоте выявления Х4-тропных и дуально-тропных штаммов уже в острую стадию, указывают на необходимость учета генетического варианта вируса при планировании терапии и прогнозировании течения заболевания. Предложенный подход к субтип-специфичному генотипическому предсказанию тропности может быть адаптирован и для других регионально значимых вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в странах бывшего СССР.

### **Методология и методы исследования**

В работе использован комплекс методов молекулярной биологии, вирусологии, биоинформатики и машинного обучения. Из периферической крови пациентов в острой стадии ВИЧ-инфекции выделяли мононуклеарные клетки (МПК), которые криоконсервировали; из плазмы выделяли РНК ВИЧ-1, получали полногеномные последовательности вируса с помощью секвенирования нового поколения (Illumina MiSeq) и проводили генотипирование и филогенетический анализ. Клинические штаммы изолировали совместным культивированием МПК ВИЧ-положительных и здоровых доноров, а их тропность фенотипически определяли на клеточных линиях U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4 по накоплению антигена p24 в культуральной жидкости. Для генотипического предсказания тропности провели сравнительную оценку восьми существующих моделей и правил, после чего разработали собственные модели машинного обучения (ансамблевый стекинг RandomForest и SVM с ядром RBF) на основе признаков

псевдо-аминокислотного состава (PseAAC) и относительной частоты синонимичных кодонов (RSCU) V3-петли gp120 с 10-кратной кросс-валидацией и балансировкой классов (SMOTE), а также создали графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur. Количественную оценку общего, дефектного и интактного пулов провирусной ДНК в МПК проводили методом анализа интактной провирусной ДНК (IPDA) на системе цифровой ПЦР QIAcuity One. Транскриптомный профиль единичных МПК исследовали с помощью секвенирования РНК единичных клеток (технология 10x Genomics), а данные обрабатывали в пайплайне, который включал использование программного обеспечения CellRanger, пакеты Seurat и CellChat для среды программирования R. Статистический анализ включал обобщённые линейные смешанные модели (GLMM) для сравнения эффективности моделей генотипического предсказания тропности.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63\_02А6, обнаруживаются штаммы 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 А6 и CRF63\_02А6, более точный для российских вариантов вируса, чем универсальные алгоритмы, изначально разработанные преимущественно для других генетических вариантов циркулирующих в мире ВИЧ-1.

4. Для острой ВИЧ-инфекции характерна выраженная перестройка транскриптома ключевых антивирусных популяций мононуклеарных клеток (Т-клеток памяти, неклассических моноцитов, НК-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 современного высокотехнологичного оборудования (секвенатор Illumina MiSeq, система цифровой ПЦР QIAcuity, контроллер Chromium 10x Genomics), применением стандартизованных протоколов выделения и культивирования клеток, а также валидированных референсных наборов данных (база LANL, данные здоровых доноров). Репрезентативность выборки подтверждена чёткими критериями включения пациентов в острую стадию ВИЧ-инфекции (известный хронологический интервал инфицирования, высокая вирусная нагрузка, диагноз клинициста). Статистический анализ включал современные методы (GLMM, 10-кратная стратифицированная кросс-валидация, DESeq2, коррекция батч-эффектов Harmony), что обеспечило статистическую значимость и воспроизводимость выводов. Разработанная модель машинного обучения HIV-V3Augur валидирована на независимых фенотипированных выборках, а для транскриптомных данных проведена оценка стабильности методом субвыборок (70% клеток). Результаты работы были представлены на всероссийских и международных конференциях (IV Всероссийская конференция "Высокопроизводительное

секвенирование в геномике", г. Новосибирск, 22-26 июня 2025; XII Международная Научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2025», г. Москва, 11-13 ноября 2025; XXVI Всероссийская научно-практическая конференция «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией», г. Суздаль, 8-10 октября 2025), а также опубликованы в рецензируемых научных журналах (Viruses, Естественные и технические науки). Ключевые этапы исследования выполнены лично автором с соблюдением требований лабораторной безопасности и биоэтики. Исследование с использованием биологического материала пациентов одобрено Этическим комитетом государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Краевая клиническая больница №2» г. Владивосток (Выписка из протокола заседания №31/1 от 10 января 2024 года). Все пациенты, принимавшие участие в исследовании, дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

#### **Декларация личного участия автора**

Автор принимал непосредственное участие во всех ключевых этапах выполнения диссертационного исследования. Автором были сформулированы цель и задачи исследования, определена общая логика работы, разработаны критерии включения пациентов в исследуемую когорту, спланированы основные экспериментальные и аналитические этапы, а также выполнена систематизация клинического и лабораторного материала.

Автором лично проведена значительная часть лабораторной работы, включавшая выделение РНК из плазмы крови, изоляцию моноклеарных клеток периферической крови из цельной крови, выделение ДНК из моноклеарных клеток крови, подготовку части библиотек для секвенирования, депонирование полученных нуклеотидных последовательностей в базу данных GenBank, а также участие в фенотипическом определении тропности клинических изолятов ВИЧ-1.

Автор выполнил оценку эффективности существующих методов генотипического определения тропности изолятов ВИЧ-1, разработал и валидировал модели машинного обучения для генотипического предсказания тропности изолятов суб-субтипа А6 и рекомбинантной формы CRF63\_02A6 ВИЧ-1. Автором разработан графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur, предназначенный для генотипирования и предсказания тропности изолятов ВИЧ-1 на основе последовательности V3 gp120.

Автор принимал непосредственное участие и курировал работу коллег, касающуюся подготовки клеточного материала к секвенированию транскриптома единичных клеток, включая получение суспензии единичных клеток, обратную транскрипцию, амплификацию кДНК, очистку и отбор фрагментов, а также подготовку библиотек. Автором выполнена предобработка, биоинформатическая и статистическая интерпретация данных секвенирования РНК единичных клеток, включая анализ дифференциальной экспрессии генов, аннотацию клеточных популяций и интерпретацию изменений транскриптомного профиля моноклеарных клеток периферической крови при острой ВИЧ-инфекции.

Автором лично выполнены статистическая обработка, обобщение и интерпретация полученных данных, подготовлены основные разделы диссертации, включая обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, обсуждение, выводы и положения, выносимые на защиту. Научные публикации по теме диссертационного исследования подготовлены при непосредственном участии автора. Суммарное личное участие автора в выполнении диссертационного исследования составило не менее 80 %.

### **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 6 публикаций в отечественных и зарубежных изданиях, из которых: 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства

образования и науки РФ для защиты диссертаций, 3 тезиса доклада на всероссийских и международных конференциях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, раздела материалы и методы, собственных исследований, обсуждения проведенной работы, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 180 страницах, иллюстрирована 31 рисунком и содержит 5 таблиц. Библиографический указатель содержит 207 источников отечественных и зарубежных авторов.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Общая характеристика вируса иммунодефицита человека

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относится к роду *Lentivirus* семейства *Retroviridae* [18]. В настоящее время выделяют две основных ветви вируса: ВИЧ-1, который является доминирующим и ответственен за пандемию ВИЧ-инфекции, и ВИЧ-2, эндемичный преимущественно для стран Западной Африки [19, 20].

Зрелый вирион ВИЧ-1 представляет собой сферическую частицу диаметром около 120 нм, покрытую липидной оболочкой, в которую встроены тримеры поверхностного гликопротеина gp120 и трансмембранного гликопротеина gp41 (Рисунок 1) [21]. Под оболочкой находится матриксный белок p17, формирующий внутреннюю выстилку вириона. Центральную часть вириона занимает конический капсид из белка p24, внутри которого заключены две копии одноцепочечной РНК+, связанные с нуклеокапсидным белком p7, а также вирусные ферменты: обратная транскриптаза, интеграз и протеаза [22].

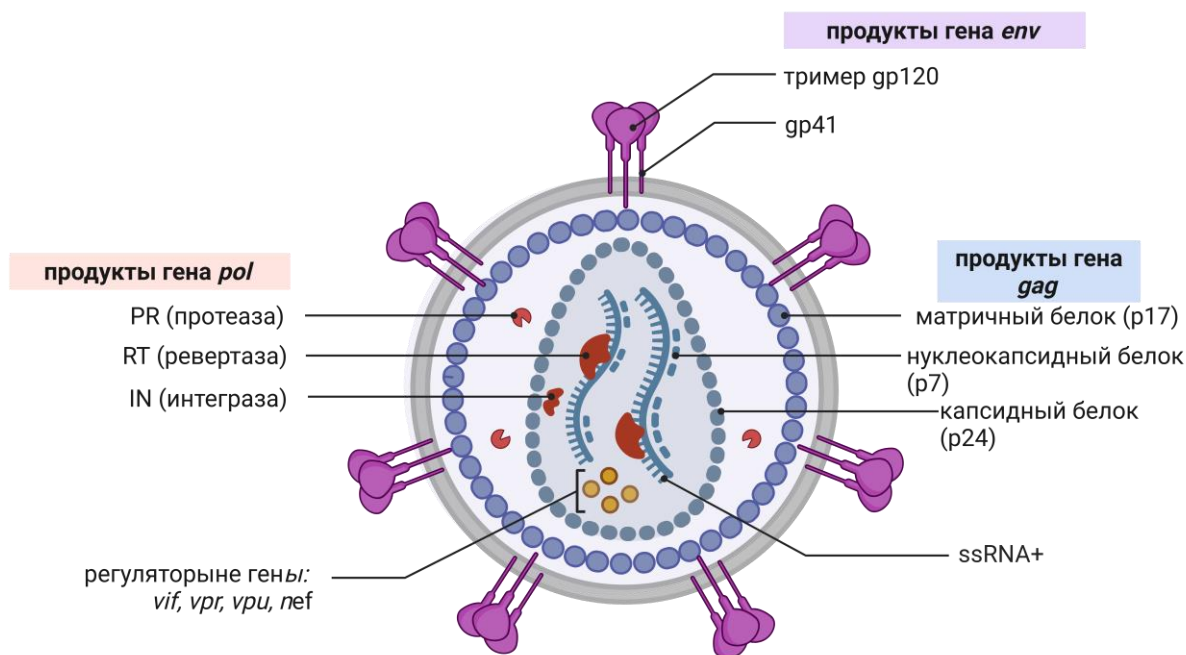


Рисунок 1. Основные структурные и функциональные компоненты вириона ВИЧ-1. Наружная липидная оболочка содержит гликопротеиновые шипы, образованные продуктами гена *env* (тримеры gp120 и gp41). Внутри вириона расположен капсид, сформированный капсидным белком p24 (продукт гена *gag*), внутри которого заключены две копии геномной одноцепочечной РНК (ssRNA+) и комплекс вирусных ферментов (обратная транскриптаза, интегразы и протеазы - продукты гена *pol*). Также схематично показано расположение регуляторных белков (Vif, Vpr, Vpru, Nef).

Геном ВИЧ-1 представлен двумя идентичными молекулами одноцепочечной РНК длиной около 9,8 т.п.н., кодирующей 15 вирусных белков (Рисунок 2) [19]. Организация генома включает три классических структурных гена: *gag* (p17, p24, p7), *pol* (кодирует ревертазу, интегразы и протеазы), и *env* (кодирует предшественник гликопротеинов оболочки gp160, который затем расщепляется на gp120 и gp41). Геном ВИЧ-1 содержит несколько регуляторных генов: *tat* и *rev* необходимы для транскрипции и

экспорта вирусных РНК; *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef* кодируют белки, модулирующие сигнальные пути клетки-хозяина и способствующие уклонению от иммунного ответа [20]. Геном фланкирован длинными концевыми повторами (LTR), которые содержат промоторные и энхансерные элементы, необходимые для транскрипции провирусной ДНК [23].

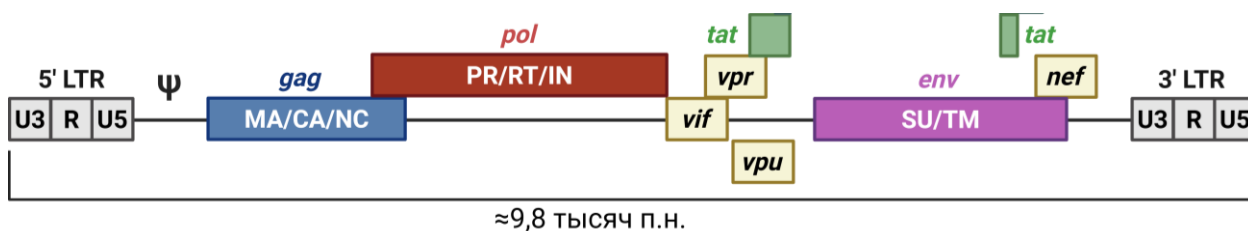


Рисунок 2. Организация генома ВИЧ-1. Геном размером  $\approx 9,8$  тыс. п.н. фланкирован длинными концевыми повторами (LTR) с сигналом упаковки геномной РНК в вирусные частицы ( $\Psi$ ). На схеме показаны три основных структурных гена: *gag* (кодирует матричный белок (MA; p17), капсидный белок (CA; p24) и нуклеокапсидный белок (NC; p7); ген *pol* (кодирует протеазу (PR), обратную транскриптазу (ревертаза; RT) и интегразу (IN)) и ген *env* (кодирует поверхностные белки SU (gp120) и TM (gp41)); регуляторные гены *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*.

Жизненный цикл ВИЧ-1 включает несколько стадий (Рисунок 3). Проникновение вириона начинается с адсорбции: поверхностный гликопротеин gp120 связывается с рецептором CD4 на мембране клетки-мишени, что индуцирует конформационные изменения и последующее взаимодействие с ко-рецептором CCR5 (R5-тропные вирусы) или CXCR4 (X4-тропные вирусы). Как правило от человека к человеку передаются штаммы с R5 тропностью, поскольку CD4+ Т-клетки в половых путях и тканях кишечника обладают высокой экспрессией CCR5, и именно они являются первыми клетками-мишенями. После связывания с ко-рецептором другой

белок gp41 опосредует слияние вирусной и клеточной мембран, в результате чего капсид высвобождается в цитоплазму [21].

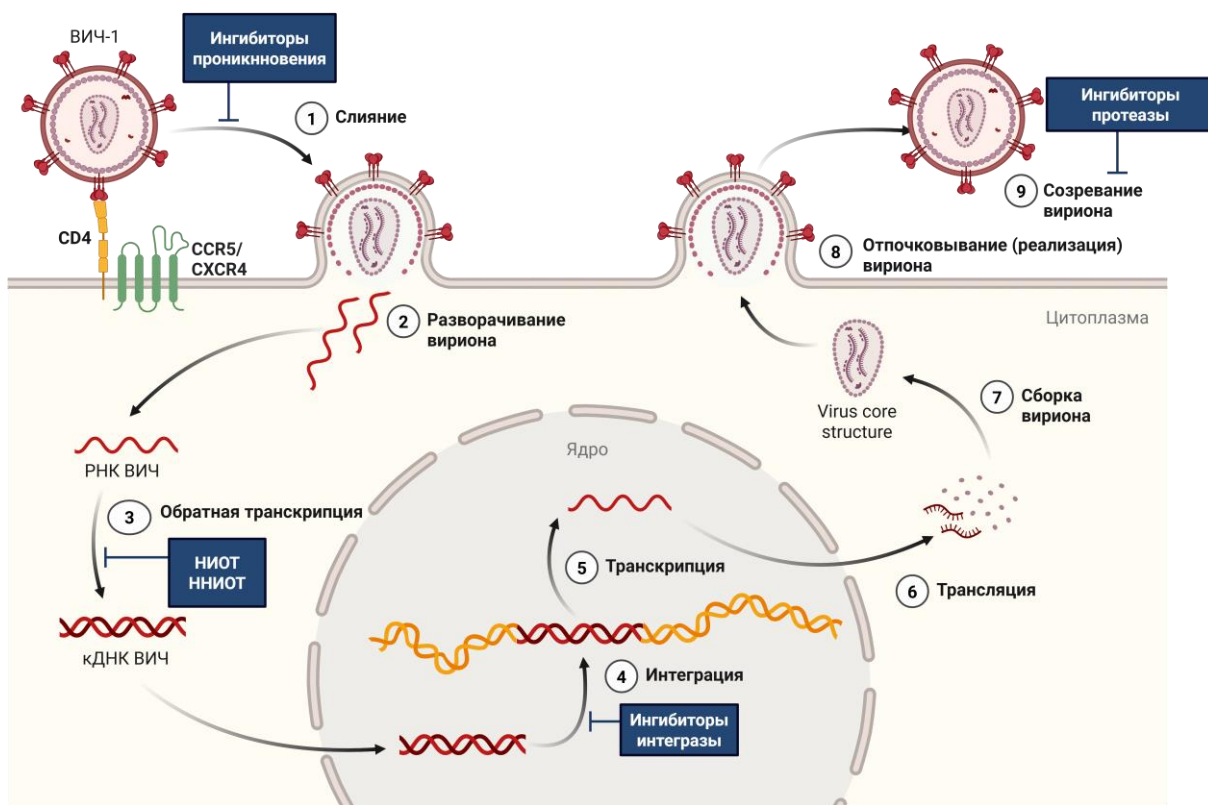


Рисунок 3. Схема жизненного цикла ВИЧ-1 и его стадии, на которые направлены различные классы препаратов АРТ

В цитоплазме происходят транспорт и разворачивание капсида, хотя современные данные свидетельствуют о том, что капсид может сохранять целостность какое-то время [22]. Внутри капсида вирусная РНК при участии обратной транскриптазы (ревертазы) транскрибируется в двухцепочечную комплементарную ДНК. На этом этапе действуют два класса антиретровирусных препаратов - нуклеозидные и нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы. В острую стадию, из-за высокой

скорости репликации, особенно высока вероятность возникновения мутаций, связанных с ошибками ревертазы, что закладывает основу для будущей лекарственной устойчивости.

Образовавшаяся вирусная кДНК в составе преинтеграционного комплекса транспортируется в ядро, где, при участии вирусной интегразы, происходит интеграция провирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Именно этот этап жизненного цикла ВИЧ ответственен за формирование пула (совокупности) провирусных резервуаров ВИЧ в в покоящихся CD4+ Т-клетках памяти, что имеет решающее значение для персистенции вируса, поскольку эти клетки не элиминируются антиретровирусной терапией и обеспечивают вирусный рикошет после её прекращения [20]. Интеграция происходит преимущественно в активные участки хроматина, что обеспечивает высокий уровень транскрипции в случае активации клетки.

После интеграции начинается транскрипция провирусной ДНК клеточной РНК-полимеразой. Для успешной элонгации транскриптов необходим вирусный белок Tat, который связывается с TAR-элементом РНК и рекрутирует фактор элонгации Р-ТЕФб. В острую стадию высокая экспрессия Tat обеспечивает быстрое накопление полноразмерных вирусных РНК и РНК-мишеней для альтернативного сплайсинга. Образовавшиеся вирусные мРНК и геномная РНК экспортируются в цитоплазму с участием белка Rev [21].

Сборка незрелых вирионов происходит на плазматической мембране, куда транспортируется транслированный неразделенный белок Gag. Gag-полипротеин упаковывает две копии геномной РНК и комплекс Gag-Pol [24]. Собранная частица отпочковывается, приобретая липидную оболочку от клетки-хозяина. Созревание вириона происходит уже после его реализации во внеклеточную среду.

## 1.2 Эпидемиология ВИЧ-1 в мире и в России

Эпидемия ВИЧ-1 возникла в Центральной Африке в начале XX в. при зоонозном переносе вируса иммунодефицита обезьян (simian immunodeficiency virus; SIV) от шимпанзе человеку. Глобальную пандемию сформировала группа М ВИЧ-1, которая дифференцируется на несколько «чистых» субтипов (А, В, С, D, F, G, H, J, K) [25] и многочисленные циркулирующие рекомбинантные формы (CRF) [26]. В настоящее время описано уже 197 CRF (URL: <https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/crfdb/crfs.comp>; дата обращения: 10.05.2026).

Границы распространения генетических вариантов ВИЧ сильно зависят от региона мира (Рисунок 4).

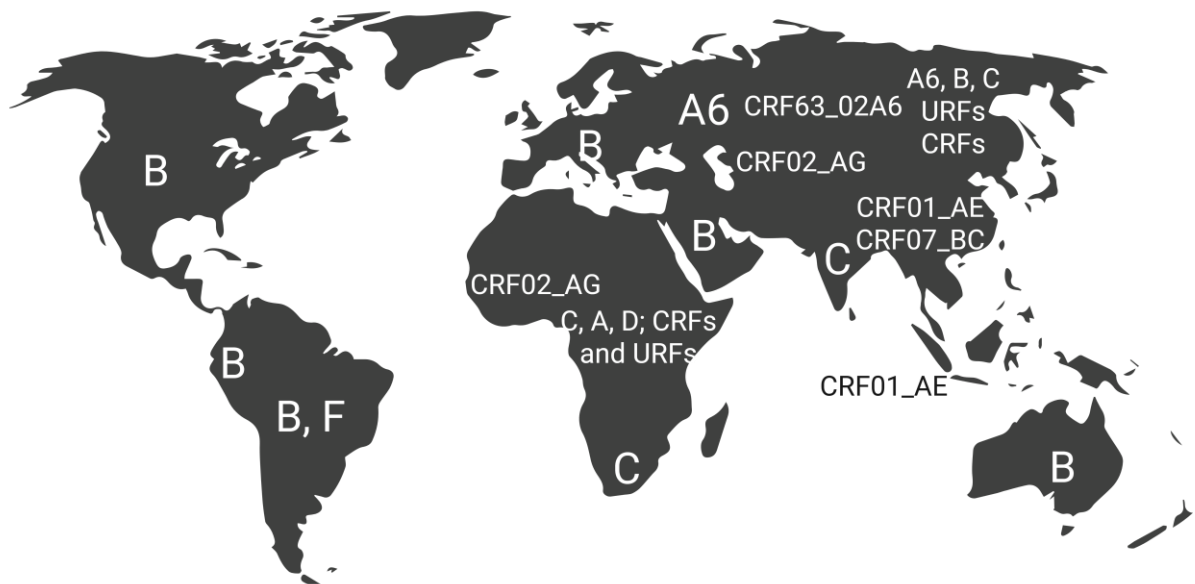


Рисунок 4. Географическое распространение генетических вариантов ВИЧ-1 в мире. Указаны наиболее значимые варианты для каждой территории: субтип В - Северная Америка, Европа, Южная Америка, Ближний Восток, Австралия; Западная Африка - CRF02\_AG; Африка к югу от Сахары - субтипы А, С, D; субтип С - Южная Африка, Индия; Китай и Юго-Восточная Азия - CRF01\_AE и CRF07\_BC; западная часть России и Восточная Европа - суб-субтип А6, сибирские регионы России - CRF63\_02A6, дальневосточные регионы России - А6, В, С, различные CRF и URF; Центральная Азия - CRF02\_AG

Субтип В отвечает примерно за 10% случаев ВИЧ-инфекции в мире и встречается в Северной Америке, Западной Европе, Австралии и многих странах Латинской Америки [27]. Однако, субтип В выявляется практически во всех регионах мира, включая страны Восточной Европы (Россия, Украина, Беларусь, Польша) [28, 29]. Центральной Азии (Азербайджан, Кыргызстан, Таджикистан, Узбекистан) [30, 31], Азиатско-тихоокеанском регионе

(Индонезия, Таиланд, Вьетнам) [32], а также в странах Северной Африки (Алжир, Египет, Марокко, Тунис, Судан и др.) [33].

Субтип С доминирует в Южной и Восточной Африке (около 50% всех случаев) [34] и Индии [35].

Субтип А ВИЧ-1 подразделяется на суб-субтипы А1, А2 и А3 [36], а также А4, А6 [37] и А7 [38]. Суб-субтип А1 широко распространен в Африке, особенно в её восточной части (Кения, Уганда, Танзания, Руанда) [38]. Суб-субтип А2 можно обнаружить на Кипре, в Восточной, Центральной и Западной Африке [39]. Суб-субтипы А3, А4 и А5 встречаются редко и описываются по относительно небольшому числу депонированных последовательностей, при этом чистые штаммы А5 не выявлены. Этот геновариант встречается только в участках генома CRF26\_A5U [40]. Суб-субтип А6 является наиболее распространённым геновариантом ВИЧ-1 в России [41] и странах СНГ: Казахстане [42], Кыргызстане, Таджикистане, Туркменистане и Узбекистане [43].

Эпидемия ВИЧ субтипа D географически ассоциирована со странами Восточной Африки (Уганда, Танзания и Кения) [44, 45] и Центральной Африки (Демократическая Республика Конго) [46].

В «чистом виде» субтип E ВИЧ-1 в настоящее время не существует. Однако он входит в состав одной из наиболее распространённых циркулирующих рекомбинантных форм CRF01\_AE. Эта рекомбинантная форма возникла в результате смешения геномов субтипа А (в регионе гена gag) и субтипа E (в регионе гена env) [47].

Суб-субтип F1 получил большее распространение в результате вспышки ВИЧ среди детей в 1980-е годы, связанной с применением нестерильных медицинских инструментов. В настоящее время более 70% случаев ВИЧ-инфекции в Румынии вызваны субтипом F1 [48]. Суб-субтип F1 особенно представлен в Бразилии [49]. Суб-субтип F2 ВИЧ-1, обладает более

ограниченным географическим распространением, а потому изучен хуже. Он выявлялся в Демократической Республике Конго [50].

Субтип G отвечает примерно за 4,6 % случаев ВИЧ-инфекции в мире, поэтому он, вероятно, не играет значительной роли в глобальной эпидемии ВИЧ [51]. Исторически он эндемичен для Нигерии, Камеруна и Анголы [52].

Субтип H был обнаружен в 1990-е годы в Демократической Республике Конго и Камеруне. При этом нет ни одной страны, для которой этот субтип был бы характерен исключительно; речь идёт о его распространении в регионе Центральной Африки, включающем Демократическую Республику Конго, Центральноафриканскую Республику, Камерун и Габон [53]. Этот субтип встречается крайне редко и обуславливает примерно 0,17 % случаев ВИЧ-инфекции в мире [54].

Генетический вариант, ранее принятый за чистый субтип I, оказался рекомбинантной формой CRF04\_srx с мозаичным геномом из фрагментов субтипов A1, G, K и H [55].

Субтип J выявляется редко и преимущественно циркулирует в странах Центральной Африки, включая Камерун, Демократическую Республику Конго и Габон. Изолированные случаи зарегистрированы в Европе и Северной Америке и связаны с миграцией из эндемичных регионов. Распространённость субтипа J в эндемичных странах оценивается в 1-8 %, поэтому он не играет значительной роли ни в глобальной эпидемии ВИЧ, ни в локальном распространении вируса в Африке [56].

Субтип K группы M ВИЧ-1, как большинство генетических вариантов этого вируса с низкой распространённостью, циркулирует в Африке. Инфекции, вызванные этим субтипом, локализованы в центральной части континента (Демократическая Республика Конго, Камерун и Габон) [57]. Изолированные случаи субтипа K были зарегистрированы в Европе и Северной Америке, однако они связаны с миграцией из эндемичных регионов.

В целом на долю субтипа К приходится не более 0,1 % случаев ВИЧ-инфекции в мире [57].

### **1.3 Появление и эпидемиология суб-субтипа А6 ВИЧ-1**

Нужно учитывать, что отдельные регионы мира имеют свои уникальные особенности эпидемии ВИЧ-1. Это относится и к Восточной Европе, и к странам бывшего СССР (former soviet union, FSU). Суб-субтип А6 является наиболее распространённым геновариантом ВИЧ-1 в России [41] и других странах FSU: Казахстане [42], Кыргызстане, Таджикистане, Туркменистане и Узбекистане [43]. Изучение эпидемиологии А6 крайне актуально, поскольку этот генетический вариант ВИЧ активно распространяется в восточно-европейском регионе ВОЗ, где число новых случаев ВИЧ-инфекции продолжает расти вопреки мировой тенденции к уменьшению количества новых случаев ВИЧ-инфекции год к году [58].

Филогенетический анализ показал, что суб-субтип А6 произошёл от африканского суб-субтипа А1 [13]. В Польше основной путь передачи ВИЧ-1 А6 — гетеросексуальный контакт (61,3%). Также он распространён среди потребителей инъекционных наркотиков (26,1%) и в группе MSM (мужчины, имеющие секс с мужчинами; 10,8 %) [29].

Географическое распространение суб-субтипа А6 на территории России захватывает в основном западную часть страны, например Москву, где в 2011-2016 гг. 85,1 % отобранных образцов принадлежали к суб-субтипу А6 [59]. В 2020 году было продемонстрировано широкое распространение суб-субтипа А6 ВИЧ-1 за пределами Западной части России - в Красноярской области, где 91 из 159 (57,2%) генотипированных изолятов был определен как суб-субтип А6 [60]. Среди 1369 образцов, собранных в период с 2005 по 2019 годы в Центральном, Северо-Восточном, Приволжском, Южном, Уральском, Сибирском и Дальневосточном федеральных округах, суб-субтип А6 был обнаружен в 1 199 образцах (87,7 %) [61].

В Грузии также доминирует этот генетический вариант ВИЧ-1: из 447 ВИЧ-положительных пациентов 382 (85,5%) были инфицированы А6 ВИЧ-1 [62]. Суб-субтип А6 ответственен за большинство случаев ВИЧ-инфекции и в других, соседних с Россией странах: в Армении, Азербайджане и Беларуси доля пациентов с А6 составляет 79,2%, 88,5% и 93,7% соответственно [63]. Такое обширное распространение суб-субтипа А6 объясняется активными миграционными, туристическими и транспортными потоками между странами бывшего Советского Союза. А6 можно обнаружить и за пределами бывших стран СССР, например, в 2022 г. он был впервые выявлен в одной из провинций Китая [64].

#### 1.4 CRF63\_02A6: образование и распространение

Циркулирующая рекомбинантная форма CRF63\_02A6, первоначально описанная как CRF63\_02A1, возникла в результате вторичной рекомбинации между двумя генетическими вариантами ВИЧ-1, длительно циркулировавшими на постсоветском пространстве. Её родительскими штаммами являются суб-субтип А6 (ранее обозначавшийся как вариант IDU-A), абсолютно доминировавший в России с середины 1990-х годов, и CRF02\_AG из центральноазиатской линии этого рекомбинанта [12, 65]. Генетическая структура CRF63\_02A6 представляет собой сложную мозаику из фрагментов генома обоих предшественников (Рисунок 5) [14, 66].

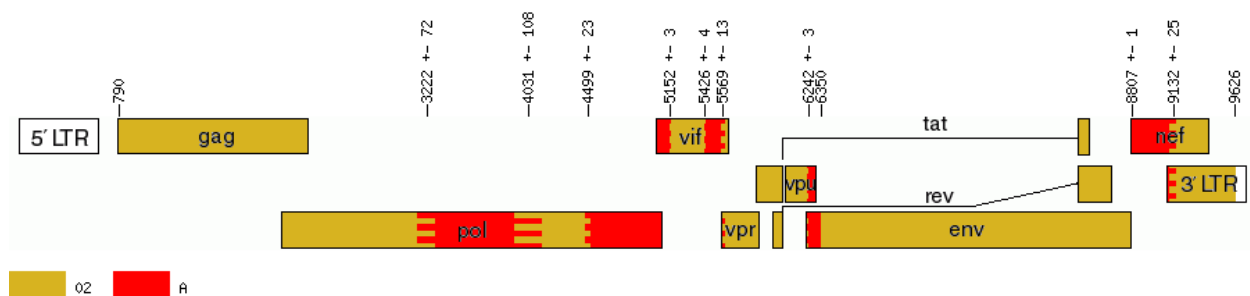


Рисунок 5. Структура генома циркулирующей рекомбинантной формы CRF63\_02A6 ВИЧ-1. Участки, унаследованные от CRF02\_AG, и фрагменты, происходящие от суб-субтипа А6, выделены различными цветами (CRF02\_AG -

коричневый; А6 - красный). Вертикальными линиями и числовыми значениями отмечены координаты точек рекомбинации относительно референсного генома HXB2 (GenBank accession number: K03455). В верхней части схемы обозначены основные открытые рамки считывания и структурные элементы генома, включая gag, pol, vif, vpr, vpu, env, tat, nef, а также 5'- и 3'-LTR. Структура рекомбинанта реконструирована на основании консенсусных нуклеотидных полногеномных последовательностей CRF63\_02A6

Первые зафиксированные случаи появления этой рекомбинантной формы были выявлены в г. Новосибирске в 2006-2008 годах [15, 67]. Филогенетический анализ с использованием гена *pol* ВИЧ-1, позволил точно датировать время возникновения кластера CRF63\_02A6: время жизни наиболее позднего общего предка приходится на 2004-2005 годы. Наиболее актуальная реконструкция с высокой степенью надежности указывает на г. Новосибирск как на место возникновения этого варианта.

Первоначальная вспышка CRF63\_02A6 в Новосибирской области привела к стремительному вытеснению ранее доминировавшего суб-субтипа А6. Уже в 2013 году в Новосибирской области доля CRF63\_02A6 среди новых случаев ВИЧ-инфекции достигала 81,2%, а сам вариант активно передавался как среди потребителей инъекционных наркотиков, так и половым путем [66]. Далее последовало активное распространение рекомбинанта в соседних регионах. В Томской области в период 2013-2014 годов, на фоне высокой заболеваемости, CRF63\_02A6 выявлялся у 90,2% впервые диагностированных пациентов, при этом под-субтип А6 был обнаружен лишь в 4,9% случаев [14]. Аналогичная картина наблюдалась в Кемеровской области, где по результатам обследования пациентов с впервые выявленной инфекцией в 2015 году CRF63\_02A6 был обнаружен в 71,7% всех случаев ВИЧ-инфекции, тогда как доля суб-субтипа А6 сократилась с 60,5% в 2013 году до 7,5% в 2015 году [68]. В Алтайском крае среди пациентов с вирусологической неэффективностью

терапии в 2021-2023 годах CRF63\_02A6 был ведущим вариантом (52,0%), опережая суб-субтип A6 (42,5%) [69].



Рисунок 6. Географическое распределение преобладающих генетических вариантов ВИЧ-1 на территории России. На карте отражено преобладание двух основных геновариантов, циркулирующих в Российской Федерации. Красным цветом обозначены регионы, где доминирует суб-субтип A6 (включая Москву, Санкт-Петербург, Владивосток и центральные области). Синим цветом выделены регионы, в которых наиболее распространенным вариантом является форма CRF63\_02A6. Как показано на карте, CRF63\_02A6 в первую очередь охватывает несколько регионов Сибирский федеральный округ (Новосибирская, Томская, Кемеровская области, Алтайский край), а также Камчатский край на Дальнем Востоке.

Помимо Сибири, высокая частота CRF63\_02A6 отмечена в Северо-Кавказском (20,5%) и Дальневосточном (10,3%) федеральных округах [12].

Локальные исследования подтверждают его широкое распространение в самых разных уголках страны: на о. Сахалин CRF63\_02A6 выявлен у 4,7% обследованных [70], в Магаданской области - у 7,7% пациентов [71], в Еврейской автономной области - у 6,3% [17]. CRF63\_02A6 встречается и за пределами России, при этом доля депонированных последовательностей этого генетического варианта из-за пределов России составляет 4,6% [15]. В Кыргызстане доля CRF63\_02A6 составила 1,8% [30], в Армении - 2,7% [72]. Единичные находки зафиксированы в Узбекистане, Казахстане, Таджикистане, Азербайджане и Грузии [15].

Внедрение CRF63\_02A6 в популяции, в которых циркулировал суб-субтип A6, создало условия для множественной рекомбинации между ними. В Кемеровской области уже в 2015 году доля уникальных рекомбинантных форм между CRF63\_02A1 и A6 (URF63\_A1) достигала 20,8% всех впервые выявленных случаев; все они имели различную структуру и возникли независимо, преимущественно у потребителей инъекционных наркотиков (ПИИ), практикующих рискованное поведение, способствующее реинфекции [68]. Аналогичные рекомбинанты регистрировались в Томской области (4,9%) [67] и в Алтайском крае (3,8%) [69]. Наиболее ярким примером дальнейшей эволюции является недавно описанная циркулирующая рекомбинантная форма «второго поколения» - CRF173\_63A6. Анализ полных геномов показал, что CRF173\_63A6 образовалась путем рекомбинации между CRF63\_02A6 и суб-субтипом A6, содержит 7 точек разрыва и активно распространяется в Дальневосточном регионе, в первую очередь в Еврейской автономной области и Приморском крае, как среди потребителей инъекционных наркотиков, так и половым путем [17]. По данным филогенетического анализа, 54 последовательности из GenBank, выделенные на Дальнем Востоке, принадлежат к этому же кластеру, что указывает на его широкое распространение. Таким образом, CRF63\_02A6 не только стал ведущим генетическим вариантом в Сибири, но и продолжает генерировать новые

рекомбинантные линии, усугубляя генетическую сложность эпидемии ВИЧ-1 на постсоветском пространстве.

### **1.5 Острая фаза ВИЧ-инфекции**

Острая ВИЧ-инфекция представляет собой начальный и во многом определяющий этап патогенеза заболевания. Временные рамки этой стадии охватывают, по разным оценкам и классификациям (WHO, CDC, Покровский, Fiebig), охватывают от 12 недель до 6 месяцев после инфицирования. Лабораторная диагностика острой стадии базируется на классификации Fiebig, которая выделяет шесть последовательных стадий (I-VI) в зависимости от динамики появления в крови вирусной РНК, антигена р24 ВИЧ и специфических антител [73]. Первые три стадии характеризуются детекцией вирусной РНК и антигена (белка) р24 при отрицательных или неопределённых результатах иммуноблота, тогда как на этапах IV-VI происходит постепенное нарастание титра антител (Рисунок 7).

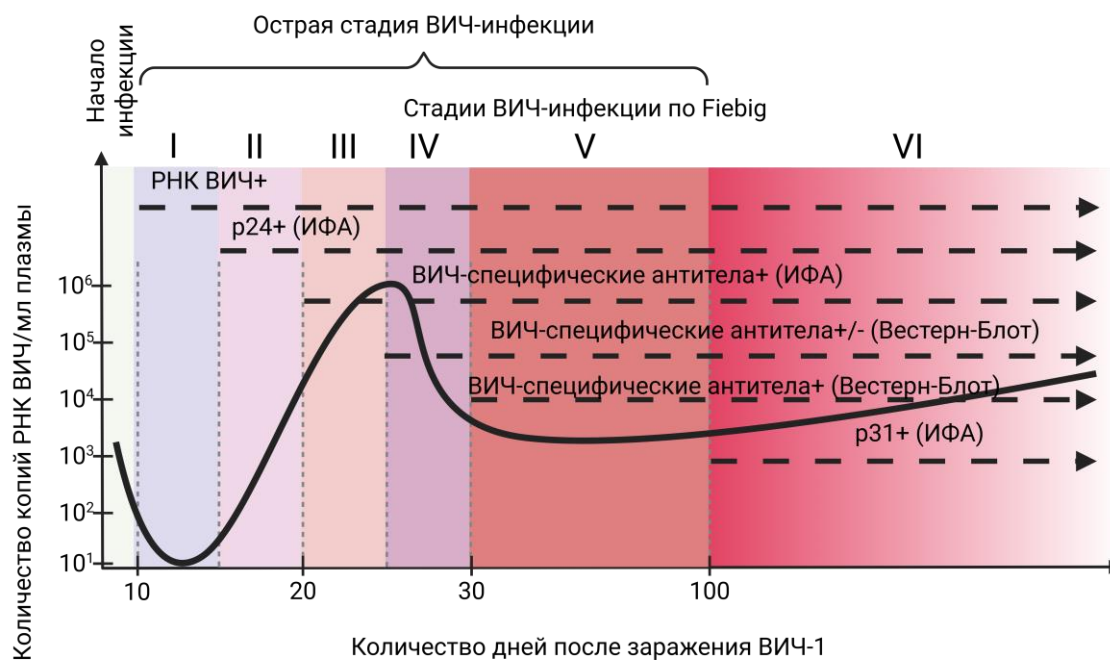


Рисунок 7. Классификация стадий ВИЧ-инфекции по Fiebig. На графике показана динамика вирусной нагрузки (сплошная кривая) и временные интервалы появления диагностических маркеров на шести последовательных стадиях (I-VI) после заражения.

Центральными патогенетическими событиями этого периода являются мощный «цитокиновый шторм» и массивная гибель CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [74]. В период от 7 до 21 дня вирусная нагрузка стремительно достигает пика и составляет до более чем 10 000 000 копий РНК/мл плазмы. Как показали исследования, среди женщин в острой фазе ВИЧ-инфекции, вызванной субтипом С, у наивных лиц развивается цитокиновый шторм, сопровождающийся подъёмом уровней 12 из 33 проанализированных медиаторов воспаления, включая IP-10, MIG, MCP-1, IL-12, IFN- $\alpha$  и IL-6 [75]. Этот провоспалительный ответ индуцирует апоптоз как ВИЧ-специфичных, так и неспецифичных Т- и В-лимфоцитов, внося значительный вклад в быстрое истощение пула CD4<sup>+</sup> Т-клеток, особенно в тканях желудочно-кишечного тракта [76, 77].

Ключевую роль в раннем реагировании на вирус играет врождённый иммунитет. Миелоидные клетки, такие как макрофаги и дендритные клетки, первыми распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) ВИЧ-1 и запускают продукцию интерферонов I и II типов [78, 79]. Среди механизмов врождённой защиты особенно выделяются натуральные киллеры (NK), чья антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) вносит существенный вклад в элиминацию инфицированных клеток. Одна из работ продемонстрировала, что у пациентов, начавших АРТ до сероконверсии, ADCC-активность NK-клеток в составе мононуклеаров периферической крови (PBMC) значительно выше, чем у лиц, стартовавших лечение при низком уровне CD4<sup>+</sup> Т-клеток или остававшихся без терапии. Эта повышенная цитотоксичность была ассоциирована с большей долей CD16-позитивных NK-клеток и положительно коррелировала с длительностью АРТ, при этом экспрессия лимфоидного хоминг-маркёра CCR7 на этих клетках обратно пропорциональна их литической функции, что указывает на фенотипические сдвиги, сопровождающие функциональное восстановление NK-компартамента под действием терапии [80].

Одновременно с системным воспалением происходит поражение слизистых барьеров. Одной из наиболее уязвимых для персистенции ВИЧ-1 в острую фазу служит лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником (GALT), где сосредоточена основная масса активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Вирус преимущественно инфицирует и вызывает гибель популяции Th17, играющей критическую роль в поддержании целостности кишечного эпителия [81]. При этом наблюдается характерное для ВИЧ-инфекции истощение Т-клеток, которое приводит к нарушению плотных межклеточных контактов, дисфункции эпителиального барьера и, как следствие, к транслокации микробных продуктов, в первую очередь липополисахаридов (LPS), из просвета кишечника в системную циркуляцию. Этот процесс рассматривается в качестве одного из драйвера хронической иммунной

активации и системного воспаления, которые, будучи запрограммированными в острую фазу, сохраняются у многих пациентов даже после успешного подавления вирусной нагрузки на фоне АРТ.

Фундаментальным событием, определяющим пожизненную персистенцию ВИЧ-1, является формирование латентного вирусного резервуара [82]. Он закладывается в самые ранние сроки после заражения: провирусная ДНК интегрируется в геном как активно делящихся, так и покоящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток, создавая долгоживущий пул невидимых для иммунной системы и недоступных для антиретровирусных препаратов инфицированных клеток [83]. Общее содержание ДНК ВИЧ-1 в РВМС служит надёжным клиническим маркёром размера этого резервуара, хотя и не позволяет различить репликативно-компетентные и дефектные формы. Для разграничения репликативно-компетентных и дефектных форм вируса были разработаны специализированные методы. «Золотым стандартом» оценки латентного резервуара долгое время служил количественный анализ вирусного роста (Quantitative Viral Outgrowth Assay, QVOA), позволяющий измерить долю клеток, несущих репликативно-компетентный провирус с помощью принудительной активации покоящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro* (Рисунок 8) [84]. QVOA крайне трудозатратен и систематически недооценивает размер резервуара, поскольку не все интактные провирусы индуцируются за один раунд активации Т-клеток. Более современный метод - анализ интактной провирусной ДНК (Intact Proviral DNA Assay, IPDA) - представляет собой высокопроизводительную капельную цифровую ПЦР (ddPCR) с как минимум двумя наборами праймеров и зондов для детекции консервативных участков генома и дальнейшем просмотре количества ПЦР-продуктов в одном объеме проводимой реакции (Рисунок 8) [85, 86].

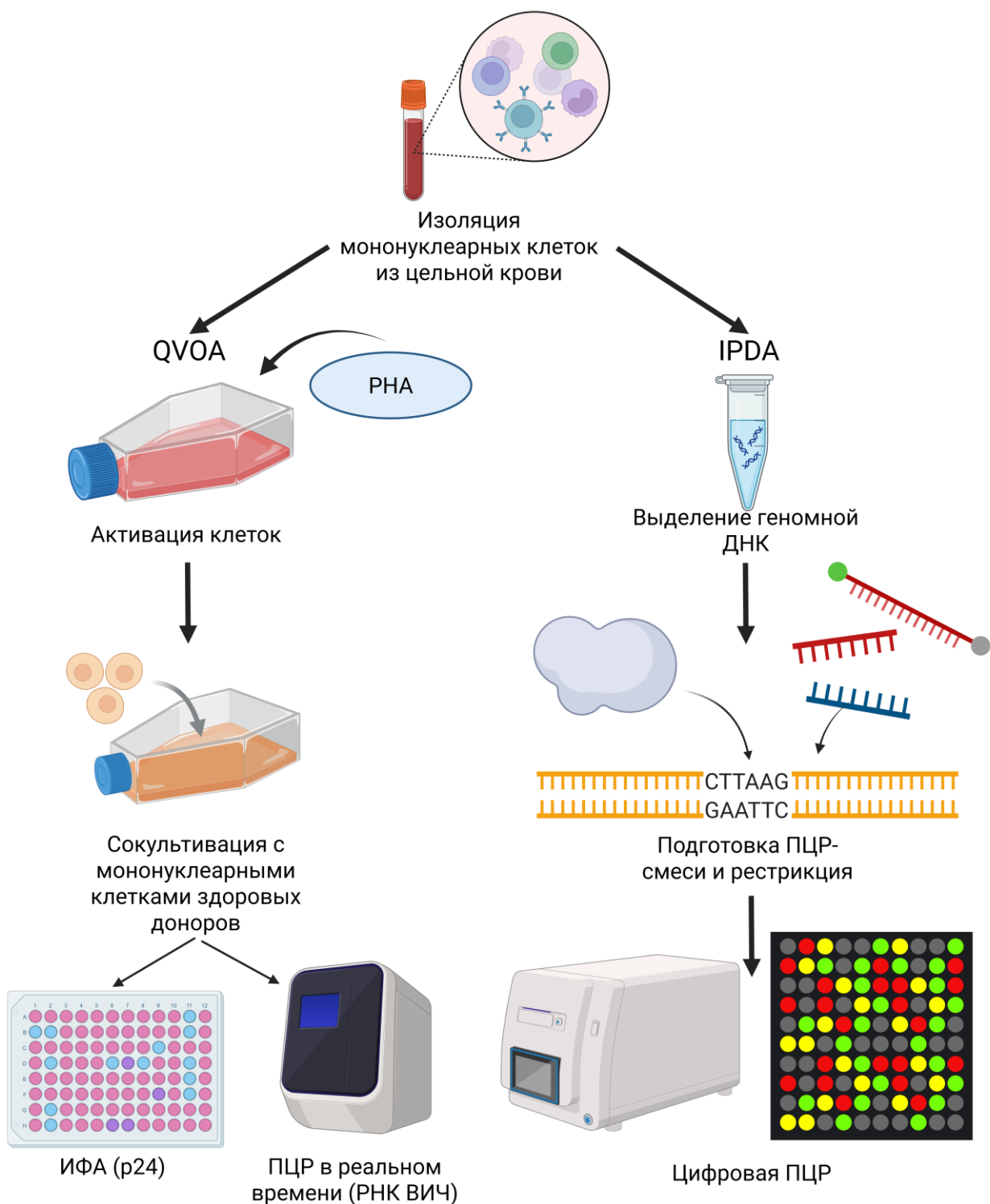


Рисунок 8. Схематичное отображение принципов постановки наиболее распространенных методов исследования провирусного ландшафта ВИЧ-1: QVOA и IPDA

Провирус считается интактным, если в одной капле нанолитрового объема обнаруживаются продукты всех пар праймеров. Важно подчеркнуть,

что IPDA даёт оценку, в среднем в 19-52 раза превышающую данные QVOA, но при этом в ~19 раз ниже, чем общая ДНК ВИЧ-1, что указывает на огромный вклад дефектных провирусов в общий пул резервуаров.

Основными клеточными депо латентного вируса выступают субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти: в острую фазу доминирующим резервуаром являются Т-транзиторные клетки памяти (Т<sub>ТМ</sub>), тогда как при хронической инфекции на первый план выходят центральные клетки памяти (Т<sub>СМ</sub>), чья длительная продолжительность жизни обеспечивает многолетнюю персистенцию вируса. При этом даже дефектные провирусы способны продуцировать вирусные РНК и белки, поддерживая хроническую иммунную активацию [87] и истощение мононуклеарных клеток [87].

Известно, что генетический вариант ВИЧ-1 может влиять на клиническое течение ВИЧ-инфекции в отсутствие АРТ. Одно из сравнительных исследований выявило, что у лиц, инфицированных субтипом С, темпы потери CD4<sup>+</sup> Т-клеток происходят быстрее на 60% по сравнению с субтипом А [88]. Другая работа, также посвященная сравнению субтипа А и С, продемонстрировала, что при близких репликативных способностях инфекция субтипом С сопровождается более выраженной индукцией провоспалительных цитокинов: значимое повышение относительно доконтактного уровня было зарегистрировано для 11 цитокинов во время инфекции с субтипом С ВИЧ-1 (TNF $\alpha$ , ITAC, IFN $\gamma$ , IL10, IL12, IL13, IL17 $\alpha$ , IL23, IL4, IL5, IL6) против лишь 6 при субтипе А (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL12, IL17 $\alpha$ , IL6, and MIP1 $\alpha$ ). При этом для обоих субтипов подтверждена связь высокой vRC с ускоренным снижением уровня CD4<sup>+</sup> Т-клеток и повышенным уровнем хемокина ITAC (CXCL11), который был идентифицирован как новый биомаркер, ассоциированный с быстрым прогрессированием заболевания [88].

Одна из работ, касающаяся особенностей течения острой фазы была проведена и в России с сравнительным исследованием суб-субтипа А6 и

CRF63\_02A6. Среди госпитализированных больных в 2017-2018 гг. преобладали лица молодого трудоспособного возраста, у которых заболевание манифестировало лихорадкой (99% случаев), экзантемой (65,5%) и генерализованной лимфаденопатией (54,0%) на фоне высокой вирусной нагрузки, превышавшей у 56% пациентов 10 000 000 копий/мл. Филогенетический анализ этих последовательностей ВИЧ-1 из Сибири показал доминирование рекомбинантного варианта CRF63\_02A6 (76%) над суб-субтипом А6 (19,7%). Инфекция, вызванная CRF63\_02A6, отличалась более тяжёлым клиническим течением: в этой группе достоверно чаще фиксировалась длительная лихорадка (более 10 дней), генерализованная лимфаденопатия и экстремально высокая вирусная нагрузка ( $>10^7$  копий/мл у 67,8% против 33,4% для А6) [89], что подчёркивает клиническую значимость детального исследования молекулярно-генетических и вирусологических характеристик суб-субтипа А6 и CRF63\_02A6, которые являются доминирующими генетическими вариантами ВИЧ-1 в России.

### **1.6 Тропность штаммов ВИЧ-1, клиническая значимость выбора тропности и способы её лабораторного определения**

Область третьей петли - V3 поверхностного гликопротеина gp120 ВИЧ представляет собой домен протяжённостью около 35 аминокислотных остатков, который является основным детерминантом клеточного тропизма ВИЧ-1. Именно эта область определяет, какой хемокиновый клеточный корецептор (CCR5 или CXCR4) будет задействован для запуска слияния вирусной и клеточной мембран, а, следовательно, и то, какие клетки-мишени окажутся инфицированными [90]. Связывание gp120 с первичным рецептором CD4 вызывает каскад конформационных перестроек, в результате которых V3-петля экспонируется из внутреннего домена gp120 во внешнюю область и приобретает способность взаимодействовать с корецептором. Нужно отметить, что штаммы ВИЧ-1 можно разделить на три группы в контексте их

тропности (Рисунок 9) [91]: (I) штаммы, использующие рецептор CCR5 относят к группе с R5 тропностью; (II) штаммы использующие рецептор CXCR4 относят к группе с X4 тропностью; (III) штаммы, способные использовать оба рецептора (CCR5 и CXCR4), относят к группе с двойной тропностью - R5/X4. При этом даже штаммы с двойной тропностью преимущественно используют один из рецепторов, но сохраняют возможность использовать и второй (Рисунок 9) [92].

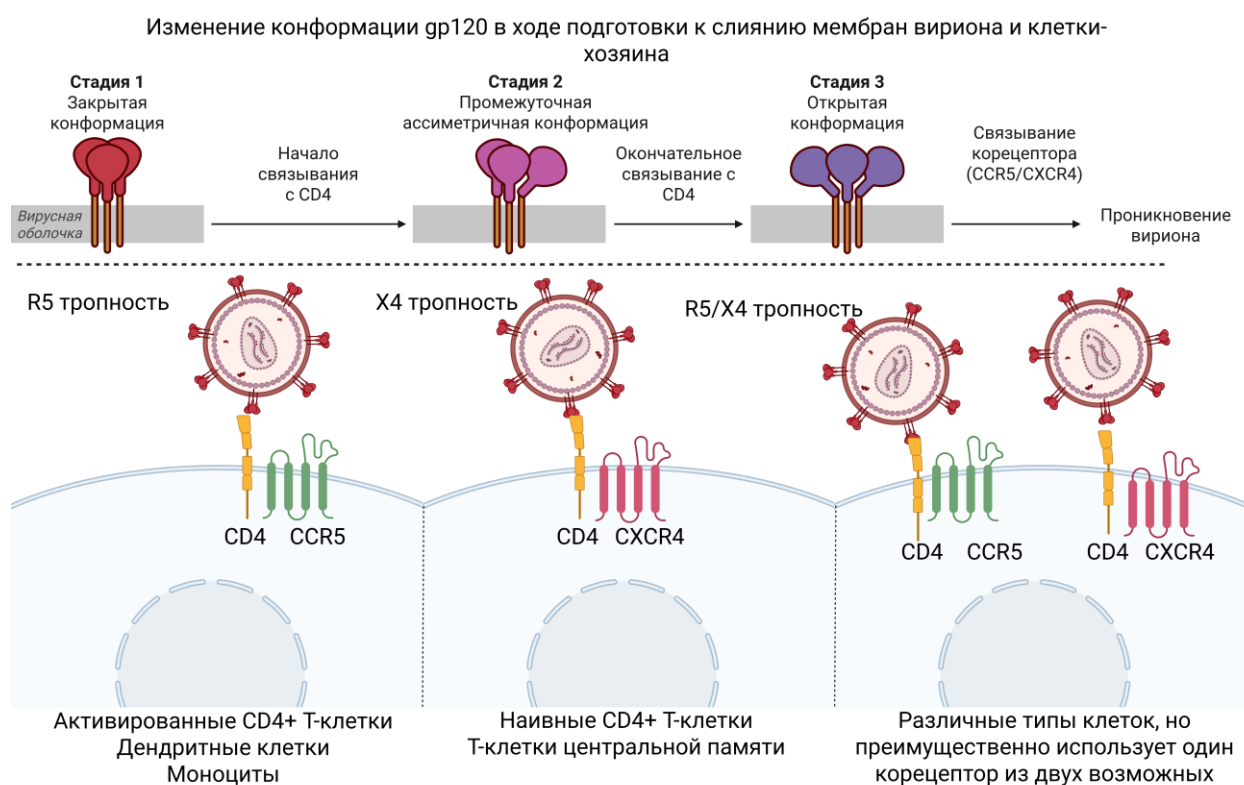


Рисунок 9. Схематическое представление механизма проникновения ВИЧ-1 и типов тропности к корецепторам (CCR5 и CXCR4). Верхняя панель иллюстрирует последовательные конформационные изменения поверхностного гликопротеина gp120 при связывании с первичным рецептором CD4, которое завершается раскрытием V3-петли из внутреннего домена gp120 и последующим взаимодействием с корецепторами CCR5 или CXCR4, что запускает процесс проникновения в клетку с помощью белка слияния gp41 ВИЧ. Нижняя панель демонстрирует три основных типа тропности штаммов ВИЧ-1: R5-тропные штаммы (используют CCR5, преимущественно инфицируют активированные

CD4+ Т-клетки, дендритные клетки и моноциты); X4-тропные штаммы (используют CXCR4, поражают наивные CD4+ Т-клетки и Т-клетки центральной памяти); и штаммы с двойной тропностью R5/X4 (способны использовать оба корцептора, сохраняя преимущественную направленность к одному из них)

Центральную роль в детерминации тропности играет электростатический заряд V3-петли. Сравнительный анализ последовательностей из базы данных нуклеотидных последовательностей Los Alamos National Laboratory (LANL) показал, что X4-штаммы отдают статистически значимое предпочтение более высокому чистому положительному заряду V3 по сравнению с R5-штаммами, причем варианты с двойной тропностью (X4/R5) по данному показателю занимают промежуточное положение [93]. В недавнем исследовании Abisi et al. (2022) на когорте из 76 женщин в острой стадии ВИЧ-инфекции в Найроби (Кения) с доминированием субтипа А (89,5%) было количественно подтверждено, что увеличение чистого заряда V3-петли на одну единицу повышает шансы принадлежности вируса к X4-тропному варианту в 2,4 раза. Более того, авторами был обнаружен новый генетический маркер X4-тропизма, специфичный для суб-субтипа А1: замена аланина на треонин в положении 22 V3-петли ассоциировалась с X4 тропностью [94].

Другое общее правило для формирования тропности на основе аминокислотной последовательности V3 петли учитывает отдельные аминокислотные остатки (также положительно-заряженные) в определенных аминокислотных позициях. Особое внимание уделяется позициям аминокислотных остатков 11 и 25 V3, которые находятся на противоположных сторонах  $\beta$ -шпильки gp120 и пространственно сближены, формируя важные участки для контакта с CCR5 или CXCR4 [95, 96]. У R5 штаммов в позиции 11 обычно находится аминокислотный остаток серина, и одна из отрицательно заряженных аминокислот (аспарагиновая или глутаминовая) в позиции 25. Это

создает локальный диполь, стабилизирующий конформацию со сродством к рецептору CCR5. У X4-штаммов замена обоих остатков на положительно-заряженные (лизин или аргинин) вызывает электростатическое отталкивание, которое перестраивает петлю в конформацию со сродством к CXCR4 [97]. Поскольку аминокислотные остатки внеклеточного домена CCR5 заряжены более отрицательно, чем у CXCR4, R5 вирусы используют локальную нейтральность своей V3 для продуктивного связывания, а появление двух положительных зарядов в позициях 11/25 смещает предпочтение в сторону более подходящего электростатического окружения CXCR4. Именно поэтому классическое «правило 11/25» сохраняет высокую специфичность (93%) для идентификации R5-тропных штаммов, несмотря на развитие более сложных генотипических алгоритмов. Однако, правило 11/25 имеет низкую чувствительность по выявлению X4 штаммов, поэтому его нельзя назвать универсальным правилом [98].

Ряд других областей gp120, а также уровень гликозилирования белка, вносят существенный вклад в формирование фенотипа. Исследование N-гликозилирования изолята DH12 с двойной тропностью [99] показало, что сайты гликозилирования, расположенные вблизи петель V1/V2 (N135, N141, N156, N160) и внутри V3 (N301), являются значимыми при выборе тропности. При этом замена остатка аспарагина на глутамин в любом из этих положений приводила к значительному снижению или полной утрате способности индуцировать слияние мембран. Особый интерес представляет мутация по сайту N301: она полностью подавляла R5 тропность, однако сохраняла около 50% активности при использовании X4 тропности [99].

Регионы петель V1 и V2 также участвуют в регуляции использования корецепторов. В одной из работ отмечено, что конформационная динамика этих петель способна модулировать доступность V3 и консервативного участка связывания корецептора, расположенного на «мостиковом»  $\beta$ -листе между gp120 и CCR5/CXCR4 [100].

Многие исследователи отмечают, что на ранних стадиях инфекции и независимо от пути передачи доминируют R5 варианты, которые имеют некоторые преимущества при передаче от человека к человеку [9, 101]. Этот феномен объясняется совокупностью биологических барьеров, которые легче обойти квазивидам с R5 тропностью. Во-первых, мукозальный эпителий слизистых оболочек половых органов секретует эндогенный лиганд для CXCR4, именуемый SDF-1/CXCL12. Он конкурентно блокирует X4 квазивиды ВИЧ-1, не влияя на R5-варианты. Напротив,  $\beta$ -хемокины, являющиеся лигандами CCR5, не находятся на слизистых оболочках в высоких концентрациях, достаточных для связывания gp120 R5 вариантов [102]. Во-вторых, CD4<sup>+</sup> Т-клеток-мишени для ВИЧ, находящиеся на слизистых оболочках половых путей, имеют эффекторный фенотип памяти, коэкспрессируют интегрины  $\alpha 4\beta 7/\alpha 4\beta 1$  (рецепторы хоуминга в кишечник) и несут высокий уровень CCR5, тогда как экспрессия CXCR4 недостаточна для продуктивной X4-инфекции [103, 104]. Дополнительное давление оказывает повышенная чувствительность X4-вариантов к интерферон-индуцированным факторам рестрикции семейства IFITM, к которым R5-трансмиссивные квазивиды проявляют устойчивость [105].

По мере прогрессирования заболевания, у значительной части пациентов (до 50% при субтипе В) происходит сдвиг в использовании корецептора, и в вирусной популяции начинают доминировать X4 или штаммы с двойной тропностью. Присутствие любых штаммов, использующих CXCR4 (X4; R5/X4) ассоциируется с ускоренным снижением числа CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и быстрым прогрессированием до СПИДа [10, 106].

Механизмы, лежащие в основе переключения тропности с R5 на X4, сложны и включают как генетические изменения в гене *env* ВИЧ-1, так и селективное давление иммунной системы с изменением доступности клеток-мишеней. На молекулярном уровне одиночная замена отрицательно заряженного остатка на положительно заряженный в позиции 25 петли V3

нарушает мостик, стабилизирующий R5-конформацию  $\beta$ -шпильки, и запускает её перестройку в состояние большего сродства к CXCR4 [95]. Поскольку такие мутации часто резко снижают инфекционность вируса, для их закрепления необходимы компенсаторные замены в петлях V1/V2, что объясняет отсроченное появление X4-вариантов в ходе инфекции [107, 108]. Одним из драйверов переключения служит гуморальный иммунный ответ: X4-вирусы менее чувствительны к нейтрализации аутологичной плазмой, а пассирование R5-штаммов в присутствии сывороточных антител приводит к селекции вариантов с X4 тропностью [109]. Проспективное наблюдение за пациентами в острой стадии ВИЧ-инфекции подтвердило, что переключение корцептора является механизмом иммунного ускользания: X4-варианты возникали *de novo* из трансмиссивных изолятов, а мутации, обеспечивающие смену тропности, одновременно обеспечивали устойчивость к нейтрализации антителами, что смещало выбор тропности в сторону центральных клеток памяти и наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые экспрессируют больше молекул CXCR4 [110].

Дополнительным механизмом, способствующим появлению X4 штаммов, является рекомбинация. При анализе 253 клонированных последовательностей участков V1-V3, полученных от четырёх пациентов во временной динамике, было показано, что около 9% клонов из X4-тропных изолятов возникли в результате рекомбинации между R5- и X4-квасивидами, причём большинство (73%) рекомбинантов сами имели X4 тропность. Во всех случаях тропность рекомбинанта определялась фрагментом, включающим V3, что подчёркивает, что обмен V3 между ко-циркулирующими вариантами может быть эффективным путём расширения клеточного тропизма без необходимости поэтапного накопления мутаций [111].

Таким образом, эволюционный переход от R5 к X4 представляет собой не случайную потерю тропности, а адаптивный ответ вируса на давление нейтрализующих антител, сопряжённый со снижением пула доступных

циркулирующих Т-клеток с рецептором CCR5 и необходимостью расширения спектра клеток-мишеней до Т-клеток памяти и наивных Т-клеток с экспрессией CXCR4.

С появлением антагонистов CCR5, в частности маравирока, определение тропности ВИЧ-1 стало рекомендованной процедурой, которая должна предшествовать назначению ингибиторов слияния gp120 ВИЧ и CCR5. Согласно инструкции к маравироку, препарат показан исключительно для лечения пациентов, пораженных R5 штаммом ВИЧ и не рекомендован к применению при выявлении у пациента X4 или вируса двойной тропности. Аналогичные требования закреплены в клинических рекомендациях по лечению и профилактике ВИЧ-инфекции в США, где подчёркивается необходимость проведения теста на тропность до назначения маравирока [11]. Данная мера предосторожности обусловлена тем, что под селективным давлением маравирока преобладающие X4 минорные квазивиды ВИЧ, не детектируемые при недостаточно чувствительном скрининге, способны быстро стать доминирующей популяцией и привести к вирусологической неудаче.

Информация о тропизме ВИЧ-1 является не только фармацевтическим, но и прогностическим маркером. Исследования фенотипа синцитиеобразующих (SI) и несинцитиеобразующих (NSI) штаммов ВИЧ-1 установили связь между появлением синцитий-индуцирующих X4 вариантов и неблагоприятным течением заболевания [112]. Например, лонгитюдное исследование 67 пациентов показало, что X4-варианты выявляются у 52% мужчин как минимум однократно за период наблюдения, причём их детекция значимо чаще ассоциирована с переходом ВИЧ-инфекции в стадию СПИДа в течение  $\leq 11$  лет после сероконверсии; появление X4 предшествовало переломной точке в снижении CD3+ Т-клеток в среднем на 0,83 года, а медианный уровень CD4+ Т-лимфоцитов при первом обнаружении X4 составлял 475 кл/мкл, что свидетельствует о возникновении этих вариантов

задолго до выраженного иммунодефицита [113]. В другом исследовании, проведенном на 314 наивных пациентах с медианным исходным уровнем CD4+ Т-клеток в 630 клеток/мкл влияние двойной тропности на темп прогрессирования заболевания было сопоставимо с повышением вирусной нагрузки на  $1 \log_{10}$  копий/мл и превышало эффект от снижения CD4+ Т-клеток на 50 клеток/мкл [114]. Другое доказательство ассоциации X4 тропности и ускоренной прогрессии заболевания было показано при обследовании пяти пациентов с медленной прогрессией заболевания: скорость снижения CD4+ Т-клеток и нарастания вирусной нагрузки значимо ускорялись непосредственно после возникновения X4-вариантов, которые, по данным филогенетического анализа, возникали *de novo* из CCR5-тропных предшественников [115]. Расширенное понимание процесса дает другое исследование в котором показано, что у пациентов с X4-вариантами снижение числа CD4+ Т-лимфоцитов происходило за счёт усиленной потери наивных и CD27+ Т-клеток памяти [116]. Более крупномасштабный анализ 1221 пациента с ВИЧ-1 субтипа В подтвердил, что риск наступления продвинутой стадии заболевания ( $CD4 \leq 200$  кл/мм<sup>3</sup>) значимо выше при переходе вируса на X4 тропность в отсутствие лечения [117].

Фенотипические методы, основанные на получении рекомбинантных вирусов, кодирующих полноразмерный или укороченный белок Env ВИЧ, и оценке их способности инфицировать клеточные линии, экспрессирующие CD4 и CCR5 либо CXCR4 (например, U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4), долгое время считались единственным надёжным инструментом определения тропности. Появление коммерческого теста Trofile (Monogram Biosciences), а затем его усовершенствованной версии Enhanced Sensitivity Trofile Assay (ESTA), позволило добиться беспрецедентной чувствительности: ESTA способен детектировать CXCR4-тропные варианты при их содержании всего 0,3% в смешанной популяции [118, 119]. Именно ESTA использовался в качестве референсного метода в ключевых клинических испытаниях

маравирока и ценикривирока (Study 202). Тем не менее, высокая стоимость, длительное время выполнения, потребность в специализированных лабораториях и невозможность получения результата при вирусной нагрузке ниже 1000 копий/мл ограничивают рутинное использование фенотипических тестов в широкой клинической практике [120].

Генотипическое тестирование тропности основано на секвенировании области V3 гена *env* ВИЧ и последующем биоинформатическом предсказании фенотипа с помощью специализированных алгоритмов (Geno2Pheno[coreceptor], WebPSSM, правило 11/25 и др.). Данный подход обладает рядом преимуществ: он быстрее, дешевле, доступен в условиях стандартных ПЦР-лабораторий и позволяет получать результат даже при низкой вирусной нагрузке. Основной проблемой генотипических методов является их пониженная чувствительность в детекции минорных X4-тропных вариантов при рутинном секвенировании по Сэнгеру или секвенировании нового поколения с небольшим количеством прочтений на библиотеку.

Во время клинического испытания ценикривирока применение алгоритма Geno2Pheno с порогом FPR 5,75% при трипlicateтном секвенировании (три независимых ПЦР и три независимых секвенирования каждого продукта) показало конкордантность с ESTA на уровне 84% [121]. Добавление более глубокого секвенирования для образцов, классифицированных как R5 на этапе трипlicateтов позволило дополнительно выявить X4 варианты у 27 пациентов. При этом конкордантность UDS с ESTA также составила 84%. Важно отметить, что включение в алгоритм матрицы PSSM, напротив, снижало специфичность, и авторы рекомендовали ограничиться Geno2Pheno.

Ключевым ограничением генотипического подхода остаётся его зависимость от субтипа вируса. Большинство алгоритмов, включая Geno2Pheno, обучались на последовательностях субтипа В. Масштабное

сравнительное исследование с применением фенотипического рекомбинантного вирусного анализа (RVA) и референсного теста Trofile показало, что для субтипа В конкордантность Geno2Pheno (FPR 10%) с фенотипом достигает 94,4%, тогда как для не-В субтипов она падает до 82,1% [122]. Наибольшее число расхождений зафиксировано для циркулирующих рекомбинантных форм CRF01\_AE (дискордантность 35,9%) и CRF02\_AG (20,7%), где Geno2Pheno систематически завышал долю последовательностей с Х4 тропностью. Для сервиса генотипического предсказания тропности WebPSSM аналогичная проблема наблюдалась в отношении субтипа А1 (40% расхождений). Другое исследование вносит противоречие в эти результаты, поскольку показывает что для субтипа С точность генотипического прогноза сопоставима с таковой для субтипа В [123]. Результаты анализа 405 изолятов субтипа С с известным фенотипом показали, что максимальная точность достигается при использовании Geno2Pheno с порогом FPR 5% (чувствительность 89%, специфичность 99%, общая точность 94%). Авторы заключили, что для субтипа С генотипическое тестирование тропности может применяться в клинике с высокой степенью надёжности.

Стоит отметить, что для разработки и валидации моделей или сервисов для генотипического предсказания тропности используются нуклеотидные последовательности изолятов, тропность которых определена экспериментально *in vitro*. Однако, для суб-субтипа А6 и CRF63\_02А6 такие последовательности практически отсутствуют. Ввиду этого до сих пор не было известно, насколько эффективны и точны существующие подходы для генотипического предсказания тропности генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России. Этот вопрос особенно актуален для CRF63\_02А6, поскольку известно, что большая часть существующих моделей генотипического предсказания тропности ВИЧ-1 хуже справляется с некоторыми CRF в сравнении с чистыми субтипами [122, 124, 125].

## 1.7 Омиксные технологии в исследовании ВИЧ-инфекции

Внедрение омиксных технологий (геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики и метагеномики) ознаменовало переход научных исследований на принципиально новый уровень, позволив перейти от анализа отдельных молекул к комплексной характеристике целых биологических систем. В контексте ВИЧ-инфекции омиксные подходы начали активно применяться в рамках полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) [126], направленных на поиск генетических детерминант восприимчивости к инфекции и темпов прогрессирования заболевания. Современные омиксные стратегии, основанные на технологиях высокопроизводительного секвенирования и методов исследования биополимеров (белков), охватывают значительно более широкий спектр задач: от изучения транскриптомных ответов инфицированных клеток [127] до протеомного [128] и метаболомного профилирования [129], а также полномасштабной характеристики микробиома и вирома различных анатомических компартментов (кровь, кишечник и т.д.) [130, 131].

Метагеномные подходы, включая shotgun-секвенирование и вирусное метагеномное обогащение, расширили представления о составе и динамике вирусных и бактериальных сообществ у людей, живущих с ВИЧ. Эти методы позволили не только идентифицировать латентные и оппортунистические инфекции, но и охарактеризовать состав комменсального вирома. Так, сравнительные исследования плазменного вирома у мужчин, практикующих секс с мужчинами (MSM), с ВИЧ-1 и без него продемонстрировали, что при ВИЧ-инфекции, особенно на стадии СПИДа ( $CD4^+$  Т-клетки  $<200$  кл/мкл), значительно возрастает обилие анелловирусов (Anelloviridae), а их уровень положительно коррелирует с вирусной нагрузкой ВИЧ-1 и отрицательно с числом  $CD4^+$  Т-клеток и соотношением  $CD4/CD8$  [132]. Схожий подход применялся для исследования вирома потребителей инъекционных наркотиков с коинфекцией ВИЧ-1, ВГС и/или ВГВ, где метагеномное

секвенирование выявило беспрецедентное генетическое разнообразие анелловиров - более 4400 последовательностей, из которых 36% имели менее 69% идентичности с известными изолятами [133]. В другом лонгитюдном исследовании, включавшем лица с ранней ВИЧ-инфекцией, было показано, что краткосрочная (12-месячная) АРТ не нормализует нарушения цитокинового профиля и не устраняет экспансию анелловиров, хотя и снижает их разнообразие; напротив, на фоне терапии возростала частота и обилие Human pegivirus type 1 (HPgV-1), что указывает на сложные взаимодействия представителей комменсального вирома между собой и с иммунной системой хозяина [134].

Метагеномный анализ бактериального компонента кишечной микробиоты также выявил характерные сдвиги, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией. В кросс-секционных и продольных исследованиях, включавших пациентов с тяжелым иммунодефицитом (количество CD4+ Т-клеток <200 клеток/мкл), наблюдалось снижение альфа-разнообразия, уменьшение доли типов бактерий *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты (*Roseburia*, *Faecalibacterium*), и увеличение представителей типа *Proteobacteria*, ассоциированных с провоспалительным цитокиновым профилем (*Enterococcus*, *Streptococcus*) [135].

В другом исследовании, которое посвящено использованию метагеномного подхода для исследования бактериома и вирома половых путей ВИЧ-положительных женщин, длительно получающих АРТ, было показано, что нестабильность бактериома ассоциирована с эпизодами роста вирусной нагрузки ВИЧ, тогда как состав вирома изменялся вместе с длительностью терапии и восстановлением CD4+ Т-клеток и меньше зависел от недолговременных скачков вирусной нагрузки. Кроме того, оказалось, что вирусная нагрузка анелловиров имела отрицательную корреляцию с числом

CD4+ Т-клеток, а их снижение на фоне АРТ было интерпретировано как положительный сигнал восстановления иммунных функций организма [136].

Методы количественной протеомики также внесли существенный вклад в понимание патогенеза ВИЧ-инфекции. Исследования охватывают широкий спектр биологического материала: периферическая кровь, плазма крови, клеточные культуры (первичные и иммортализованные). Протеомный анализ позволяет количественно оценить динамику сотен и тысяч белков хозяина, выявляя биомаркеры, ассоциированные с прогрессированием болезни, ответа на АРТ и фундаментальные механизмы взаимодействия регуляторных белков ВИЧ (Tat, Nef, Vif) с белками клетки-хозяина [137, 138].

Особую ценность представляет изучение самых ранних этапов инфекции - анализ 1293 белков плазмы у пациентов из Африки к югу от Сахары, охвативший период в острой и хронической стадиях ВИЧ-инфекции, выявил шесть четких профилей и показал, что снижение уровней ZYX и SCGB1A1 и повышение LILRA3 ассоциированы с повышенным риском гриппоподобных симптомов во время острой стадии ВИЧ-инфекции, тогда как изменения концентраций NAPA, RAN и ITIN4 имели отрицательную корреляцию с вирусной нагрузкой ВИЧ, а повышение HPN, PRKCB и ITGB3 с более быстрым снижением числа CD4+ Т-клеток [139].

В период хронической стадии ВИЧ-инфекции протеомика выявляет стойкие изменения, сохраняющиеся даже при эффективной АРТ. Сравнение парных образцов плазмы до и после начала терапии показало, что успешное подавление вирусной нагрузки сопровождается повышением синтеза белков цитоскелета и снижением участников сигнального пути IL-15 [140]. Тем не менее, у значительной части пациентов наблюдается неполное иммунное восстановление. Исследование 92 воспалительных белков у иммунологических неответчиков (INR) и ответчиков (IR) выявило аномально высокие уровни цитокинов и хемокинов (CXCL9, CXCL10, CXCL11, TNF,

IL18), которые тесно коррелировали с активацией, истощением и нарушением дифференцировки Т-клеток [141].

Протеомные технологии также внесли решающий вклад в понимание того, как ВИЧ-1 может регулировать клеточные процессы хозяина. Ключевой находкой стало открытие того, что вспомогательный белок Vif вызывает убиквитинирование и протеасомную деградацию всех членов семейства B56 регуляторных субъединиц фосфатазы PP2A [137]. Последующий количественный фосфопротеомный анализ показал, что это приводит к гиперактивации киназ Aurora A и B, а также к ремоделированию более 200 фосфорилированных сайтов клеточных белков. Глобальное профилирование посттрансляционных модификаций в ВИЧ-1-инфицированных клетках Jurkat подтвердило и расширило эти данные, продемонстрировав, что активность киназ Aurora критически важна для продуктивной инфекции в первичных CD4+ Т-клетках и макрофагах [138]. В этом же исследовании было показано, как Vpr ингибирует убиквитинирование гистона H1, что ведет к нарушениям репарации ДНК.

Наконец, сравнительные протеомные исследования помогают разграничить патогенез различных типов ВИЧ и определить факторы контроля вирусной инфекции. Количественный анализ плазмы крови выявил 100 дифференциально экспрессируемых белков между пациентами с ВИЧ-1, ВИЧ-2 и элитными контроллерами ВИЧ-1, при этом белки XRCC5 и PSME1 оказались вовлечены в ранние этапы жизненного цикла вируса [142]. В отдельном исследовании профили протеома у быстрых и медленных прогрессоров с ВИЧ-1 и ВИЧ-2 показали, что утечка белков из сигмовидной кишки и селезенки связана с темпом снижения CD4+ Т-клеток [143].

Метаболомика, представляющая собой комплексный анализ низкомолекулярных метаболитов в биологических объектах, является перспективным инструментом для изучения патогенеза ВИЧ, позволяя

получить интегральную картину биохимических изменений в организме хозяина в ответ на вирусную инфекцию. Исследования с применением ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрии продемонстрировали, что воздействие и инфицирование ВИЧ-1 приводит к формированию специфических метаболических профилей, которые различаются у лиц с естественной резистентностью к инфекции (HESN), ВИЧ-контроллеров и ВИЧ-положительных лиц с классическим развитием заболевания [144]. В частности, у прогрессоров выявлены изменения, связанные с высокими энерготратами (креатинин), нарушениями настроения (тирозин) и иммунной активацией (липопротеины), в то время как у элитных контроллеров метаболический профиль характеризовался модуляцией воспаления (глутамат, пируват) и улучшенным адаптивным иммунным ответом (ацетат). У HESN-индивидуумов был обнаружен протективный профиль, включающий метаболиты с противовоспалительным и лизирующим (по отношению к вирусным частицам) действием, такие как лактат и фосфохолин.

Особый интерес представляют данные о метаболических сдвигах во время острой стадии инфекции. В одном из исследований был проведен мультиомиксный анализ образцов стула, оральных смывов и плазмы мужчин из группы MSM, у которых в течение последующих шести месяцев произошло инфицирование ВИЧ-1 (группа Pre-HIV). Сравнение с теми, кто остался ВИЧ-негативным, показало, что еще до заражения в группе Pre-HIV наблюдалось обогащение ферментов метаболизма пуринов и цикла трикарбоновых кислот, снижение метаболизма аминокислот, а также признаки повышенного оксидативного стресса, такие как снижение активности супероксиддисмутазы и пероксидаз. Кроме того, в плазме крови этих лиц были повышены концентрации метаболитов с иммуномодулирующими свойствами, включая производные витамина А, что может увеличивать восприимчивость

мукозальных CD4<sup>+</sup> Т-клеток к инфекции, и эйкозаноиды, указывающие на более высокий уровень воспаления [145].

Внедрение технологий высокопроизводительного секвенирования расширило возможности молекулярной вирусологии, позволив исследовать транскриптом - совокупность всех молекул РНК образца. RNAseq обеспечивает непредвзятое выявление неаннотированных транскриптов, включая длинные некодирующие РНК, микроРНК, мРНК. Применение bulk RNA-seq на иммортализованных клеточных культурах и первичных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах продемонстрировало, что в первые часы после инфицирования *in vitro* происходит подавление генов, связанных с активацией Т-клеток, и запускается каскад изменений, затрагивающих процессинг, сплайсинг и транспорт РНК [146, 147]. Вирусный белок Nef вносит самостоятельный вклад в раннее ремоделирование транскриптома, индуцируя эффекты генов интерферонового ответа (ISG20, EGR1), JAK/STAT-сигналинга (IL-15) и апоптоза [148]. Мета-анализ нескольких исследований на инфицированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках подтвердил воспроизводимую дифференциальную экспрессию 208 генов, преимущественно вовлечённых в иммунный ответ, клеточную адгезию и сигнальные пути Wnt и Notch [149].

Анализ транскриптома уже клинических образцов клеток периферической крови выявил специфические паттерны экспрессии, ассоциированные с различными сценариями течения ВИЧ-инфекции. Во время острой стадии ВИЧ-инфекции изменяется регуляция и экспрессия 12,8% генома, при этом наиболее значительно активируются гены клеточного цикла, репарации ДНК и интерферон-стимулированные гены; параллельно происходит подавление антиапоптотических факторов BCL2 при индукции проапоптотических генов, что согласуется с массивной гибелью клеток [150]. У пациентов-непрогрессоров транскриптомный профиль характеризуется иначе, а именно снижением экспрессии генов иммунной активации и интерферонового ответа при повышении сигнального пути TGF- $\beta$ , а в группе

элитных контроллеров дополнительно выявляется активация генов CDKN1A, TNF, IER3 и GADD45B, регулирующих транскрипцию вируса, и ремоделирование кальций-зависимых сигнальных каскадов [151, 152]. Сравнение транскриптомов до и после АРТ демонстрирует, что, несмотря на вирусную супрессию и значительное снижение экспрессии интерферон-стимулированных генов, полной нормализации транскриптомного профиля ВИЧ-положительных лиц относительно условно-здоровой когорты исследования не происходит: ряд провоспалительных сигнальных путей, а также гены-регуляторы внеклеточного матрикса сохраняют отличительный и несбалансированный профиль экспрессии [8, 153]. У иммунологических неответчиков терапии, не восстанавливающих уровень CD4+ Т-клеток даже при подавленной вирусной нагрузке ВИЧ, сохраняется повышенная экспрессия IRF7/IFN- $\alpha$  и вирусной мРНК интегразы вместе с усиленной пролиферацией и апоптозом Т-лимфоцитов [154].

Технология RNA-seq также внесла существенный вклад в изучение ВИЧ-резервуара. Комбинация проточной цитометрии и флуоресцентной гибридизации *in situ* позволила разделить клетки, содержащие abortивные (TAR+) и элонгированные (TAR+Gag+) транскрипты ВИЧ, и провести их сравнительное транскриптомное профилирование. Исследование показало, что клетки с abortивной транскрипцией характеризуются пониженной экспрессией митохондриальных генов комплексов I и V дыхательной цепи, а фармакологическая стимуляция митохондриальной функции антиоксидантами приводила к реактивации вирусной транскрипции, указывая на ключевую роль метаболического состояния клетки в поддержании латентности провирусной ДНК [155].

Логичным развитием и усовершенствованием транскриптомного подхода стала транскриптомика единичных клеток (single cell RNA sequencing; scRNAseq). В последние годы появление scRNAseq позволило исследовать иммунный ответ хозяина на уровне отдельных клеток. Уже существует

несколько работ, посвященных исследованию транскриптомного профиля мононуклеаров периферической крови ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии инфекции с применением различных протоколов (Seq-Well, капельной микрофлюидики с контроллером Chromium 10xGenomics) [5, 156]. Эти исследования выявили мощную активацию интерферон-индуцированных генов и антигенпредставляющей системы в лимфоцитах, экспансию цитотоксических и других субпопуляций клеток (NK, CD8+ Т-клетки и др.), а также позволили непосредственно детектировать редкие клетки, в которых присутствовала РНК ВИЧ. В частности, Kazer и соавт. продемонстрировали специализированные «модули ответа», которые включали гены интерферон-стимулируемых генов, маркеров пролиферации NK-клеток, провоспалительные Т-клеточные сигналы и сигналы дифференцировки, а также гены, ассоциированные с продолжительной активацией NK-клеток и моноцитов. Аналогично, Lee и соавт. показали, что ВИЧ-инфицированные CD4+ Т-клетки на ранней стадии инфицирования усиленно экспрессируют гены HLA класса I и противовирусные гены (например, IFITM и BST2), которые ассоциированы с контролем виремии [156]. Отдельно стоит отметить выявление новых клеточных факторов, связанных с патогенезом ВИЧ-инфекции. Например, одна из работ выявила, что РТМА (протимозин- $\alpha$ ; ядерный регулятор ремоделирования хроматина, репарации ДНК, клеточной дифференцировки и пролиферации [157]) обратно коррелирует с вирусной нагрузкой ВИЧ-1, то есть РТМА, по-видимому, препятствует вирусной репликации [158].

В совокупности описанные работы показывают, что острая стадия ВИЧ-инфекции характеризуется серьезной перестройкой транскриптомного профиля: на ранних этапах отмечается интенсифицированный интерфероновый ответ, усиление активности цитотоксических популяций и активация, пролиферация и дифференцировка Т-клеток различных

субпопуляций, экспрессия генов антагонистов процессов апоптоза (CD127, BCL2).

Важно отметить, что в течение острой стадии ВИЧ-инфекции, вирусологические и молекулярно-генетические процессы могут существенно различаться в зависимости от генетического варианта ВИЧ-1. Большинство существующих на сегодняшний день данных получено при изучении эпидемиологически доминирующих в мире субтипов В и С. Генетические варианты, циркулирующие на территории России, в первую очередь суб-субтип А6 и рекомбинантная форма CRF63\_02А6, остаются значительно менее изученными. В частности, отсутствуют комплексные данные о провирусном ландшафте, иммунных процессах и активности клеток-мишеней. Существуют проблемы с генотипическим определением тропности российских изолятов, поскольку существующие методы ориентированы на зарубежные геноварианты ВИЧ-1.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Когорты исследования

В исследование были включены ВИЧ-положительные лица и здоровые доноры (подтверждено отсутствие антигенов и антител к ВИЧ) в возрасте от 20 до 50 лет. Все участники предоставили письменное информированное согласие на проведение цитологических и молекулярно-генетических исследований, а также на анализ и хранение полученных данных. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Краевая клиническая больница № 2» во Владивостоке (Выписка из протокола заседания № 31/1 от 10 января 2024 г.).

Критерии включения ВИЧ-позитивных пациентов в данное исследование были следующими: (I) документированный временной интервал инфицирования, не превышающий четырех недель на момент забора крови; (II) отрицательные или неопределенные результаты вестерн-блоттинга; (III) вирусная нагрузка  $\geq 1 \times 10^6$  копий РНК ВИЧ/мл плазмы крови; и (IV) предоставленная пациентом информация об этнической принадлежности, предполагаемом пути инфицирования и анамнезе, включая данные о вторичных заболеваниях. Биологический материал (цельная кровь) объемом 9-10 мл доставлялся в лабораторию не позднее чем через четыре часа после забора. В течение восьми часов после забора крови были выделены мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) и криоконсервированы в хранилище в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Для контрольных образцов в исследовании транскриптомного профиля единичных клеток крови были использованы данные транскриптома единичных клеток из уже проведенной работы, посвященной исследованию изменения хроматинового ландшафта в клетках периферической крови пациентов с тяжелой формой COVID-19, вызванной вариантом Дельта [159].

В частности, нами были использованы данные секвенирования МПК трех индивидуумов из контрольной когорты упомянутого исследования.

## **2.2 Выделение и криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови**

Мононуклеарные клетки периферической крови изолировали выделяли из цельной крови с использованием градиента плотности Ficoll-1077 (Dia M, Россия; кат. № Diacoll 1077) по протоколу 10x Genomics «Isolation of Leukocytes, Bone Marrow and Peripheral Blood Mononuclear Cells for Single Cell RNA Sequencing». Цельную кровь разводили 1:1 1× PBS (Gibco, США; кат. № 10010023), 10 мл разведённой крови наслаивали на 5 мл Ficoll-1077 в пробирке на 15 мл (Corning, США; кат. № 430053) и центрифугировали при 300 gcf в течение 30 мин (модификация исходного протокола). Белое кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, аккуратно собирали в новую пробирку.

После выделения клетки отмывали 10 мл среды RPMI-1640 (Gibco, США; кат. № 11875093) центрифугированием при 300 gcf в течение 10 мин. Подсчёт клеток проводили с помощью автоматического счётчика TC20 (Bio-Rad, США; кат. № 1450102). Второе отмывание выполняли в тех же условиях. После второго отмывания клетки ресуспендировали в фетальной бычьей сыворотке (FBS, Gibco, США; кат. № A5256701) до конечной концентрации  $6 \times 10^6$  клеток/мл. Аликвоты суспензии (по 1 мл) переносили в предварительно охлаждённые криопробирки (Corning, США; кат. № 431386), содержащие по 1 мл замораживающей среды (30% DMSO (Servicebio, Китай; кат. № G5051-100ML), 70% FBS). Криопробирки помещали в контейнер для заморозки CoolCell SV2 (Corning, США; кат. № BCS-172) и выдерживали при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч, после чего быстро (в течение 1-2 мин) переносили в жидкий азот ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) для длительного хранения (1-3 мес).

Размораживание клеток перед приготовлением библиотек для секвенирования транскриптома единичных клеток проводили по протоколу

10x Genomics «Fresh Frozen Human Peripheral Blood Mononuclear Cells for Single Cell RNA Sequencing». Криопробирки транспортировали в контейнере CoolCell SV2, оттаивали в водяной бане при 37 °С около 2 мин, клетки отмывали 1× PBS центрифугированием при 300 rcf в течение 5 мин и ресуспендировали в 200 мкл 1× PBS. Аликвоту 10 мкл смешивали с 10 мкл 0,4% трипанового синего (Abisense, Россия; кат. № DYE-01-4-100ML) и оценивали количество/жизнеспособность клеток на автоматическом счётчике TC20.

### **2.3 Выделение РНК и секвенирование полного генома ВИЧ-1**

Тотальную РНК выделяли из плазмы периферической крови методом колоночной экстракции с использованием набора «RNA Extraction Kit from Blood Plasma, diaGene» (diaGene, Москва, Россия; кат. № 3324.0250) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы РНК хранили при -80 °С.

Для получения последовательностей, охватывающих почти полный геном (near-full-length genome, NFLG) ВИЧ-1, применяли двухэтапную гнездовую ПЦР с использованием кастомных лабораторных праймеров. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли с помощью набора реагентов «BioMaster RT-PCR-Extra» (BioLabMix, Новосибирск, Россия; кат. № RM06-200). ПЦР проводили с применением набора для амплификации длинных фрагментов ДНК «BioMaster LR HS-PCR» (BioLabMix, Новосибирск, Россия; кат. № MH040-400). ПЦР-продукты визуализировали методом электрофореза в 0,75% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Полученные ПЦР-ампликоны очищали методом колоночной очистки с использованием набора Cleanup S-Cap (Evrogen, Москва, Россия; кат. № BC041L) по протоколу производителя. После очистки вирус-специфичные фрагменты секвенировали на платформе Illumina MiSeq (Illumina, Inc., США; кат. № SY-410-1003).

## **2.4 Генотипирование клинических изолятов ВИЧ-1**

Сборку вирусных геномов выполняли с использованием программных пакетов BWA v.0.7.17 [160] и iVar v.1.2.2 [161]. Полученные последовательности ВИЧ-1 выравняли относительно референсных последовательностей различных субтипов и рекомбинантных форм, представленных в международной базе данных GenBank, с применением программ MEGA11 [162] и AliView [163]. Множественное выравнение проводили с помощью MAFFT v.7.526 (RIMD) [164] со стандартными параметрами. Филогенетическое древо строили методом максимального правдоподобия на веб-сервере IQ-TREE v.2.4.0 с использованием 1000 бутстреп-реплик и модели нуклеотидных замен GTR + I + G; надежность топологии оценивали бутстреп-анализом [165]. Визуализацию филогенетического древа осуществляли с помощью инструментария Interactive Tree of Life [166].

Анализ на наличие рекомбинации проводили с применением веб-инструмента RIP 3.0 [167], доступного в базе данных Los Alamos National Laboratory (LANL; URL: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>; дата доступа: 1 декабря 2025 г.).

## **2.5 Изоляция клинических штаммов ВИЧ-1 и фенотипическое определение тропности**

Изоляцию штаммов ВИЧ-1 проводили согласно стандартной процедуре, включающей отмывку мононуклеарных клеток из цельной крови, помещённой в вакутейнеры с ЭДТА, в градиенте фикола. После изоляции МПК ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных доноров активировали в течение двух суток в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 5 мкг/мл фитогемагглютинаина-L (Merck, Германия; кат. № L2646). Затем проводили совместное культивирование мононуклеарных клеток ВИЧ-

положительных доноров с ПБМК ВИЧ-отрицательных доноров (не менее двух доноров) в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 0,001% PenStrep и 0,002% IL-2 (Dia M, Россия; кат. № PSG210-10). Совместное культивирование длилось 14 дней с мониторингом вирусного фитнеса путём измерения концентрации p24 методом ИФА в культуральной жидкости с помощью набора HIV-1 p24-antigen-EIA-BEST (VECTOR-BEST, Новосибирск, Россия; кат. № 0134). После изоляции штамма вирусосодержащую жидкость замораживали при -80 °С в течение 24 ч и далее переносили в жидкий азот (-196 °С) для долгосрочного хранения.

Фенотипическое определение тропности проводили с использованием клеточных культур U87.CD4.CCR5 (ARP-4035) и U87.CD4.CXCR4 (ARP-4036), полученных по программе AIDS Reagent (ныне BEI Resources). Вирусосодержащую жидкость добавляли в питательную среду для обеих линий клеток U87, содержащую DMEM (Servicebio, Китай; кат. № G4512-500ML), 15% FBS, 300 мкг/мл генетицина (Thermo Fisher Scientific, США; кат. № 10131027) и 1 мкг/мл пуромицина (Servicebio, Китай; кат. № G4017-1ML). Клетки проходили 6 пассажей с мониторингом вирусного фитнеса путём измерения концентрации p24 ВИЧ в культуральной жидкости методом ИФА (тот же набор). Штамм характеризовали как R5- или X4-тропный в зависимости от прироста концентрации p24 в культуральной жидкости с линиями U87.CD4.CCR5 или U87.CD4.CXCR4, соответственно. Если образец показывал прирост p24 на обеих культурах, его считали изолятом с двойной тропностью (R5/X4). Для генотипического анализа штаммы с чистой X4- и двойной тропностью объединяли в группу X4 (использующих CXCR4).

## **2.6 Формирование референсных наборов нуклеотидных последовательностей V3 gp120 ВИЧ-1 из LANL**

Последовательности для проверки существующих и построения собственных моделей для предсказания тропности были взяты из базы данных

нуклеотидных последовательностей ВИЧ LANL (URL: <https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>; дата доступа: 13.04.2026) с фильтрацией последовательностей V3 петли и экспериментально (фенотипически) подтвержденной тропностью с фильтрацией «CCR5 only» и «all CXCR4». Мы не разделяли штаммы с двойной тропностью и включали их в группу штаммов, использующих X4, по нескольким причинам: (I) предсказание трех видов тропности создает дополнительные сложности для генотипических предикторов и уменьшают их точность; (II) многие из существующих моделей (Geno2pheno [168]). PhenoSeq [169]) не разделяют X4 и R5/X4 тропность и определяют R5/X4 в группу изолятов с использованием X4; (III) предсказание трех видов тропности (R5, X4, R5/X4) не имеет преимуществ на практике в сравнении с предсказанием двух видов тропности (R5, X4), поскольку и при X4, и при R5/X4 тропности штамм ВИЧ-1 может использовать рецептор CXCR4 для проникновения в клетку. Это означает отсутствие возможности использования маравирока - наиболее распространенного ингибитора проникновения.

Для проверки существующих и построения собственных моделей генотипического предсказания тропности были выбраны наиболее распространенные генетические группы группы М ВИЧ-1 - субтипы А, В и С, а также рекомбинантные формы CRF01\_AE и CRF02\_AG. Последовательности фенотипированных штаммов суб-субтипа А6 (n=19) и CRF63\_02A6 (n=2) практически отсутствовали в LANL, но они использовались в данном исследовании.

Собранные последовательности имели разную длину и могли включать другие области генома ВИЧ-1 кроме области V3 gp120. Для унификации тестовой выборки все последовательности загружались в веб-инструмент GeneCutter

([https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GENE\\_CUTTER/cutter.html](https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GENE_CUTTER/cutter.html); дата доступа: 14.04.2026) для выравнивания и вырезания области V3 gp120. При

использовании GeneCutter применялись стандартные настройки. Другие области генома ВИЧ-1 не использовались для предсказания тропности. После получения последовательностей области V3 производилось удаление дубликатов (последовательностей со 100% гомологией), за исключением одной такой последовательности.

## 2.7 Генотипические методы предсказания тропности

Мы использовали несколько существующих моделей (Рисунок 13) для генотипического предсказания тропности последовательностей ВИЧ-1 из базы данных LANL и последовательностей наших лабораторных изолятов вируса. Некоторые модели представляли собой простые правила: правило 11/25, правило 11/25/5, правило 11/24/25, правило Net charge или их комбинации - правило Delobel и правило Garrido. Для использования простых моделей был написан кастомный код на языке программирования R v. 4.5.3 (R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; URL: <https://www.R-project.org/>, дата доступа: 14.04.2026) в среде разработки Rstudio v. 2026.01.2+418 (RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA; URL: <http://www.rstudio.com/>, дата доступа: 14.04.2026).

Принцип работы более сложных моделей строился на машинном обучении (ML), например, на алгоритмах Support Vector Machine (SVM) - PhenoSeq, HIVcoPRED; или на сочетании нескольких алгоритмов ML, например SVM и Decision Tree - Geno2pheno. Модель T-CUP 2.0 использовала структурное моделирование V3 петли с расчетом параметров электростатического потенциала и гидрофобности. Модель WebPSSM предсказывала тропность на основе позиционно-специфической матрицы (PSSM), которая представляла собой таблицу с весовыми коэффициентами для каждой аминокислоты в каждой позиции V3.

## 2.8 Создание признаков пространств для машинного обучения

Обучение собственных моделей ML на нескольких видах признаков, рассчитанных по нуклеотидным последовательностям V3 gp120 ВИЧ-1: простой аминокислотный состав (AAC), положение аминокислот в позициях 11 и 25 вместе с информацией о Net charge, Relative Synonymous Codon Usage (RSCU), псевдо-аминокислотный состав (PseAAC).

AAC получали путем трансляции нуклеотидных последовательностей V3 в программном обеспечении MEGA11 [162].

Net charge рассчитывался как разница между количеством положительно (лизин, аргинин) и отрицательно (аспартат, глутамат) заряженных аминокислот в пределах аминокислотной последовательности V3 по формуле (1):

$$NetCharge = (K + R) - (D + E)$$

Где K - количество аминокислотных остатков лизина;

R - количество аминокислотных остатков аргинина;

D - количество аминокислотных остатков аспартата;

E - количество аминокислотных остатков глутамата.

Расчет RSCU проводился с помощью языка программирования Python v. 3.12.0 (Python Software Foundation. Python Language Reference, version 3.12.0. Available at <http://www.python.org>, дата доступа: 14.04.2026) с использованием модуля CodonUsage из пакета Biopython v.1.87 [170] по формуле (2):

$$RSCU_{ij} = \frac{X_{ij}}{\frac{1}{n_j} \sum_{k=1}^{n_i} X_{ik}}$$

Где  $i$  - конкретная аминокислота в записи IUPAC;

$j$  - кодон синонимичной группы аминокислоты  $i$ ;

$X_{ij}$  - наблюдаемого количество  $j$ -ого кодона для  $i$  аминокислоты в анализируемой последовательности;

$n_i$  - степень вырожденности  $i$  аминокислоты (количество различных кодонов, кодирующих данную аминокислоту (от 1 до 6));

$k$  - индекс суммирования со значениями от 1 до  $n_i$ ;

$\sum_{k=1}^{n_i} X_{ik}$  - суммарное количество всех синонимичных кодонов, кодирующих  $i$  аминокислоту.

Расчет pseAAC так же проводился с помощью языка программирования Python v. 3.12.0 (Python Software Foundation. Python Language Reference, version 3.12.0. Available at <http://www.python.org>, дата доступа: 14.04.2026), но с использованием пакета rpro3 [171]. Определение pseAAC строится на вычислении AAC и псевдо-компонентов. Псевдо-компоненты ( $T_k$ ) рассчитываются по формуле (3):

$$T_k = \frac{1}{L - k} \sum_{i=1}^{L-k} J_{i,i+k}$$

Где  $L$  - длина последовательности;

$k$  - порядок корреляции (расстояние между аминокислотами вдоль цепи, для которых считается взаимосвязь);

$i$  - начальная аминокислотная позиция;

$i + k$  - индекс аминокислоты, стоящей от  $i$  на  $k$  шагов;

$J$  - функция сходства пары аминокислот (показывает насколько сильно различаются физико-химические свойства аминокислот в позициях  $i$  и  $i+k$ )

При этом для вычисления  $J$  используется отдельный шаг вычислений по формуле (4):

$$J_{i,j} = \frac{1}{3} \{ [H_1(R_j) - H_1(R_i)]^2 + [H_2(R_j) - H_2(R_i)]^2 + [M(R_j) - M(R_i)]^2 \}$$

Где  $i$  - первая аминокислота;

$k$  - расстояние между двумя сравниваемыми аминокислотами;

$i + k$  - индекс аминокислоты, стоящей от  $i$  на  $k$  шагов;

$R_i$  - аминокислотный остаток в позиции  $i$ ;

$H_1$  - гидрофобность по шкале 1 (шкала Tanford);

$H_2$  - гидрофобность по шкале 2 (шкала Jones);

$M$  - масса боковой цепи (измеряется в Да).

После вычисления значений псевдо-компонентов ( $T_k$ ) применяется финальная формула расчета PseAAC (5):

$$p_{20+u} = \frac{w \times T_u}{\sum_{i=1}^{20} f_i + w \sum_{k=1}^{\lambda} T_k}$$

Где  $u$  - индекс псевдокомпонента;

$p_{20+u}$  - псевдокомпонент аминокислотной последовательности (PseAAC);

$w$  - весовой коэффициент (константа  $w = 0.05$ );

$T_u$  - фактор корреляции порядка  $u$  ( $J$  из предыдущего шага, нормированная на длину последовательности ( $L$ ));

$f_i$  - частота  $i$  аминокислоты;

$\lambda$  - наибольшее расстояние, на котором вычисляется взаимосвязь физико-химических свойств ( $0 \leq \lambda < L$ ).

## 2.9 Создание собственных моделей машинного обучения

Для предсказания тропизма ВИЧ-1 на основе последовательностей V3-петли мы разработали несколько моделей машинного обучения, реализованных на языке Python v. 3.12 (Python Software Foundation. Python Language Reference, version 3.12.0. Available at <http://www.python.org>, дата доступа: 14.04.2026). Все вычисления проводились с использованием пакетов Biopython v. 1.87, pandas v.3.0.1, numpy v. 2.2.6, scikit-learn v. 1.8.0, imbalanced-learn v.0.14.1, tqdm v. 4.67.3, joblib v. 1.5.3 (URL: <https://joblib.readthedocs.io/en/stable/index.html>; дата доступа: 16.04.2026).

Исходные нуклеотидные последовательности V3-петли в FASTA-формате проходили предварительную обработку: из каждого файла извлекались все последовательности, после чего удалялись проблемные последовательности (неоднозначные нуклеотиды) и дубликаты (100% гомология) с сохранением только первого вхождения. Для моделей, использующих RSCU, высчитывались данные признаки, после чего проходило обучение и десятикратная кросс-валидация модели. При этом стоп-кодона исключались из анализа.

Для предсказания тропизма большинства генетических вариантов (субтипы A, B, C, CRF01\_AE и CRF02\_02G) использовался ансамблевый метод стекинга, объединяющий алгоритмы RandomForest и SVM с ядром Radial Basis Function (RBF). В качестве мета-классификатора выступала логистическая регрессия, обучавшаяся на выходных вероятностях базовых моделей. Для борьбы с дисбалансом классов в случайном лесе применялся андерсэмплинг мажоритарного класса (R5) на уровне каждого дерева, а в SVM использовался параметр `class_weight='balanced'`. Для субтипа CRF63\_02A6, который не имел достаточного количества последовательностей для обучения и кросс-валидации, была применена более простая стратегия: использование

последовательностей CRF02\_AG с алгоритмом RandomForest и Synthetic Minority Over-sampling Technique (SMOTE; k=5).

Для оценки качества всех построенных моделей использовалась 10-ти кратная стратифицированная кросс-валидация. Исходные данные случайным образом разделялись на 10 непересекающихся подвыборок; на каждой итерации одна подвыборка служила тестовым набором, а остальные девять — обучающим. После десяти повторений итоговые метрики рассчитывались как средние значения по всем десяти фолдам (выборкам).

После завершения кросс-валидации для каждой модели вычислялись следующие метрики качества: истинно положительные (X4, предсказанный как X4), ложноотрицательные (X4, предсказанный как R5), истинно отрицательные (R5, предсказанный как R5) и ложноположительные (R5, предсказанный как X4). На их основе рассчитывались чувствительность (доля правильно предсказанных X4), специфичность (доля правильно предсказанных R5), общая точность (доля всех правильных предсказаний) и коэффициент корреляции Мэтьюса (MCC) [172] по следующим формулам (6, 7, 8, 9) [173] соответственно:

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$Specificity = \frac{TN}{FP + TN}$$

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN}$$

$$MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

Где  $TP$  - истинно-положительные предсказания;

$FN$  - ложноотрицательные предсказания;

*TN* - истинно-отрицательные предсказания;

*FP* - ложноположительные предсказания.

Дополнительно оценивался коэффициент корреляции Мэтьюса (MCC) площадь под ROC-кривой (AUC), и каппа Коэна. Все метрики усреднялись по 10 фолдам с указанием стандартного отклонения. Для каждой обученной модели сохранялся файл в формате pickle, а также экспортировались таблицы с метриками и предсказаниями для всех образцов.

## **2.10 Графический пользовательский интерфейс HIV-V3Augur**

HIV-V3Augur реализован на Python 3.12 и распространяется как автономное приложение для Windows с графическим пользовательским интерфейсом (GUI), созданное с использованием библиотеки Tkinter v. 8.5. Синтаксический анализ, трансляция и попарные выравнивания последовательностей выполняются с помощью Biopython v.1.87. Обработка данных и вывод моделей опираются на numpy v. 2.2.6, scipy v. 1.17.1 и scikit-learn v. 1.8.0. Предварительно обученные субтип-специфичные модели тропизма сохраняются в виде pickle-объектов (.pkl) и загружаются во время работы программы.

Входные последовательности представляются в формате нуклеотидного multi-FASTA. Для каждой последовательности область V3 локализуется путём локального попарного выравнивания запрашиваемой нуклеотидной последовательности с предоставленной пользователем нуклеотидной референсной последовательностью V3. Выделенный нуклеотидный фрагмент V3 затем транслируется в аминокислоты. Последовательности, выделенная область V3 которых содержит неоднозначные или отличные от ATGC нуклеотиды, исключаются; причина исключения сообщается пользователю.

Генотипирование проводится на основе транслированной аминокислотной последовательности V3. Каждая запрашиваемая

аминокислотная последовательность V3 сравнивается с курируемыми референсными наборами аминокислотных последовательностей V3 для каждого субтипа с использованием глобального попарного выравнивания, после чего присваивается субтип с наивысшим сходством. Если несколько субтипов укладываются в заданный предел сходства, результат сообщается как неоднозначный с указанием нескольких вариантов; в графическом интерфейсе пользователь может вручную изменить назначенный субтип.

Тропизм предсказывается как бинарный результат (R5 против X4) с помощью предварительно обученных субтип-специфичных моделей машинного обучения (.pkl). При неоднозначном генотипе предсказания выполняются с использованием моделей всех возможных субтипов. На выходе программа предоставляет предсказанный класс и соответствующие вероятности.

## 2.11 Статистический анализ

Статистический анализ выполнялся в R v. 4.4.2 (R Core Team (2024)). Эффективность существующих моделей оценивалась для задачи бинарной классификации вирусного тропизма (R5 против X4) по субтипам. Точность определяли как долю правильных классификаций. Чувствительность и специфичность рассчитывали, принимая X4 за положительный класс: чувствительность =  $P(\hat{Y} = X4 | Y = X4)$ , специфичность =  $P(\hat{Y} = R5 | Y = R5)$ .

Для сравнения моделей с учётом парной структуры данных были подобраны обобщённые линейные смешанные модели (GLMM) с биномиальным распределением и логит-связью с помощью функции `lme4::glmer`. Структура фиксированных эффектов включала модель, субтип и их взаимодействие; для каждой последовательности внутри субтипа был добавлен случайный свободный член. Отдельные GLMM подбирали для (I) точности, используя все последовательности с бинарным исходом «правильно vs неправильно», (II) чувствительности, ограничивая набор данных

истинными X4-последовательностями и моделируя «предсказан X4 vs не предсказан», и (III) специфичности, ограничивая набор данных истинными R5-последовательностями и моделируя «предсказан R5 vs не предсказан».

Поскольку некоторые комбинации модель/субтип были малочисленны и демонстрировали нулевые ячейки (например, отсутствие ложноположительных результатов), GLMM подбирали с вычислительно эффективной аппроксимацией ( $nAGQ = 0$ ), чтобы обеспечить стабильную сходимость. Оценки предельных средних вероятностей и 95% доверительные интервалы были получены на шкале отклика с помощью пакета `emmeans`. Общие сводки рассчитывали с равными весами субтипов, так что каждый субтип вносил одинаковый вклад независимо от размера выборки. Для оценки устойчивости к дисбалансу классов и отражения ситуации, в которой R5 и X4 предполагаются равнопредставленными, мы дополнительно повторили анализ точности с балансировкой классов (равный общий вес для истинных R5 и истинных X4 случаев внутри каждого субтипа); чувствительность и специфичность не перевешивали, поскольку они оценивались условно в подмножествах истинных X4 и истинных R5 соответственно (при предположении, что классы X4 и R5 равны.)

Парные сравнения представлены как разницы вероятностей предсказаний ( $\Delta prob$ , процентные пункты) относительно (i) наилучшей модели в соответствующем контексте и (ii) исследуемой модели (HIV-V3Augur). P-значения скорректированы на множественные сравнения методом Холма; скорректированное  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. В некоторых сравнениях  $\Delta prob$  не приводили (обозначено как «не поддаётся оценке» в таблицах), поскольку разреженные страты субтипов и нулевые ячейки (например, отсутствие ложноположительных результатов) приводили к численно неустойчивым контрастам на основе моделей.

## **2.12 Подготовка и секвенирования библиотек транскриптома единичных клеток крови**

Суспензию единичных клеток генерировали с помощью контроллера Chromium Controller (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № PN 120270) с чипом из набора Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № PN-1000127) и гелевыми шариками из набора Next GEM Single Cell 3' v3.1 Gel Beads kit (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № 1000128). Обратную транскрипцию, амплификацию кДНК и очистку выполняли с помощью набора Next GEM Single Cell 3' GEM Kit v3.1 (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № PN-1000128). Для элюции при очистке кДНК на магнитных частицах использовали буфер EB (Qiagen, Хильден, Германия; кат. № 19086), а для промывки - свежеприготовленный 80% этанол. Амплификацию кДНК проводили в течение 12 циклов, как рекомендовано протоколом производителя с учётом предполагаемого количества клеток.

Перед подготовкой библиотек оценивали качество кДНК. Распределение длин фрагментов анализировали на системе TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США; кат. № G2991BA) с использованием High Sensitivity D5000 ScreenTapes (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США; кат. № 5067-5592), а концентрацию кДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; кат. № Q33216) и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; кат. № Q32854).

Библиотеки готовили с использованием набора Library Construction Kit (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № PN-1000689) и Next GEM Single Cell 3' GEM Kit v3.1 (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № PN-1000269), а индексирование образцов выполняли с помощью набора Dual Index Kit TT Set A (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США;

кат. № PN-1000215). Индексную ПЦР проводили в течение 12 циклов при входной концентрации кДНК от 4 до 25 нг/мкл.

Окончательный контроль качества библиотек осуществляли на системе TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США; кат. № G2991BA) с High Sensitivity D5000 ScreenTapes и флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; кат. № Q33216) с набором Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; кат. № Q32854).

Секвенирование проводили на приборе NextSeq 550 (Illumina, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США; кат. № SY-415-1002) с использованием набора NextSeq 550 High-Output Kit (Illumina, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США; кат. № 20024908) (300 циклов) для парно-концевого секвенирования (2 × 150 п.н.).

Все этапы подготовки кДНК и библиотек выполняли в соответствии с протоколами производителя.

### **2.13 Предобработка и аннотация данных секвенирования РНК единичных клеток крови**

Необработанные данные секвенирования обрабатывали с помощью программного обеспечения CellRanger v. 8.0.1 для выравнивания и генерации матриц экспрессии генов на клетку. Контроль качества и последующий анализ выполняли в пакете Seurat v5.2.0 [174] для среды программирования R. Дублиеты идентифицировали и удаляли с помощью scDblFinder v. 1.14.0 с ожидаемой долей дублиетов 0,8% на 1000 клеток [175]. Клетки, в которых детектировалось менее 200 генов или менее 600 UMI, исключали. Для образцов от лиц с ВИЧ-инфекцией удаляли клетки, в которых доля митохондриальных генов превышала 17,5%. Эти критерии исключения (фильтрации) клеток были выбраны на основе сходных критериев для клеток

человека в контрольной когорте исследования. Данные scRNAseq для контрольной когорты исследования были взяты из открытого источника другого исследования [159].

Контроль качества секвенирования включал оценку ключевых метрик, генерируемых Cell Ranger v.8.0.1 в ходе выполнения конвейера cellranger count и представленных в отчёте web\_summary.html. В число этих метрик входили: количество прочтений на клетку, количество детектированных генов на клетку, валидные штрихкоды и UMI, количество UMI на клетку, насыщение секвенирования, показатели Q30 для РНК-прочтений и показатели Q30 для UMI-прочтений. Данные секвенирования соответствовали всем стандартным метрикам контроля качества для секвенирования транскриптома единичных МПК. В частности, медианная глубина секвенирования превышала 40 000 прочтений на клетку, при детекции около 2000 генов и >2500 UMI на клетку.

Нормализацию и стабилизацию дисперсии проводили с помощью SCTransform v2. Анализ главных компонент (PCA) выполняли на объекте SCT-анализа, используя 50 компонент. Коррекцию батч-эффектов и интеграцию наборов данных проводили с помощью Harmony (1.2.3), используя идентификатор образца в качестве батч-переменной (group.by.vars = «sample»). Harmony запускали на 20 итераций, и первые 30 скорректированных Harmony главных компонент использовали для последующих анализов.

Harmony-скорректированные вложения использовали для построения графа общих ближайших соседей с последующей кластеризацией методом Лувена (разрешение = 0,8) и визуализацией с помощью равномерной аппроксимации и проекции многообразия (UMAP). Качество интеграции оценивали путём визуального осмотра UMAP-вложений, окрашенных по образцу и условию.

Анализ дифференциальной экспрессии генов выполняли с помощью функции FindAllMarkers на объекте RNA-анализа после нормализации LogNormalize. Аннотирование типов клеток сочеталось из ручного и автоматизированного подходов. Ручное аннотирование основывалось на дифференциально экспрессирующихся генах, характерных для кластера, и экспрессии канонических маркеров. Автоматизированное аннотирование использовало референс-ориентированный рабочий процесс Azimuth с применением референсного набора данных PBMC [176]. Кластеры 11 и 14 были вручную идентифицированы как В-клетки, после чего соответствующие аннотации подтипов В-клеток были присвоены в соответствии с предсказаниями Azimuth по референсу. Аналогично, метки «МАИТ-клетки» (mucosal-associated invariant T-cells), «гамма-дельта Т-клетки» ( $\gamma\delta$ Т-клетки) и «двойные негативные Т-клетки» (dnТ-клетки) были присвоены в соответствии с референсом Azimuth. Кластеры 17, 19, 20 и 26 были исключены из последующего анализа из-за низкого качества.

Чтобы оценить эффективность этой коррекции и надёжность нашей кластеризации, мы провели анализ чувствительности на уровне доноров. Мы визуально оценили распределение клеток каждого отдельного донора до и после интеграции. Более того, чтобы явно проверить, не были ли наши ключевые выводы обусловлены единственным выпадающим индивидуумом, мы сгенерировали UMAP-вложения и отдельно выделили кластеризационный анализ для каждого донора. Согласованное распределение основных клеточных популяций на всех индивидуальных графиках подтвердило, что ни один отдельный донор не оказал непропорционального влияния на интегрированную кластерную структуру или общий транскрипционный ландшафт.

## 2.14 Pseudo-bulk анализ дифференциальной экспрессии генов мононуклеаров периферической крови

Анализ дифференциальной экспрессии на уровне pseudo bulk РНК проводили на двух уровнях. Сначала выполняли глобальное сравнение pseudo bulk данных на уровне всех иммунных клеток, агрегируя все популяции, за исключением плазмобластов/плазматических клеток, тромбоцитов и пролиферирующих Т/НК-клеток. Затем оценивали дифференциальную экспрессию на уровне отдельных типов клеток, сравнивая пациентов с ВИЧ и контрольную группу внутри каждой аннотированной популяции. Дифференциальную экспрессию вычисляли с помощью функции FindMarkers с методом DESeq2. Вулкан-графики строили с использованием EnhancedVolcano (URL: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>; дата доступа: 14 января 2026 г.). Анализ обогащения путей Gene Ontology (GO) проводили с помощью clusterProfiler v. 4.12.6 [177], используя гены с скорректированным р-значением  $< 0,05$  и  $\log_2$  fold change  $> 0,5$ .

Тепловые карты результатов глобального псевдобалкового анализа строили с помощью пакета pheatmap v. 1.0.12 на основе 25 наиболее активируемых и 25 наиболее подавляемых генов (скорректированное р-значение  $< 0,05$ ), ранжированных по  $\log_2$  fold change, и на основе шкалированных значений псевдобалковой экспрессии по отдельным донорам (<https://github.com/raivokolde/pheatmap> (дата доступа: 1 декабря 2025 г.)). Описательные статистики, включая среднюю экспрессию, стандартное отклонение и 95% доверительные интервалы, рассчитывали с использованием лог-нормализованных значений pseudo bulk РНК экспрессии.

Стабильность глобального псевдобалкового анализа оценивали, повторяя анализ на случайной подвыборке, составляющей 70% клеток из групп ВИЧ-положительных и контрольных лиц.

## 2.15 Исследование сетей межклеточных коммуникаций

Межклеточную коммуникацию восстанавливали с помощью пакета CellChat v. 2.1.2 для среды программирования R [178]. Каждый набор данных обрабатывали независимо, следуя руководству к пакету. Лиганд-рецепторные взаимодействия вычисляли с использованием стандартного рабочего процесса, а взаимодействия фильтровали с помощью filterCommunication (min.cells = 10, min.samples = 3). Сравнительный анализ между условиями проводили в соответствии с руководством «Comparison analysis of multiple datasets using CellChat», что позволило напрямую сравнивать коммуникационные сети между наборами данных с согласованным составом клеточных популяций.

## 2.16 Дизайн наборов праймеров и зондов для исследования числа провирусных резервуаров ВИЧ-1

Праймеры и зонды для провирусных мишеней были адаптированы с использованием полногеномных последовательностей геновариантов А6, В и CRF63\_02А6, полученных из базы данных LANL для изолятов, циркулирующих на территории стран бывшего СССР (URL: <https://www.hiv.lanl.gov/>, дата доступа 18.10.2025).

Таблица 1 - Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, разработанные для метода IPDA и направленные на различные участки генома ВИЧ-1 (5' LTR и гены gag, pol, env) или ген в геноме клетки-хозяина (RPP) для определения точного числа клеток в смеси

| Праймер/зонд       | Последовательность 5' - 3'                 |
|--------------------|--|
| 5' LTR/Gag forward | CGGCGACTGGTGAGTACG                         |
| 5' LTR/Gag reverse | GACGCTCTCGCACCCATC                         |
| 5' LTR/Gag probe   | /HEX/TCTCTCSTTCTAGCCTCCGCTAGTCA/BHQ<br>_2/ |

|                  |   |
|------------------|---|
| 3` Pol forward   | GGAAAGGTGAAGGGGCRGT                                   |
| 3` Pol reverse   | TCATCCTGTCTACTTGCCACAC                                |
| 3` Pol probe     | /FAM/AATCATCACC/dT-BHQ_1/GCCATCTGTTTTCCATARTCC/BHQ_1/ |
| Env forward      | CTTCCTTGGGTTCTTRGGARCA                                |
| Env reverse      | TGCTGTTGYACTATRCCAGACA                                |
| Env probe        | /HEX/TGTCTGGCYTGTACCGTCAGCGT/BHQ_2/                   |
| 3` RPP30 forward | GCTGTGTTTGCTCTCTTGATTT                                |
| 3` RPP30 reverse | GGTCTGTCCATGGCATCTTAT                                 |
| 3` RPP30 probe   | /HEX/AATGTCTGTGACTGGGTTCTGGCT/BHQ-2/                  |
| 5` RPP30 forward | GCATATCAGGGTACAGCATAGG                                |
| 5` RPP30 reverse | CTTCCCTCACGGCATATACTTC                                |
| 5` RPP30 probe   | /FAM/TCTGCTCGTTGTTAGTCACCAGCT/BHQ-1/                  |

Поскольку на используемой нами в работе системе Qiagen QIAcuity dPCR system 2plex (Qiagen, Хильден, Германия, Каталожный № #911001) возможно мультиплексирование мишеней за счет амплитудной флюоресценции, как и на аналогичных системах цифровой ПЦР, для мультиплексирования мы использовали два набора праймеров и зондов в канале HEX с различной конечной концентрацией для разделения кластеров.

Консервативность участков-мишеней для праймеров и зондов оценивалась с помощью пакета HIVprimertestR, реализованного на языке программирования R (<https://github.com/guineverelee/HIVprimertestR> (дата доступа: 18.10.25)). Для амплификации гена домашнего хозяйства Ribonuclease P protein subunit p30 (RPP30) и анализа клеточных мишеней использовались праймеры и зонды, описанные в работе Bruner и соавт. [85].

## **2.17 Конструкция плазмид для положительного контроля и валидации результатов цифровой ПЦР**

В качестве положительного контроля использовались плазмиды pMtBs.18 (GenBank accession number: MK984159.1), содержащие полногеномную последовательность ВИЧ-1, полученная в лаборатории ранее. Плазмиду линеаризовали путем инкубации с 2 мкл 1x CutSmartBuffer (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США, Каталожный № B7200S), 0.2 мкл. EcoRI (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США, Каталожный № R0101S) и 5.8 мкл. H<sub>2</sub>O, свободной от нуклеаз (Qiagen, Хильден, Германия, Каталожный № 17000-10), в течение 1 часа при температуре 37 °С, с последующей инактивацией эндонуклеазы рестрикции при температуре 65 °С в течение 20 минут. Затем, исходя из измеренной концентрации полученной линеаризованной плазмиды, рассчитывалось количество их копий в мкл. по формуле (10):

$$K = \frac{(C \times 10^{-9} * 6.022 * 10^{23})}{(P \times 650)}$$

Где К - количество копий плазмиды на мкл.;

С - концентрация плазмиды в нг/мкл;

Р - количество нуклеотидов в плазмиде.

Затем плазида смешивалась с геномной ДНК ВИЧ-отрицательных доноров (~200 нг/мкл) в соотношении 4:1 до получения 100 копий/мкл, после чего данная смесь использовалась в качестве положительного контроля.

## **2.18 Цифровая ПЦР**

Оценка представленности и интактности провирусных резервуаров среди ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии ВИЧ-инфекции осуществлялись на приборе Qiagen QIAcuity dPCR system 2plex (Qiagen, Хильден, Германия, Каталожный № 911001). Для амплификации

использовался рекомендованный мастер микс, содержащий все компоненты для ПЦР, кроме матрицы, праймеров и зондов Qiagen QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen, Хильден, Германия, Каталожный № 250101). Непосредственная реакция ПЦР проходила в небольших лунках планшета, при этом объем каждой лунки составлял 0,34 нл. Длинные молекулы ДНК могут мешать проведению цифровой ПЦР, поэтому в мастер микс добавлялась эндонуклеаза рестрикции XhoI (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США, Каталожный № R0146S), не имеющая сайтов рестрикции в мишенях ВИЧ и хозяйской мишени. ПЦР проводилась в планшетах Qiagen QIAcuity Nanoplates: 26K 24-well (Qiagen, Хильден, Германия, Каталожный № 250001) с 26 тысячами нанолунок на один образец. Отдельный и общий объем микролунок для каждого планшета был скорректирован в соответствии с актуальными данными от производителя с помощью Volume Precision Factor (VPF), доступных на сайте производителя (URL: <https://www.qiagen.com>, дата доступа 28.05.2025) в виде .zip архива.

Анализируемое количество клеток и индекс сдвига ДНК (DNA shearing index, DSI) рассчитывались с помощью амплификации гена домашнего хозяйства RPP30 с 5' и 3' концов нуклеотидной последовательности. При расчете анализируемого количества клеток также учитывалась степень разведения аликвоты для анализа RPP30. В случае неопределяемого количества интактных провирусных резервуаров, анализ образца продолжался до обнаружения интактных провирусных резервуаров или до момента анализа  $1 * 10^6$  клеток. Протокол амплификации указан в Таблице 3. Объемы и концентрации реагентов для анализа вирусных и клеточных мишеней указаны в Таблице 2. Концентрации и объем реагентов, добавленные в смесь для проведения ПЦР, указаны в Таблице 3. Сигналы флуоресценции регистрировалась по окончании амплификации со следующими параметрами: 500 мс экспозиции (Green/FAM канал); 400 мс экспозиции (Yellow/HEX канал); мощность лазера 6 единиц.

Таблица 2 - Температурные режимы цифрового амплификатора для ПЦР для определения ландшафта провирусных резервуаров ВИЧ-1

| Стадия   | Время     | Температура | Количество циклов |
|--|-----------|-------------|-------------------|
| Активация эндонуклеазы рестрикции и рестрикция | 15 минут  | 37 °С       | 1                 |
| Активация полимеразы                           | 2 минуты  | 95 °С       | 1                 |
| Денатурация                                    | 30 секунд | 94 °С       | 40                |
| Отжиг и элонгация                              | 1 минута  | 60 °С       |                   |
| Инактивация полимеразы                         | 10 минут  | 98 °С       | 1                 |

Таблица 3 - Объемы и концентрации реагентов с использованием Qiagen QIAcuity Nanoplate 26K 24 well для проведения цифровой ПЦР

| Реагент                                     | Объем  | Концентрация/количество в финальном растворе |
|---|--------|--|
| Общая часть                                 |        |  |
| Qiagen QIAcuity Probe PCR Kit (мастер-микс) | 10 мкл | -  |
| Эндонуклеаза рестрикции                     | 1 мкл  | 2 Единицы                                    |

| Анализ провирусных резервуаров        |               |   |
|---------------------------------------|---------------|---|
| Смесь праймеры-зонд                   | 4 мкл         | Праймеры: 5`LTR/Gag 0.4 мкМ,<br>остальные 0.8 мкМ<br><br>Зонды: 5`LTR/Gag 0.2 мкМ,<br>остальные 0.4 мкМ |
| Свободная от нуклеаз H <sub>2</sub> O | 17 - x<br>мкл | -   |
| Геномная ДНК                          | x мкл         | 600 нг  |
| Анализ клеточных мишеней              |               |   |
| Смесь праймеры-зонд                   | 4 мкл         | Праймеры: 0.8 мкМ<br><br>Зонды: 0.4 мкМ   |
| Свободная от нуклеаз H <sub>2</sub> O | 21 - x<br>мкл | -   |
| Геномная ДНК                          | x мкл         | 30 нг   |
| Всего                                 | 40 мкл        | -   |

Анализ результатов цифровой ПЦР производился в QIAcuity Software Suite v. 3.0.0.0 (Qiagen, Германия). Установление пороговых значений относительных единиц флюоресценции (Relative Fluorescence Units, RFU) производилось вручную с использованием пороговых линий и/или инструмента Лассо на основании значений RFU для отрицательного кластера в отрицательном контроле и для интактных/дефектных кластеров в положительном контроле, включенных в QIAcuity Software Suite v. 3.0.0.0 (Qiagen, Германия). Количество провирусных резервуаров приводилось на  $1 \cdot 10^6$  МПК в соответствии с количеством анализируемых клеток для каждого образца.

## Глава 3. Результаты собственных исследований

### 3.1 Формирование выборки биологического материала ВИЧ-положительных пациентов

Когорта исследования сформирована из ВИЧ-положительных людей в острой стадии ВИЧ-инфекции (стадии 2Б и 2В) с известным периодом предполагаемого инфицирования (Таблица 4). Для создания и валидации собственного инструмента генотипического предсказания тропности HIV-V3Augur в выборку были добавлены пациенты и с другими стадиями ВИЧ-инфекции, однако они использовались только для обучения и валидации моделей и не включались в биологическую интерпретацию данных о острой стадии ВИЧ-инфекции (Таблица 5). Кроме того, нужно отметить, что для сравнения полученного транскриптома единичных клеток ВИЧ-положительных лиц использовались данные из контрольной когорты исследования здоровых лиц из другого исследования [159], взятые из открытой базы данных NCBI BioSample (номер доступа BioSample: SAMN43886591, SAMN43886592, SAMN43886594; дата обращения: 03.12.25). Лица из контрольной когорты исследования были сопоставимы с ВИЧ-положительными пациентами в острой стадии ВИЧ-инфекции по полу, возрасту и этнической принадлежности.

Сводные данные о пациентах основной когорты исследования ВИЧ-положительных лиц в острой стадии инфекции (Таблица 4) включают кодовое имя пациента; стадию ВИЧ-инфекции по Покровскому; информацию о вирусной нагрузке ВИЧ и количестве CD4+ Т-клеток; путь инфицирования; генетический вариант ВИЧ-1, вызвавший инфекцию; фенотип изолята по уровню репродукции (rapid/high или slow/low); тропность, определенную *in vitro*. Некоторые пациенты были отобраны для исследования транскриптома единичных клеток (их кодовые имена отмечены символом «\*»). Критериями

отбора пациентов для scRNAseq являлись: (I) геновариант ВИЧ-1, вызвавший инфекцию; (II) жизнеспособность замороженных клеток.

Таблица 4 - Клинически значимые данные о ВИЧ-положительных пациентах в острой стадии ВИЧ-инфекции

| № | Код пациента | Стадия ВИЧ-инфекции | Вирусная нагрузка (копий/мл) | Количество CD4 Т-клеток (ед/мл) | Путь инфицирования | Генетический вариант ВИЧ | Фенотип    | Тропность |
|---|--------------|---------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------|------------|-----------|
| 1 | MIG          | 2В                  | $>10*10^6$                   | 404                             | половой            | CRF63_02<br>A6           | Rapid/High | R5        |
| 2 | KUCH         | 2В                  | $>10*10^6$                   | 764                             | половой            | CRF63_02<br>A6           | Rapid/High | R5        |
| 3 | KIL          | 2В                  | $>10*10^6$                   | 124                             | половой            | CRF63_02<br>A6           | Rapid/High | R5        |
| 4 | GOL          | 2В                  | $7,2*10^6$                   | 433                             | половой            | CRF63_02<br>A6           | Rapid/High | R5/X4     |
| 5 | KOH          | 2В                  | $2,67*10^6$                  | 268                             | половой            | CRF63_02<br>A6           | Rapid/High | R5        |
| 6 | SMA*         | 2В                  | $>10*10^6$                   | 1159                            | парентеральный     | URF_63/A<br>6            | Rapid/High | R5/X4     |
| 7 | KOD*         | 2В                  | $>10*10^6$                   | 225                             | половой            | CRF63_02<br>A6           | Rapid/High | R5        |

|    |      |    |            |     |         |                |            |       |
|----|------|----|------------|-----|---------|----------------|------------|-------|
| 10 | YAK* | 2Б | $>10*10^6$ | 760 | половой | A6             | Rapid/High | R5/X4 |
| 11 | CHIL | 2Б | $>10*10^6$ | 319 | Половой | CRF63_02<br>A6 | Rapid/High | R5    |
| 12 | URG  | 2Б | $>10*10^6$ | 702 | половой | CRF63_02<br>A6 | Slow/Low   | X4    |
| 13 | MED  | 2Б | $>10*10^6$ | 146 | половой | CRF63_02<br>A6 | Rapid/High | R5/X4 |
| 14 | LEG  | 2Б | $>10*10^6$ | 229 | Половой | A6             | Rapid/High | R5    |

Для обучения моделей машинного обучения HIV-V3Augur использовались дополнительные изоляты, не включенные в основную когорту исследования, о чем было сказано выше. Сводные данные о пациентах и изолятах ВИЧ-1 этой когорты исследования представлены в Таблице 5.

Таблица 5 - Дополнительная когорта исследования ВИЧ-положительных пациентов, использованная для обучения и валидации модели машинного обучения HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности

| № | Код пациента | Вирусная нагрузка (копий/мл) | Количество CD4 Т-клеток (ед/мл) | Путь инфицирования | Генетический вариант ВИЧ | Фенотип | Тропность |
|---|--------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------|---------|-----------|
|---|--------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------|---------|-----------|

|   |              |                     |     |                |                |            |       |
|---|--------------|---------------------|-----|----------------|----------------|------------|-------|
| 1 | PLUS         | 3,5*10 <sup>5</sup> | 274 | парентеральный | CRF63_02<br>A6 | Rapid/High | R5    |
| 2 | VL31_2<br>4  | 53*10 <sup>5</sup>  |     |                | URF_A6/C/<br>B | Slow/Low   | R5/X4 |
| 3 | VL204_<br>24 | 352*10 <sup>5</sup> |     |                | CRF63_02<br>A6 | Slow/Low   | X4    |
| 4 | DYACH        | 12*10 <sup>5</sup>  | 168 | парентеральный | URF_A6/B       | Rapid/High | R5    |
| 5 | SRD          | 256*10 <sup>5</sup> | 534 | половой        | A6             | Rapid/High | R5    |
| 6 | GLV          | 620*10 <sup>5</sup> | 148 | парентеральный | URF_A6/B       | Rapid/High | R5/X4 |
| 7 | VLD110<br>8  | 270*10 <sup>5</sup> | 115 | половой        | A6             |            | R5/X4 |

### 3.2 Генотипирование штаммов ВИЧ-1

Генотипирование изолятов по последовательностям почти полных геномов показало, что в собранной выборке доминируют штаммы CRF63\_02A6 (n = 11), за которыми следуют штаммы суб-субтипа A6 (n = 4) и несколько уникальных рекомбинантных форм: URF\_A6/C/B (n = 1) с областью гена env от суб-субтипа A6, URF\_63/A6 (n = 1) с областью env от CRF63\_02A6, URF\_A6/B (n = 2) с областью env от суб-субтипа A6. Ввиду дефицита данных URF использовались в тестовых выборках, соответствующих генетическому варианту ВИЧ, от которого была получена область env. Таким образом, URF\_A6/C/B и URF\_A6/B были включены в группу суб-субтипа A6, а URF\_63/A6 был включен в группу CRF63\_02A6. Мы также использовали

несколько изолятов, полученных в нашей лаборатории ранее: MTZn (A6; X4 тропность), MTBs (CRF63\_02A6; X4 тропность), T11 (CRF63\_02A6; R5 тропность) и несколько фенотипированных последовательностей суб-субтипа A6 (n=19) и CRF63\_02A6 (n=2) из базы данных LANL (n = 21; R5 = 18; X4 = 3); номера доступа GenBank для всех последовательностей LANL приведены в Сопроводительной таблице. Для генотипирования все последовательности были нанесены на филогенетическое дерево (Рисунок 10).

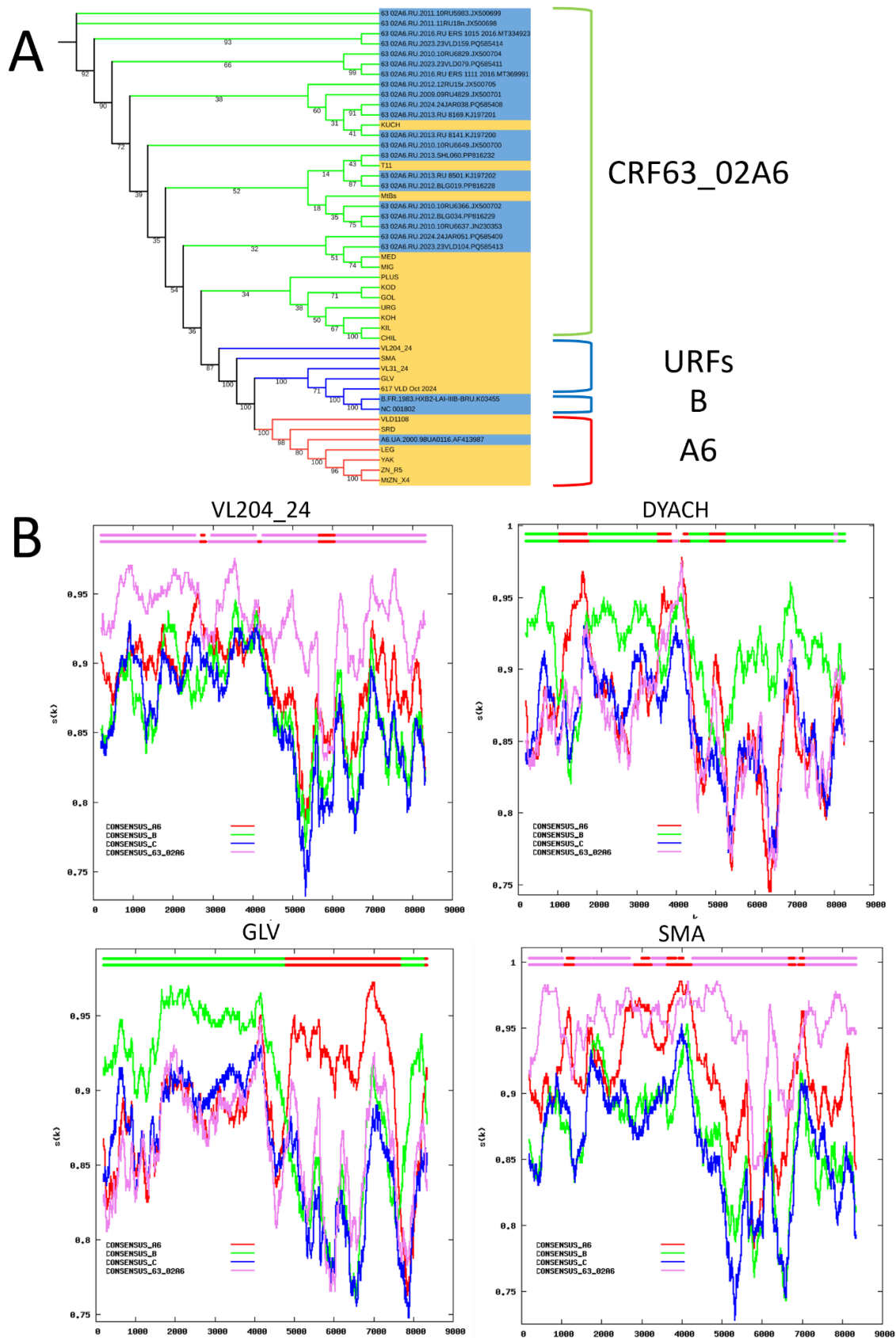


Рисунок 10. Филогенетический анализ лабораторных последовательностей с определенным фенотипом тропности: (а) - филогенетическое дерево (Maximum Likelihood,

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 точки рекомбинации, 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.

Анализ происхождения области V3 в последовательностях URFs проводился с помощью инструмента RIP [167].

### **3.3 Изоляция и фенотипирование штаммов ВИЧ из клинического материала**

Изучение особенностей клинических изолятов ВИЧ, выделенных из клинического материала пациентов в острой фазе инфекции, представляет собой ключевой этап в исследовании патогенеза и динамики ранних стадий заболевания.

Для всех пациентов из когорты исследования (14 человек) удалось получить инфекционные штаммы ВИЧ-1. Результаты измерения количества белка p24 ВИЧ, проводившегося в ходе изоляции, представлены на Рисунке 11.

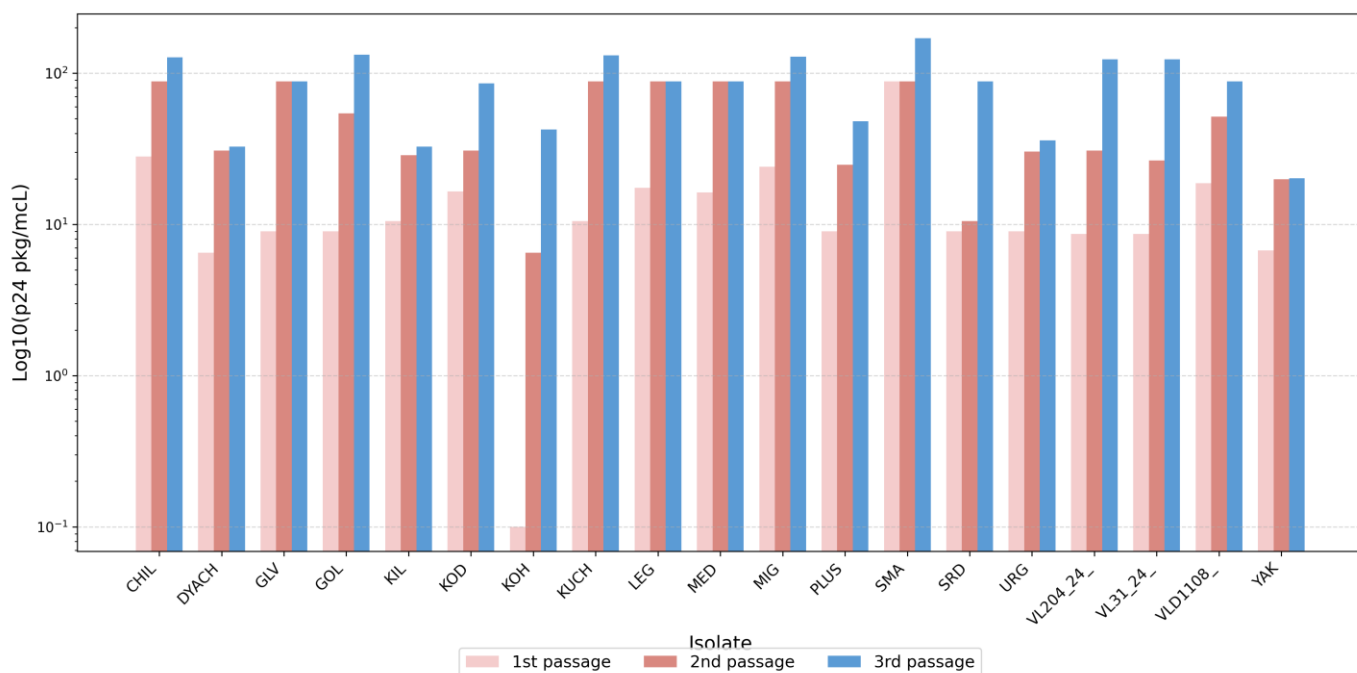


Рисунок 11. Накопление капсидного белка p24 ВИЧ в культуральной жидкости в процессе изоляции инфекционных штаммов из МПК ВИЧ-положительных пациентов, находящихся в острой стадии ВИЧ-инфекции

Фенотипическое определение тропности включало изоляты из дополнительной ВИЧ-положительной когорты исследования, результаты которого представлены на Рисунке 12.

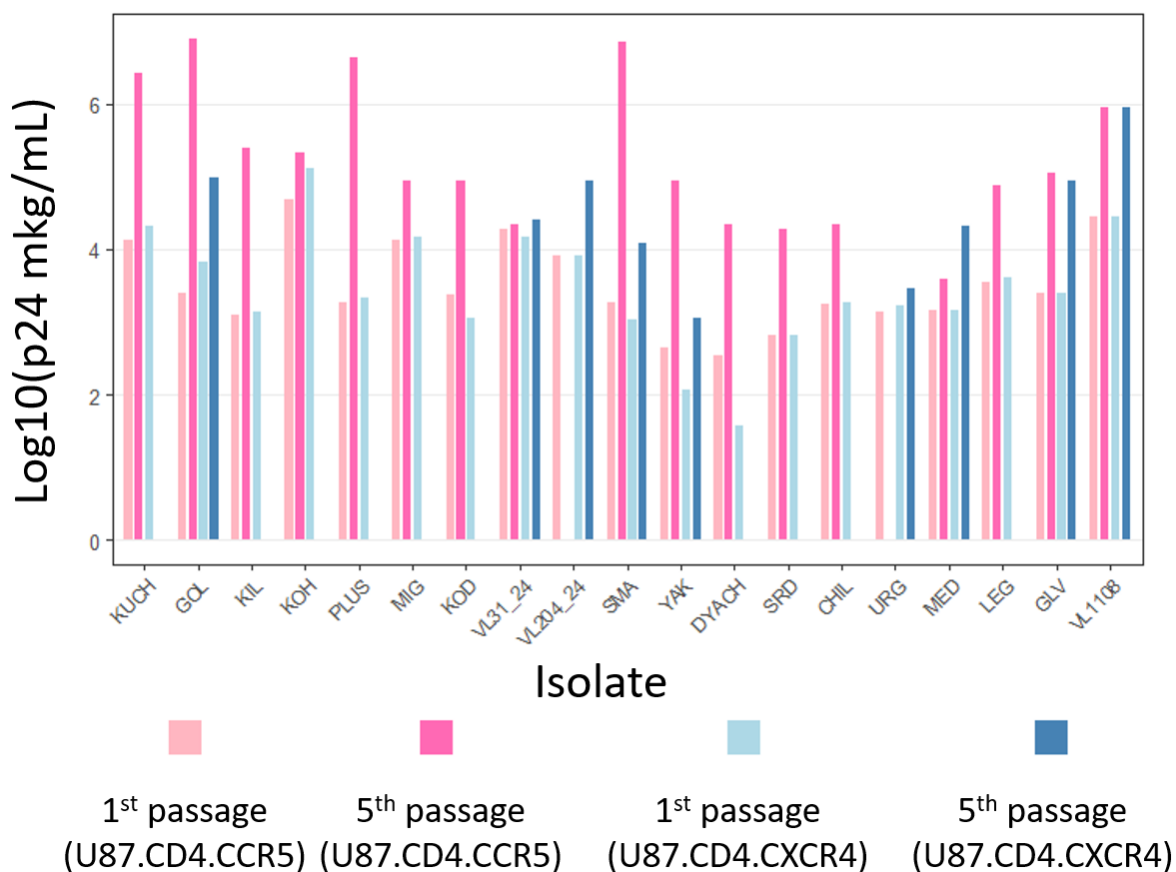


Рисунок 12. Концентрация белка p24 ВИЧ (мкг/мл) после первого и пятого пассажей при культивировании лабораторных изолятов на клеточных культурах U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4

Результаты фенотипического определения тропности показали (Рисунок 12), что в выборке присутствуют штаммы одиночной R5 (n = 11) или X4 (n = 1), и двойной тропности R5/X4 (n = 7).

### 3.4 Оценка эффективности существующих моделей генотипического предсказания тропности

Для сравнительного анализа были протестированы 8 моделей и правил, включая комбинированные правила (Delobel, Garrido), классические правила с модификациями (правила 11/25, 11/24/25, 5/11/25), NetCharge (с порогами 4, 5

и б), и более сложные генотипические инструменты (Geno2pheno для порогов FPR 5-20 %, PhenoSeq, T-CUP с порогом 0.2-0.8, WebPSSM с матрицами Vx4r5, Bsinsi, Csinsi). Оценка распространенных генетических вариантов ВИЧ-1 (суб-субтипы A1 и A2, субтипы B, C, CRF01\_AE, CRF02\_AG) проводилась на последовательностях из базы данных LANL. Исследование точности предсказаний для суб-субтипа A6 проводилось на смешанной выборке из LANL и собственных последовательностей, а для CRF63\_02A6 использовались только лабораторные последовательности.

Наилучшую общую точность продемонстрировало правило Delobel (91,13%, 95% ДИ: 88,45; 93,24 %), статистически значимо превосходящее другие простые правила ( $p < 0.05$ ) - 11/25 (90,18%; 95% ДИ: 87,3%; 92,47%), Net charge (64,69%; 95% ДИ: 58,69%; 70,26%) и сложные модели - geno2pheno 10FPR (80,61%; 95% ДИ: 75,99%; 84,52%), T-CUP 2.0 с порогом 0.2 и 0.4 (21,06%; 95% ДИ: 17,08%; 25,69%), PhenoSeq (79,11%; 95% ДИ: 74,54%; 83,04%) и WebPSSM со всеми вариациями, например, с матрицей Bsinsi (11,24%; 95% ДИ: 8,79%; 14,26%; Рисунок 13). Однако, модель WebPSSM разрабатывалась для предсказания тропности штаммов ВИЧ-1 субтипа B (матрицы Bsinsi и Vx4r5) и субтипа C (матрица Csinsi), что может объяснить низкую точность WebPSSM при предсказании тропности для других рассматриваемых субтипов.

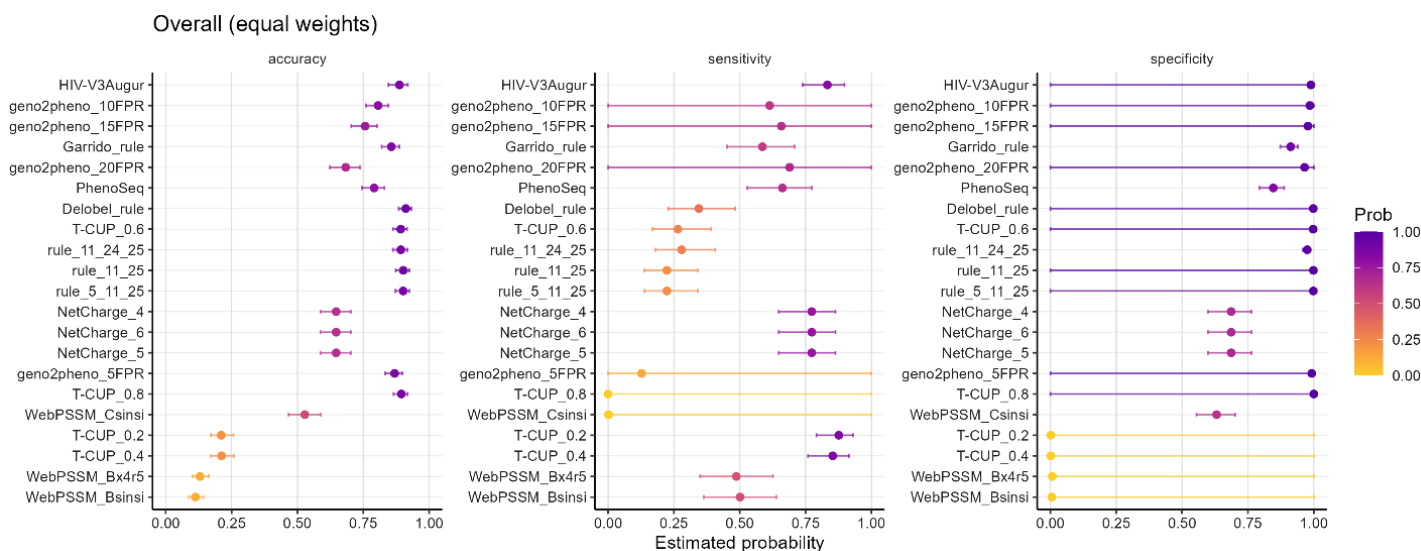


Рисунок 13. Точность, чувствительность (способность правильно обнаруживать X4 тропность) и специфичность (способность правильно обнаруживать R5 тропность) моделей и правил для генотипического предсказания тропности штаммов ВИЧ-1 на основе последовательностей V3 gp120. По оси Y указаны проверяемые модели и правила, по оси X указаны медианные значения метрик (минимум - 0; максимум - 1) с 95% доверительным интервалом.

При этом чувствительность правила Delobel оставалась на низком уровне (34,45%; 95% ДИ: 22,84%; 48,27%), поэтому основной вклад в высокую точность этого метода внесла именно специфичность (99,81%; 95% ДИ: 0%; 100%), то есть способность обнаруживать штаммы с R5 тропностью.

Очень близкие результаты показали правила 11/24/25 (89,25 %; 95% ДИ: 86,23%; 91,68%), 11/25 (90,18 %; 95% ДИ: 87,3%; 92,47%) и 5/11/25 (90,12%; 95% ДИ: 87,22%; 92,42%), а также T-CUP 2.0 с порогом 0,6 (89,22%; 95% ДИ: 86,25%; 91,61%) - различия между ними не достигали статистической значимости ( $p > 0.05$ ). Однако, все эти модели также обладали низкой чувствительностью в 27,93% (95% ДИ: 17,92%; 40,76%), 22,33% (95% ДИ: 13,8%; 34,05%), 22,33% (95% ДИ: 13,8%; 34,05%) и 26,5% (95% ДИ: 16,85%; 39,08%) соответственно.

Анализ чувствительности (способности выявлять Х4-тропные варианты) выявил резкий контраст между моделями. Максимальную чувствительность продемонстрировал T-CUP 2.0 с порогом 0,2 (87,59 %; 95% ДИ: 79,11%; 92,94%), однако его специфичность оказалась крайне низкой - 0,12% (95% ДИ: 0%; 100%). T-CUP 2.0 с порогом 0,4 также показал высокую чувствительность (85,30%), но столь же низкую специфичность. Среди практически пригодных подходов наиболее сбалансированной оказалась комбинация NetCharge с порогом 4 и 5: чувствительность 77,33% (95% ДИ: 64,82%; 86,32%) при специфичности 68,64% (95% ДИ: 59,78%; 76,33%). Geno2pheno с FPR 20% показал высокую чувствительность 68,93% (95% ДИ: 0%; 100%), но с широкими доверительными интервалами. Все классические правила (11/25, 11/24/25, 5/11/25) показали крайне низкую чувствительность (22-28 %), что делает их непригодными для скрининга Х4-вариантов.

Что касается специфичности (способности правильно идентифицировать R5-вирусы), лучшие результаты ожидаемо показали правила 11/25 (99,84%; 95% ДИ: 0%; 100%), 5/11/25 (99,83%; 95% ДИ: 0%; 100%) и 11/24/25 (97,52%; 95% ДИ: 95,86%; 98,53%), а также правило Delobel (99,81%; 95% ДИ: 0%; 100%). Geno2pheno при всех проверенных FPR сохранял специфичность выше 96 % (для FPR=5 % - 99,24 %, для FPR=20 % - 96,51 %). Напротив, модели с высокой чувствительностью (T-CUP 2.0 с порогами 0.2, 0.4) практически полностью теряли специфичность.

Анализ точности (accuracy) при рассмотрении отдельных субтипов и CRF показал, что для глобально распространённых вариантов (B, C, CRF01\_AE) многие модели достигают высокой точности (96-95%); Рисунок 14).

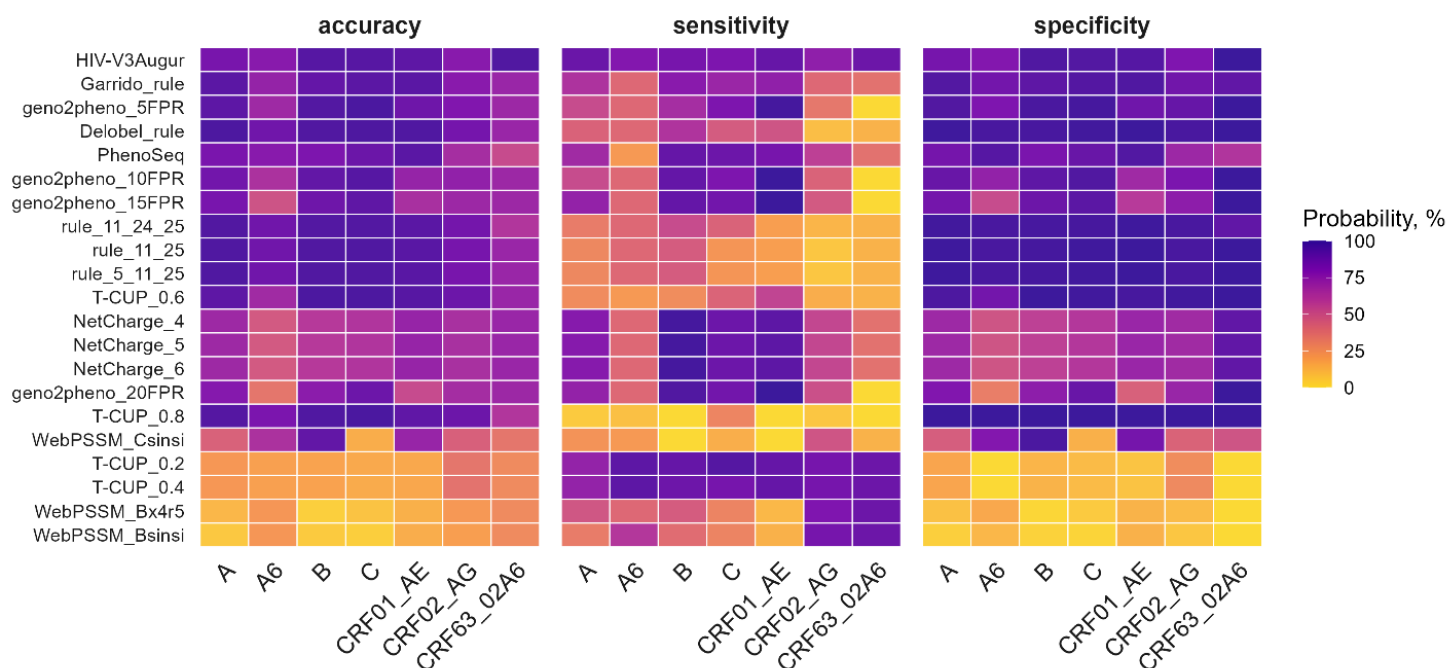


Рисунок 14. Тепловая карта метрик качества моделей (точность, чувствительность и специфичность) для генотипического предсказания тропности штаммов ВИЧ-1 на основе нуклеотидных/аминокислотных последовательностей V3 gp120. Каждая ячейка окрашена в соответствии с величиной метрики: от желтого цвета (низкие 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). Для проверки собственной модели HIV-V3Augur использовалась 10-кратная кросс-валидация во время обучения модели

Для субтипа В наилучшую точность продемонстрировал T-CUP 2.0 с порогом 0,6 (96,08 %; 95 % ДИ: 94,20%; 97,37 %), за ним следовали T-CUP 0,8 (94,96%; 95% ДИ: 94,33%; 97,51) и правило Delobel (94,75%; 95% ДИ: 92,58%; 96,31%). Для субтипа С большую точность показала модель Geno2pheno с FPR 5% (96,34%, 95% ДИ: 94,29%; 97,68%), близкие результаты показали T-CUP 2.0 0,8 (96,23%; 95% ДИ: 94,33%; 97,51%) и T-CUP 2.0 с порогом 0,6 (95,73%; 95% ДИ: 93,72%; 97,12%). Для рекомбинанта CRF01\_AE лучшей оказалась модель Delobel (95,01 %, 95% ДИ: 92,04%; 96,91%), затем T-CUP 0,6 (93,03%; 95% ДИ: 89,63%; 95,38%) и правила 11/25 и 5/11/25 (92,33%; 95% ДИ: 88,75%;

94,83%). При этом наиболее точная модель для предсказания тропности CRF02\_AG - T-CUP 2.0 с порогами 0.6 и 0.8 показала сниженную точность (86,41%; 95% ДИ: 80,62%; 90,68%), в сравнении с лучшими моделями для других распространенных генетических вариантов ВИЧ-1. Еще меньшую точность модели продемонстрировали по отношению к CRF63\_02A6, где несколько наиболее удачных моделей (правило Delobel, правило Garrido, Net charge, rule 11/25 и T-CUP 2.0 с порогом 0.6) показали низкую точность (71,76%; 95% ДИ: 38,17%; 91,28%).

Анализ чувствительности выявил ещё более контрастную картину. Для субтипов В и С наивысшую чувствительность обеспечивали NetCharge (98,03%; 95% ДИ: 86,35%; 99,75%) и T-CUP 0,2 (93,88%; 95% ДИ: 80,42%; 98,29%) соответственно. Однако, их специфичность была очень низка (Рисунок 14).

Специфичность для большинства субтипов у исследуемых моделей была высокой (98-100%). Однако для суб-субтипа А6 и CRF63\_02A6 даже лучшие модели по специфичности (например, 100% у T-CUP 2.0 с порогом 0.8 давал 100%) не позволяли одновременно достичь приемлемой чувствительности. Таким образом, существующие генотипические инструменты, хорошо работающие на глобальных субтипах В, С и CRF01\_AE, демонстрируют существенное и системное снижение эффективности на генетически отличных вариантах суб-субтипа А6 и CRF63\_02A6. Ни одна из протестированных моделей не смогла обеспечить для этих субтипов одновременно высокую чувствительность и специфичность, что подчёркивает острую необходимость разработки специализированных инструментов для менее распространённых, но клинически значимых генетических вариантов ВИЧ-1.

### 3.5 Разработка и валидация модели HIV-V3Augur для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1

Для предсказания тропизма ВИЧ-1 на основе нуклеотидных последовательностей V3-петли мы разработали комбинированную модель стекинга, объединяющую модели Random Forest и SVM. Модель обучалась с использованием 10-кратной стратифицированной кросс-валидации на объединённых данных RSCU и псевдо-аминокислотного состава PseAAC. Для повышения стабильности предсказаний мета-классификатором служила логистическая регрессия. Такой ансамблевый подход обеспечил надёжную дискриминацию R5/X4 для большинства генетических вариантов ВИЧ-1 (A, B, C, CRF01\_AE, CRF02\_AG). Нужно отметить, что HIV-V3Augur использует уникальные модели для каждого из названных субтипов для детекции уникальных паттернов каждого варианта.

Следует отметить, что база данных LANL содержит лишь две последовательности CRF63\_02A6 с экспериментально определенной тропностью. Прямое обучение модели на столь ограниченной выборке невозможно. Поэтому для анализа CRF63\_02A6 мы использовали модель, обученную на более крупном и сбалансированном наборе данных CRF02\_AG. Выбор CRF02\_AG в качестве обучающей выборки обоснован тем, что в геноме CRF63\_02A6 область *env*, включая петлю V3 gp120, унаследована именно от этого родительского варианта. При обучении применялся алгоритм RandomForest с предварительным синтетическим увеличением минорного (X4-тропного) класса методом SMOTE. Такой подход позволил модели выявить сигнатуры X4-тропизма, которые оказались применимы и к последовательностям CRF63\_02A6. Таким образом, HIV-V3Augur включает шесть уникальных классификаторов, каждый из которых ориентирован на определенный генетический вариант ВИЧ-1. Большинство классификаторов реализовано в виде стекинг-ансамбля RandomForest и SVM, тогда как для CRF63\_02A6 используется отдельная модель RandomForest, обученная с

использованием SMOTE. Все модели имели допустимые метрики качества, включая точность, чувствительность и специфичность (Рисунок 13, Рисунок 14) и ROC-площадь (Рисунок 15).

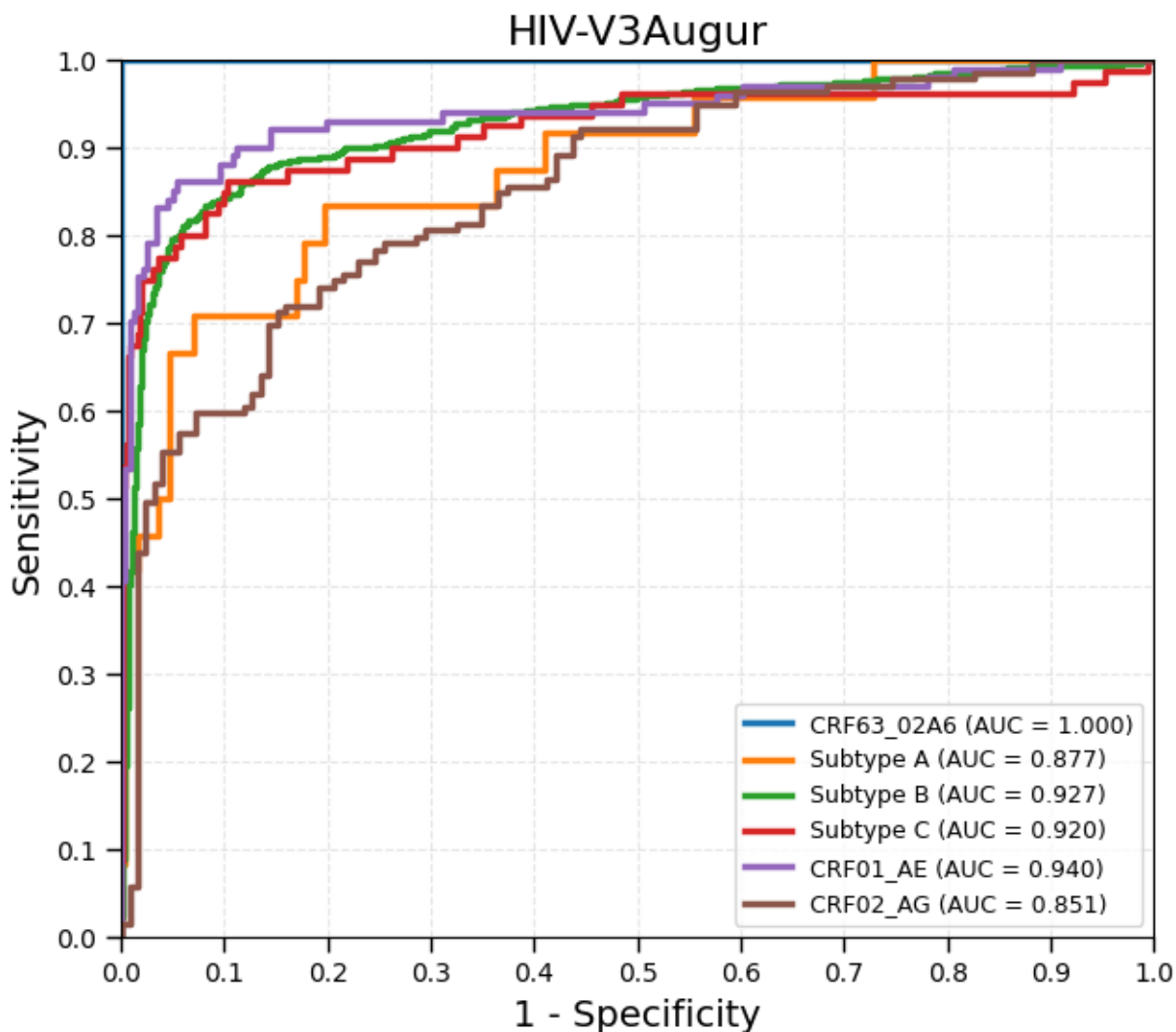


Рисунок 15. ROC-кривые модели HIV-V3Augur для шести генетических вариантов ВИЧ-1 (субтипы A, B, C, CRF01\_AE, CRF02\_AG и CRF63\_02A6). Для каждого субтипа указано значение площади под ROC-кривой (AUC). Цвета обозначают ROC-кривые для отдельных субтипов или CRF. Модель демонстрирует высокую дискриминативную способность со значениями AUC от 0.851 до 1.000. Идеальное разделение для CRF63\_02A6 (AUC=1.000) нужно интерпретировать с осторожностью, поскольку выборка фенотипированных изолятов этого CRF ограничена данным исследованием, и представлена крайне ограниченным числом фенотипированных последовательностей в базе LANL. График построен с помощью языка программирования Python 3.12 с

использованием библиотек matplotlib v. 3.10.9, scikit-learn v. 1.8.0, pandas v.3.0.1 и numpy v.2.2.6

При общей оценке метрик эффективности для всех субтипов модель HIV-V3Augur продемонстрировала сбалансированные показатели: медианная точность составила 88.3 % (95% ДИ: 84,53%; 91,9%), чувствительность - 83,29 % (95% ДИ: 73,89%; 89,77%), специфичность - 98,91% (95% ДИ: 0; 100). По общей точности HIV-V3Augur находилась на 6 месте с небольшой разницей с лидерами (от 0,52% до 2,40%), при этом разница между ними не имела статистической значимости ( $p > 0.05$ ). Однако, на глобально распространенных субтипах В, С и CRF01\_AE она несколько уступала лучшим существующим алгоритмам (например, для субтипа В лучшая точность 96,08 % у T-CUP 0,6, для субтипа С - 96,34% у Geno2pheno 5% FPR, для CRF01\_AE - 95,01% у правила Delobel). Тем не менее, наша модель стабильно входила в число наиболее эффективных для этих вариантов, что подтверждает её универсальность.

Ключевое преимущество HIV-V3Augur раскрывается при работе с географически менее распространенными субтипами А6 и CRF63\_02А6, которые совместно ответственны за большую часть случаев ВИЧ-инфекции в странах FSU. Для суб-субтипа А6 наша модель заняла 3-е место по точности (77,31%, 95 % ДИ 55,41-90,33%), уступая лишь комбинации простых правил (Delobel, 11/25, 5/11/25, 11/24/25, которые дали 85,01%). Однако по чувствительности (способности выявлять Х4-тропные варианты) HIV-V3Augur оказалась на втором месте, уступая только T-CUP 0.2/0.4 (91,44%), но эта модель имела нулевую специфичность с данными порогом. HIV-V3Augur обеспечила более сбалансированный и стабильный профиль с умеренной чувствительностью в 79,02% и специфичностью в 78,8%. Для CRF63\_02А6 HIV-V3Augur стала абсолютным лидером по точности (94,91%),

а также вошла в группу лучших по чувствительности (86,6%) и специфичности (100%).

При рассмотрении сравнительной эффективности HIV-V3Augur на сбалансированной выборке с равным количеством штаммов R5 и X4 тропности тенденции в отношении лучшей эффективности при анализе суб-субтипа A6 и CRF63\_02A6 сохраняются (Рисунок 16).

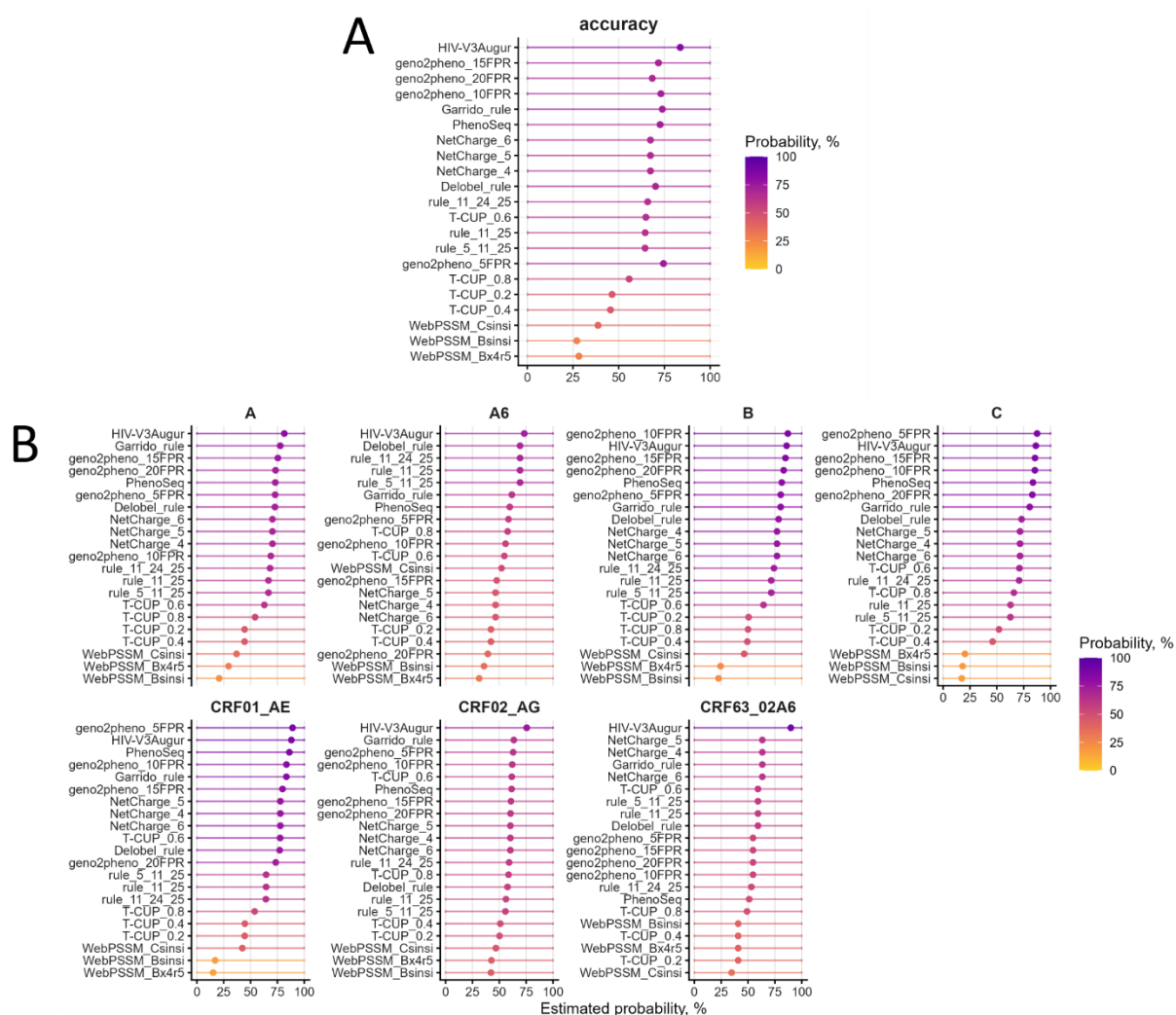


Рисунок 16. Точность исследуемых моделей при анализе сбалансированных выборок тропности с урвненным количеством последовательностей R5 и X4 тропности: А - медианная точность и 95% ДИ в отношении всех исследуемых субтипов ВИЧ-1 (А, В, С) и CRF (CRF63\_02A6); В - медианная точность и 95% ДИ исследуемых моделей применительно к каждому субтипу или CRF

На сбалансированной выборке (равное число R5 и X4 в каждом субтипе) наша модель HIV-V3Augur продемонстрировала наилучшие результаты для целевых субтипов A6 и CRF63\_02A6. Для суб-субтипа A6 HIV-V3Augur заняла первое место по точности (73,24%), опередив правила Delobel, 11/25 и 5/11/25 (69,31%). Для CRF63\_02A6 разрыв оказался ещё более выраженным: HIV-V3Augur достигла 89,81%, тогда как вторая по эффективности модель Garrido - лишь 63,29%.

В усреднённой оценке по всем субтипам HIV-V3Augur также лидирует: общая точность 83,66 %, что выше показателей Geno2pheno (74,49%), Garrido (73,85%) и Delobel (70,14%). Таким образом, при балансировке классов HIV-V3Augur представляет собой оптимальную модель генотипического предсказания тропности и на глобальных субтипах.

### **3.6 Графический интерфейс HIV-V3Augur**

Разработанная программа HIV-V3Augur представляет собой автономное Windows-приложение с графическим интерфейсом, не требующее установки дополнительного программного обеспечения или навыков работы с командной строкой. Главное окно программы (Рисунок 17) содержит поле для выбора FASTA-файла, кнопку для загрузки FASTA-файла и варианты генотипирования (автоматический или ручной; Рисунок 17). После завершения генотипирования отображается информация о генотипе. Программа может показать сходство одной последовательности с несколькими генотипами и позволяет пользователю выбрать один или несколько генотипов. Если пользователь оставляет несколько возможных генотипов, HIV-V3Augur предсказывает тропизм для каждого из них с использованием соответствующих субтип-специфичных моделей. Результаты генотипирования и предсказания тропизма можно сохранить в виде таблицы CSV.



HIV-V3Augur

Input FASTA (nucleotide): Browse... Load sequences

Predict tropism Export genotyping CSV Export tropism CSV

**3**

**1** **2**

Genotyping Tropism

Select an input FASTA, then click 'Load sequences'.

**4**

**Genotyping workflow**

How would you like to assign genotypes for tropism prediction?

- Manual assignment (you choose subtypes)
- Automatic genotyping (may make mistakes)

Note: V3 is short and variable. For best results, confirm genotyping with an external tool and another region when possible.

Continue Cancel

HIV V3 AUGUR Ready

HIV-V3Augur

Input FASTA (nucleotide): C:\Users\elfim\Desktop\models\raw\_data\CRF01\_AE\_R5.fasta Browse... Load sequences

Predict tropism Export genotyping CSV Export tropism CSV

**5** **6**

Genotyping Tropism

Automatic mode: click a Genotype cell to edit subtype(s) if needed.

| ID                                | Genotype | Confidence | Excluded Reason |
|-----------------------------------|----------|------------|-----------------|
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a1.AB014775  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a2.AB014776  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a3.AB014777  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a6.AB014778  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B14.AB014779 | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B15.AB014780 | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B16.AB014781 | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B3.AB014782  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B6.AB014783  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B7.AB014784  | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_C25.AB014787 | CRF01_AE | high       |                 |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_C26.AB014788 | CRF01_AE | high       |                 |

HIV V3 AUGUR Genotyping done: 872 sequences

HIV-V3Augur

Input FASTA (nucleotide): C:\Users\elfim\Desktop\models\raw\_data\CRF01\_AE\_R5.fasta Browse... Load sequences

Predict tropism Export genotyping CSV Export tropism CSV

**7**

Genotyping Tropism

| ID                                | Model genotype | Tropism | P(X4)  | P(R5)  | Warnings |
|-----------------------------------|----------------|---------|--------|--------|----------|
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a1.AB014775  | CRF01_AE       | R5      | 0.1568 | 0.8432 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a2.AB014776  | CRF01_AE       | R5      | 0.0606 | 0.9394 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a3.AB014777  | CRF01_AE       | R5      | 0.1568 | 0.8432 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_a6.AB014778  | CRF01_AE       | R5      | 0.0563 | 0.9437 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B14.AB014779 | CRF01_AE       | R5      | 0.0606 | 0.9394 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B15.AB014780 | CRF01_AE       | R5      | 0.0606 | 0.9394 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B16.AB014781 | CRF01_AE       | R5      | 0.0587 | 0.9413 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B3.AB014782  | CRF01_AE       | R5      | 0.2335 | 0.7665 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B6.AB014783  | CRF01_AE       | R5      | 0.0606 | 0.9394 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_B7.AB014784  | CRF01_AE       | R5      | 0.1568 | 0.8432 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_C25.AB014787 | CRF01_AE       | R5      | 0.1568 | 0.8432 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_C26.AB014788 | CRF01_AE       | R5      | 0.0606 | 0.9394 |          |
| 01_AE.JP.1996.NH2_IL_C27.AB014789 | CRF01_AE       | R5      | 0.0606 | 0.9394 |          |

HIV V3 AUGUR Tropism prediction done: 862 rows

Рисунок 17. Пользовательский графический интерфейс модели генотипического предсказания тропности HIV-V3Augur. Программа позволяет пользователю выбрать нуклеотидный FASTA-файл в любой директории (1), загрузить его в программу (2), генотипировать последовательность изолята вручную или автоматически (3 и 4), выполнить генотипическое предсказание тропности (5) и экспортировать результаты генотипирования (6) и предсказания тропности (7) в виде таблиц CSV.

При установке HIV-V3Augur Центр безопасности Windows может вывести предупреждение о том, что программа является недоверенной. Программа не собирает пользовательские данные и не использует персональный компьютер пользователя в каких-либо незаконных целях. Пользователи могут самостоятельно убедиться в безопасности программы, поскольку HIV-V3Augur распространяется с открытым исходным кодом.

### **3.7 Провирусный ландшафт ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии инфекции**

Результаты исследования показывают высокую представленность вирусных резервуаров в мононуклеарах периферической крови в период острой ВИЧ-инфекции с медианным значением в 26034 копий/10\*6 клеток (95% ДИ: 2373; 96852). Стоит отметить, что провирусная ДНК зачастую представлена дефектными вирусными геномами с медианным значением в 24443 копий/10\*6 клеток (95% ДИ: 2373; 90179), содержащими делеции или

мутации в одном или нескольких генах. Медианное число интактных резервуаров составляло 405 копий/10\*6 клеток (95% ДИ: 0; 7008).

Пример анализа результатов цифровой ПЦР находится на Рисунке 18.

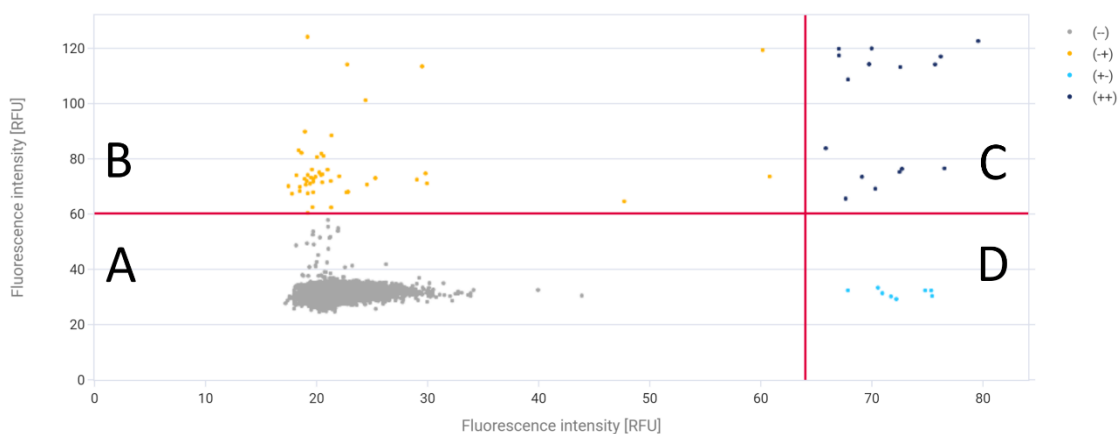


Рисунок 18. Пример анализа результатов проведения цифровой ПЦР: (a) - отрицательные по всем мишеням лунки; (b) - лунки, положительные по мишеням на гены *env* и участок *psi*; (c) - лунки, положительные по всем мишеням (интактные геномы); (d) - лунки, положительные по гену *pol*

Число резервуаров обоих типов превышало аналогичные показатели для других субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 в 1,5 раза. Данный факт интересен в контексте других исследований CRF63\_02A6 ВИЧ. Известно, что

интеграза данного геноварианта проявляет большую активность, чем интегразы субтипов А и В.

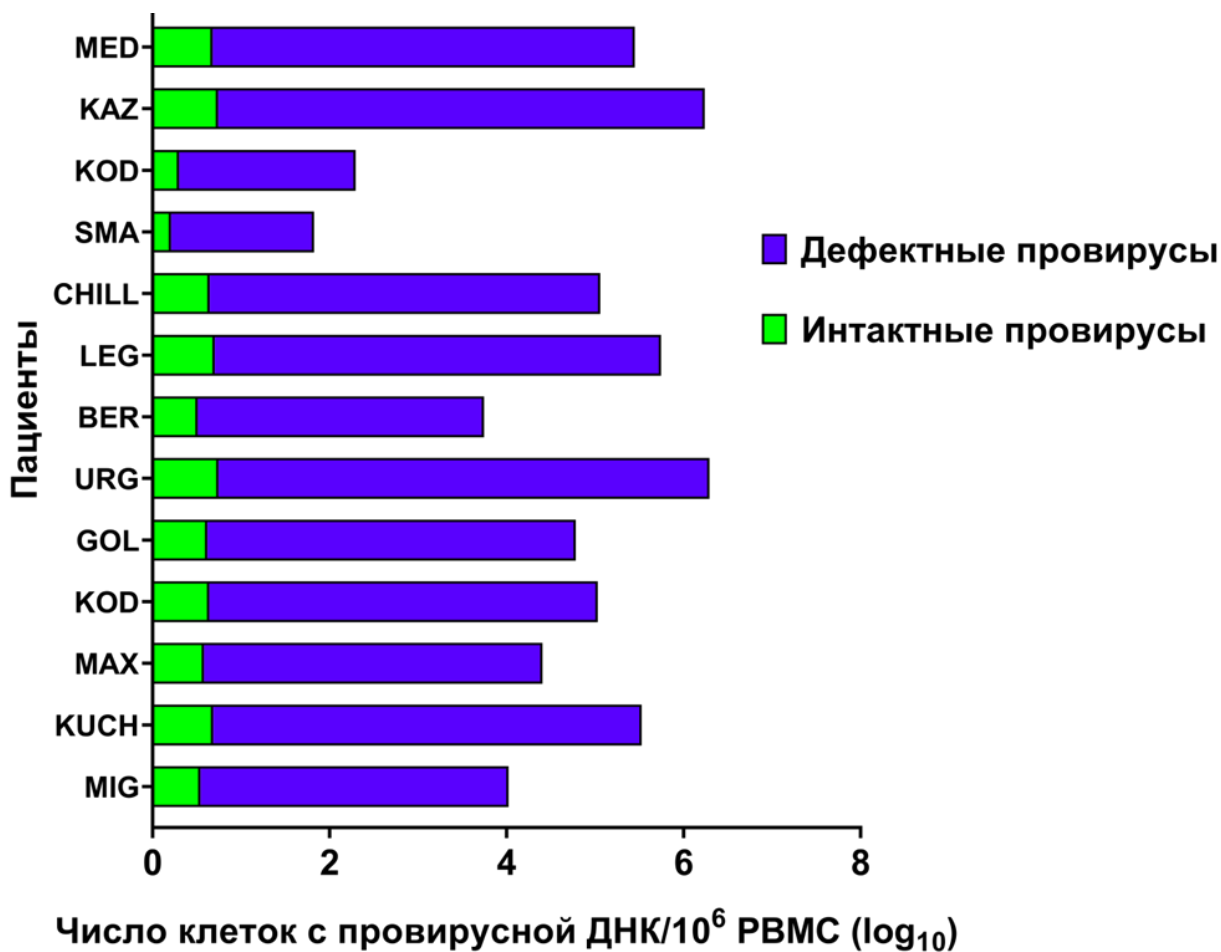


Рисунок 19. Оценка числа клеток, содержащих провирусные геномы ВИЧ, в популяции мононуклеаров периферической крови у ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной CRF63\_02A6 ВИЧ-1

Результаты количественного анализа клеточно-ассоциированной ДНК ВИЧ (провирусных резервуаров, Рисунок 19) демонстрируют выраженную преобладающую долю дефектных провирусных геномов в МПК пациентов. Несмотря на высокую общую нагрузку провирусной ДНК, достигающую 6,2 log<sub>10</sub> копий на 10<sup>6</sup> МПК, структурные нарушения (например, делеции и инверсии) выявлены в >90% исследованных геномов. Данная закономерность согласуется с современными представлениями о раннем формировании

гетерогенного провирусного пула, характеризующегося доминированием нефункциональных геномов, которые, однако, сохраняют способность к частичной транскрипции.

Согласно опубликованным данным, даже дефектные провирусы могут модулировать патогенез ВИЧ-инфекции за счет продукции усеченных вирусных транскриптов, индуцирующих провоспалительные сигнальные пути. Такие клетки, утратившие способность к продуктивной репликации, способствуют поддержанию системного иммунного активационного статуса через стимуляцию Toll-подобных рецепторов и секрецию провоспалительных цитокинов (например, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) [85]. Кроме того, их повышенная миграционная активность, опосредованная изменением экспрессии хемокиновых рецепторов (CCR5, CXCR4), может облегчать диссеминацию вирусного материала в лимфоидные ткани, создавая условия для рециркуляции инфицированных клеток между лимфоидными тканями в различных анатомических локациях (кишечник, лимфоузлы и т.д.).

Интересно, что несмотря на агрессивный фенотип штаммов KOD и SMA, МПК данных пациентов содержат относительно небольшое число резервуаров. Возможно, агрессивная стратегия взаимодействия штаммов KOD и SMA с клеткой-хозяином, приводит либо к снижению миграционной активности, либо к быстрой идентификации резервуаров как инфицированных клеток и их элиминации компетентными иммунными клетками.

### **3.8 Профилирование транскриптомов единичных клеток**

В данном исследовании были секвенированы транскриптомы 13845 единичных клеток от трех ВИЧ-позитивных индивидуумов на острой стадии инфекции. В качестве контроля мы использовали транскриптомные данные МПК 3 здоровых доноров, полученные из исследования, изучающего ремоделинг хроматина при COVID-19 (Рисунок 20) [159]. Оба набора данных были сгенерированы с использованием одного и того же коммерческого

набора для анализа 3'-экспрессии - Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США; кат. № PN-1000128).

Контроль качества секвенирования включал оценку ключевых метрик, сгенерированных Cell Ranger v.8.0.1 в процессе выполнения пайплайна cellranger count и представленных в отчете. Эти метрики включали: количество ридов на клетку, количество детектированных генов на клетку, количество валидных баркодов и UMI, количество UMI на клетку, насыщение секвенирования, показатели Q30 для ридов РНК и показатели Q30 для ридов UMI [179, 180]. Данные секвенирования соответствовали всем стандартным метрикам контроля качества для РНК-секвенирования единичных мононуклеарных клеток. В частности, медианная глубина секвенирования превышала 40 000 ридов на клетку, при этом медианные значения составляли ~2000 генов и >2500 UMI, детектированных на клетку.

После интеграции данных и кластеризации мы аннотировали клеточные популяции (Рисунок 20) путем переноса меток с использованием курируемых маркеров из сопоставимых исследований и референсных баз данных.

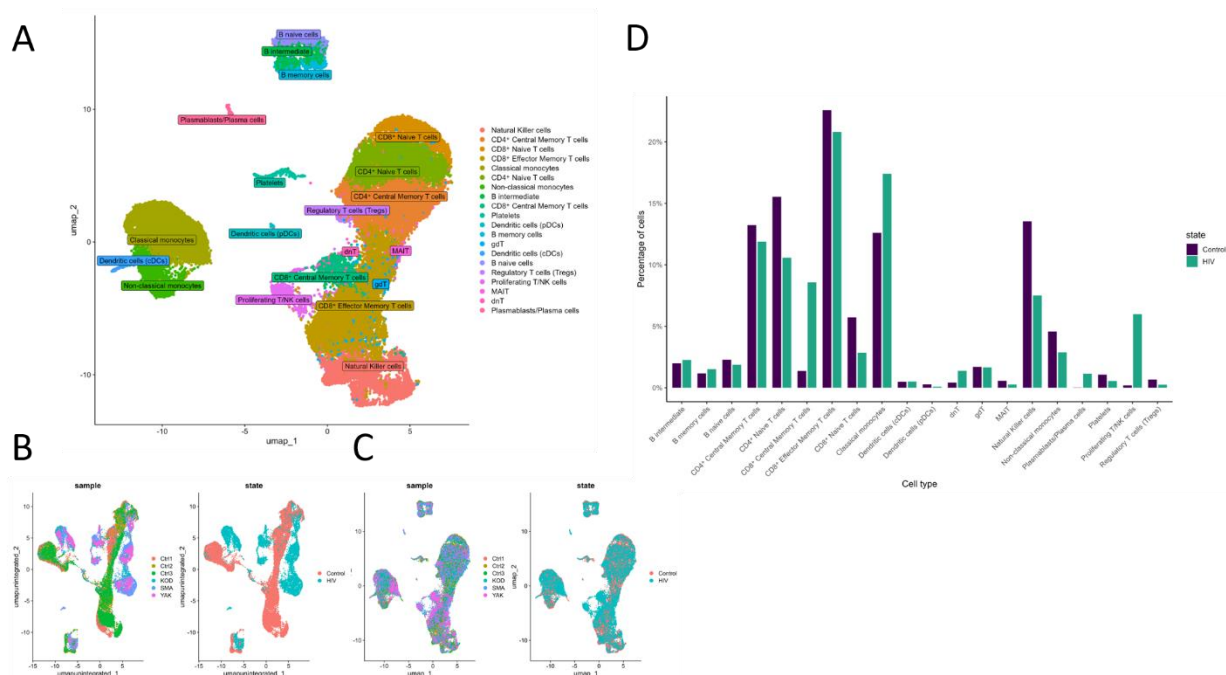


Рисунок 20. Анализ клеточных кластеров: (a) UMAP-график генеральной совокупности клеток после интеграции с уникальным цветовым обозначением для каждого аннотированного кластера; (b) UMAP-визуализация клеток до интеграции с уникальным цветом для каждого пациента; (c) UMAP-визуализация клеток после интеграции с разделением по цветам в зависимости от ВИЧ-статуса (график справа); (d) доля клеток в отдельных популяциях МПК от общего числа проанализированных МПК для ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных людей

Аннотированные кластеры охватывали все основные популяции МПК, включая ключевые противовирусные популяции клеток адаптивного и врожденного иммунитета: субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (наивные, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти), естественные киллеры (НК-клетки), дендритные клетки (ДК), субпопуляции моноцитов (классические, промежуточные, неклассические), В-клетки и регуляторные популяции (регуляторные Т-клетки,  $\gamma\delta$  Т-клетки, double-negative Т-клетки, МАИТ-клетки).

Количественный анализ клеточного состава МПК выявил значительные изменения в процентном соотношении популяций МПК между ВИЧ-позитивной и контрольной когортами (Рисунок 20). Мы наблюдали снижение доли наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, что согласуется с антиген-зависимой дифференцировкой и потенциальными прямыми цитопатическими эффектами вируса на CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Это согласуется с высокими уровнями вирусной нагрузки в плазме ( $>10^6$  копий РНК ВИЧ/мл), измеренными у всех пациентов из ВИЧ-позитивной когорты. Одновременно мы отметили увеличение доли эффекторных Т-клеток памяти CD8<sup>+</sup> и естественных киллеров (НК-клеток), что указывает на активный противовирусный цитотоксический ответ. Примечательно, что мы обнаружили увеличение доли пролиферирующих Т/НК-клеток и значительное снижение доли регуляторных Т-клеток (Treg) и

слизисто-ассоциированных инвариантных Т-клеток (MAIT-клеток), что свидетельствует о состоянии генерализованной иммунной активации.

Для характеристики общего транскриптомного профиля МПК мы провели pseudo-bulk RNA анализ дифференциальной экспрессии (Рисунок 21).

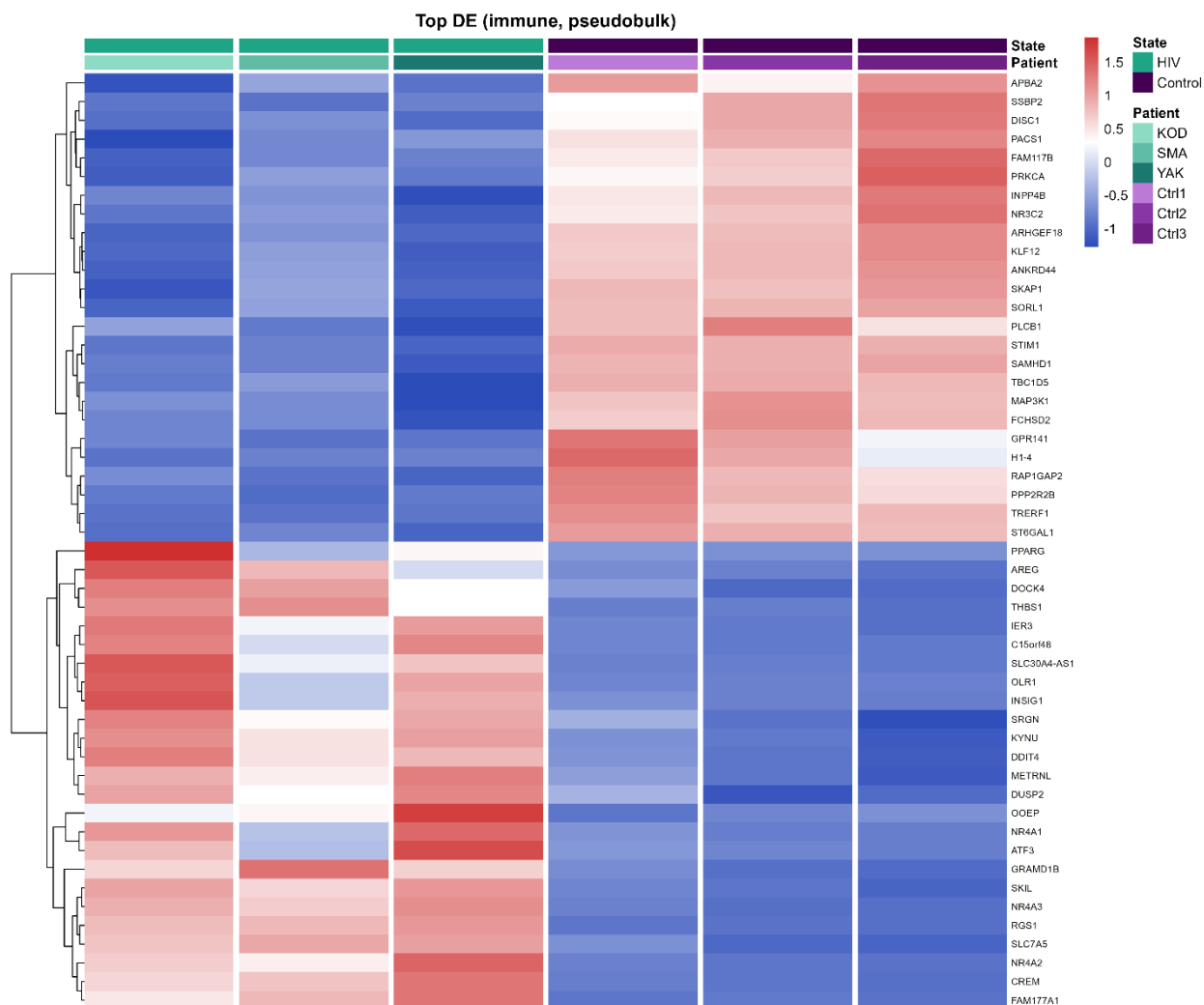


Рисунок 21. Тепловая карта топ-50 дифференциально экспрессирующихся генов (DEG) между ВИЧ-положительными и ВИЧ-негативными пациентами

Pseudo-bulk RNA анализ ВИЧ-позитивных образцов выявил повышенную регуляцию генов, связанных с иммунной активацией (*NR4A1*, *NR4A2*, *NR4A3*), негативной регуляцией сигналинга (*DUSP1*, *DUSP2*, *RGS1*), провоспалительными ответами (*THBS1*, *SRGN*, *OLR1*) и клеточным стрессом

(*ATF3*, *IER3*). Данный транскрипционный профиль указывает на дисрегуляцию клеточной передачи сигналов и развитие хронического воспаления, что характерно для ВИЧ-инфекции.

Среди генов со сниженной экспрессией мы идентифицировали гены, регулирующие организацию цитоскелета и клеточную миграцию (*ARHGEF2*, *ARHGEF18*), G-белковый и пуринергический рецепторный сигналинг (*P2RY8*, *GPR141*), а также метаболизм сфинголипидов (*SMPD1*). Примечательно, что мы также наблюдали супрессию этих регуляторных молекул наряду со сниженной экспрессией фактора транскрипции *PPARG*. Этот факт указывает на перестройку динамики цитоскелета и метаболизма сфинголипидов в мононуклеарах периферической крови на острой стадии ВИЧ-инфекции. Учитывая, что *PPARG* является ключевым регулятором противовоспалительных программ и липидного гомеостаза, его подавление вместе с нарушением пуринергического сигналинга может способствовать поддержанию провоспалительного фенотипа и снижению миграционных способностей клеток, наблюдаемых при острой стадии ВИЧ-инфекции.

### **3.9 CD4+ Т-клетки центральной памяти (CD4+ T<sub>cm</sub>)**

При ВИЧ-инфекции T<sub>cm</sub>-клетки частично компенсируют истощение эффекторных CD4+ Т-клеток за счет пролиферации, помогая поддерживать пул CD4+ Т-лимфоцитов [181]. Однако их долгоживущий характер и пролиферативный потенциал также делают их ключевым клеточным и латентным резервуаром для ВИЧ, способствуя персистенции вируса во время антиретровирусной терапии [182]. Во время острой ВИЧ-инфекции T<sub>cm</sub>-клетки представляют собой первичную мишень для вируса из-за высокой плотности экспрессии ко-рецептора *CCR5* на их поверхности [183].

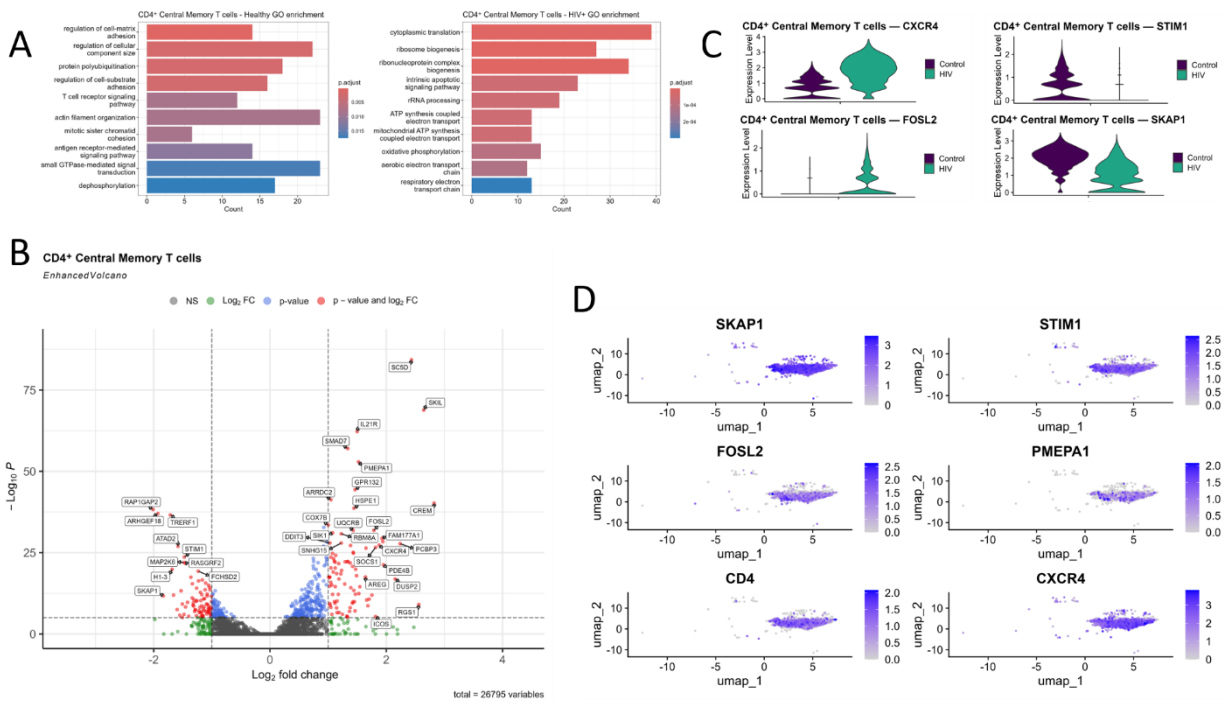


Рисунок 22. Транскриптомный профиль CD4<sup>+</sup> Тсм-клеток. (а) Анализ обогащения Gene Ontology (GO) для контрольной (слева) и ВИЧ-положительной (справа) когорт; (б) Тепловая карта значительно дисрегулируемых генов в Тсм-клетках ВИЧ-положительных пациентов по сравнению с контролем; (с) Уровни экспрессии ключевых генов в сравниваемых когортах; (д) Уровни экспрессии ключевых генов в популяции ВИЧ-положительных Тсм-клеток.

Сравнительный анализ обогащения Gene Ontology (GO) (Рисунок 22А) в CD4<sup>+</sup> Тсм-клетках показал, что у здоровых доноров преобладают биологические процессы, связанные с адгезией клеток, организацией цитоскелета и передачей сигналов (регуляция клеточно-матриксной адгезии, организация актиновых филаментов, путь передачи сигнала Т-клеточного рецептора), что, вероятно, отражает их готовность к миграции, межклеточным взаимодействиям и иммунному надзору. В отличие от этого, у ВИЧ-положительных пациентов наблюдалась повышенная регуляция генов, участвующих в метаболических процессах (цитоплазматическая трансляция, окислительное фосфорилирование, синтез АТФ, электрон-транспортная цепь),

что указывает на активированное состояние клеток с повышенными энергетическими потребностями.

CD4<sup>+</sup> Тсм-клетки продемонстрировали статистически значимое увеличение экспрессии генов, включая *IL21R*, *ICOS*, *SOCS1*, *CXCR4* и *RGS1* (участвующих в иммунном ответе и передаче сигнала в Т-клетках); *SKIL*, *SMAD7* и *PMEPA1* (связанных с путем передачи сигнала TGF- $\beta$  и его регуляцией); *DDIT3*, *FOSL2* и *SIK1* (ассоциированных с индукцией клеточного стресса и апоптозом); *DUSP2*, *PDE4B*, *CREM*, *RBM8A*, *GPR132* и *FAM177A1* (участников различных сигнальных путей — фосфатаз, фосфодиэстераз, факторов транскрипции и других белков); *COX7B*, *UQRCB* и *HSPE1* (участвующих в энергетическом метаболизме и генерации АТФ); *SC5D* (биосинтез холестерина); *AREG* (регенерация и пролиферация эпителиальных клеток); *PCBP3* (стабилизация мРНК); *ARRDC2* (слабо охарактеризованные функции), наряду со сниженной экспрессией генов *RAP1GAP2*, *TRERF1*, *ARHGEF18*, *ATAD2*, *STIM1*, *MAP2K6*, *RASGRF2*, *H1-3*, *SKAP1* и *FCHSD2* (Рисунок 22).

Мы сосредоточились на нескольких ключевых дисрегулируемых генах, потенциально значимых для патогенеза ВИЧ-инфекции (Рисунок 22). Повышенная регуляция негативных регуляторов пути TGF- $\beta$  (*SMAD7*, *PMEPA1*, *SKIL*) может иметь двойную роль в инфекционном процессе. Хотя подавление пути TGF- $\beta$  посредством продуктов этих генов может снижать количество активированных CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток, восприимчивых к ВИЧ-1 [184], это также ослабляет TGF- $\beta$ -опосредованный апоптоз инфицированных клеток, потенциально способствуя поддержанию виремии. Повышенная экспрессия *CXCR4* и *FOSL2* может дополнительно способствовать персистенции вируса. Существование дуально-тропных (R5/X4) штаммов (YAK, SMA) расширяет спектр клеток-мишеней за счет использования ко-рецептора CXCR4 [185], в то время как гиперэкспрессия *FOSL2*, негативного регулятора дифференцировки Th17, может повышать уязвимость слизистых

поверхностей к оппортунистическим инфекциям за счет нарушения экспрессии генов мукозальной защиты [186]. Сниженная экспрессия *STIM1* нарушает кальциевую сигнализацию и ослабляет антигенный ответ [187]. Наконец, снижение экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией (*SKAP1*, *RASGRF2*), может ограничивать клоновую экспансию CD4+ Т-клеток [188, 189], истощая пул лимфоцитов и усугубляя иммунодефицит.

### 3.10 CD8+ Т-клетки центральной памяти (CD8+ Tcm)

Во время острой фазы ВИЧ-1-инфекции CD8+ Tcm-клетки играют критическую роль в контроле вирусемии. Присутствие ВИЧ запускает быстрое расширение разнообразия и количества CD8+ Т-клеток, включая предшественники CD8+ Tcm. Уже через 3-7 дней после инфицирования наблюдается увеличение количества стволовых Т-клеток памяти (Tscm) в 2,7 раза [190]. Примечательно, что более ранняя активация наивных CD8+ Т-клеток ассоциирована с более низкой установочной точкой вирусемии и, вероятно, с меньшим будущим провирусным резервуаром [191].

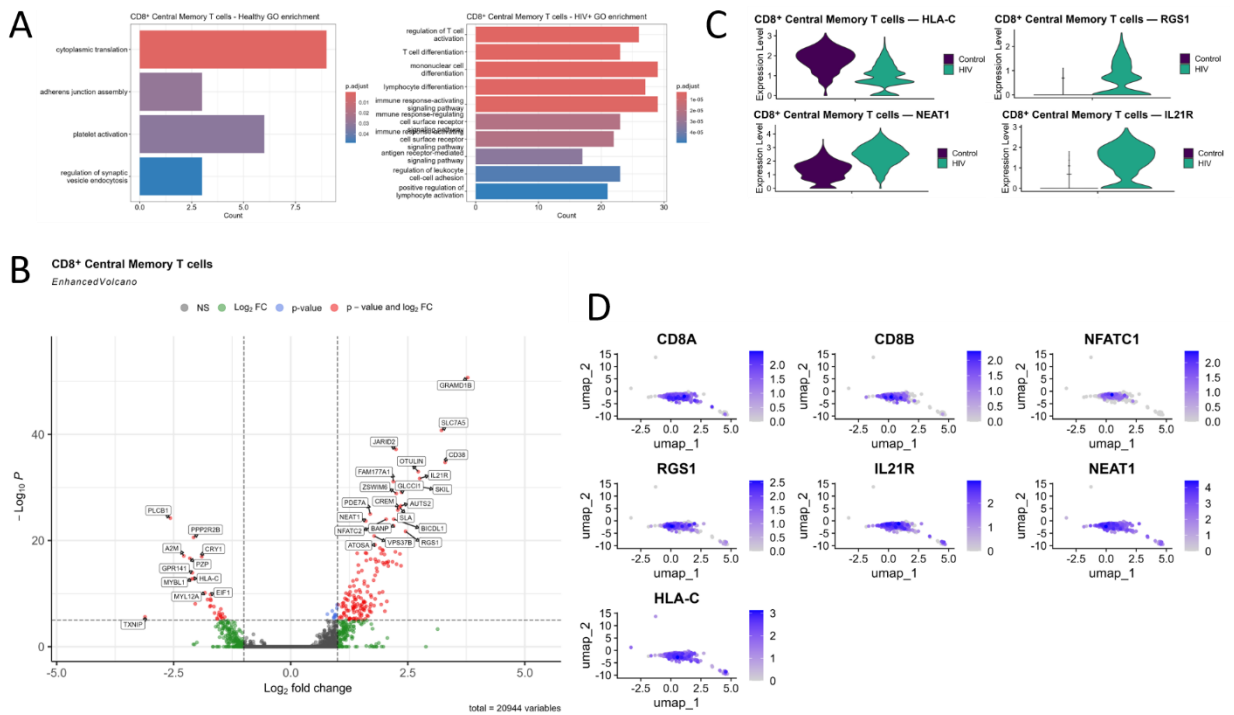


Рисунок 23. Характеристика транскриптомного профиля CD8+ Tcm: (a) Аннотация Gene Ontology (GO) экспрессируемых генов в контрольной и исследуемой когортах; (b) Гены с высокой и низкой экспрессией в ВИЧ-положительной когорте, показывающие статистически значимую дифференциальную экспрессию по сравнению с контрольной когортой; (c) Уровни экспрессии наиболее значимых генов в ВИЧ-положительной и контрольной когортах; (d) Уровни экспрессии наиболее значимых генов внутри популяции CD8+ Т-клеток центральной памяти у ВИЧ-положительных индивидуумов.

Сравнительный анализ аннотации GO показал, что у здоровых индивидуумов преобладают пути, связанные с фундаментальными клеточными процессами, такими как цитоплазматическая трансляция и сборка адгезивных контактов, что отражает поддержание гомеостаза в нормальных условиях. В отличие от этого, острая фаза ВИЧ-инфекции характеризуется выраженным смещением в сторону адаптивного иммунного ответа, о чем свидетельствует значительное обогащение путей, регулирующих активацию и дифференцировку Т-клеток, а также сигналинг, опосредованный поверхностными иммунными рецепторами (Рисунок 4А).

CD8+ Тcm-клетки ВИЧ-положительных индивидуумов продемонстрировали повышенную экспрессию нескольких генов по сравнению с контрольной когортой исследования (Рисунок 23), включая: *CD38*, *IL21R*, *NFATC2*, *RGS1* и *SLA* (регуляция иммунного ответа и передачи сигнала в Т-клетках); *JARID2*, *AUTS2*, *BANP*, *ZSWIM6* и *ATOSA* (эпигенетическая регуляция и контроль транскрипции); *SLC7A5*, *PDE7A*, *CREM*, *SKIL*, *OTULIN* и *FAM177A1* (внутриклеточная передача сигнала); *NEAT1* (посттранскрипционная регуляция); *GLCC11* (регуляция апоптоза); *GRAMD1B*, *BICDL1* и *VPS37B* (внутриклеточный транспорт). В список генов со сниженной экспрессией относительно контрольной группы вошли: *PLCB1*, *PPP2R2B*, *TXNIP* и *GPR141* (регуляция передачи сигнала); *MYBL1* (контроль клеточного цикла и репликации); *HLA-C* (презентация антигена через МНС-I);

*CRY1* (регуляция циркадных ритмов); *A2M* и *PZP* (связывание протеаз и цитокинов); *MYL12A* (клеточный цитоскелет).

Среди генов, связанных с цитокиновой сигнализацией, повышенная экспрессия *IL21R* (Рисунок 23) демонстрирует готовность CD8<sup>+</sup> Т-клеток реагировать на IL-21, который поддерживает их цитотоксическую функцию и предотвращает истощение [192]. Повышенная регуляция *NEAT1* (Рисунок 4С, Рисунок 4D), длинной некодирующей РНК, индуцируется во время ВИЧ-инфекции и проявляет противовирусную активность, способствуя ядерной ретенции вирусных транскриптов; ее нокдаун усиливает репликацию ВИЧ [193]. Мы также отметили повышенную экспрессию гена *RGS1* (Рисунок 4С, Рисунок 4D), который отвечает за пролиферацию Т-лимфоцитов и инфильтрацию тканей [194].

Среди генов со сниженной экспрессией особый интерес представляет *HLA-C* (Рисунок 23), поскольку, в отличие от других белков МНС-I (HLA-A, HLA-B), продукт этого гена обычно устойчив к Nef-опосредованной деградации из-за отсутствия специфического тирозинового остатка [195]; этот факт может указывать на специфические адаптации российских вариантов ВИЧ-1, направленные на ускользание от иммунного ответа.

### **3.11 CD8<sup>+</sup> эффекторные Т-клетки памяти (CD8<sup>+</sup> Tem)**

Во время острой фазы ВИЧ-инфекции эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти (CD8<sup>+</sup> Tem) активно пролиферируют и экспрессируют гены, участвующие в формировании цитотоксических гранул с функцией лизиса инфицированных клеток [196]. Однако даже на этой ранней стадии их сильный провоспалительный цитокиновый профиль может вызывать гиперактивацию, потенциально приводящую к преждевременному истощению и дисфункции.

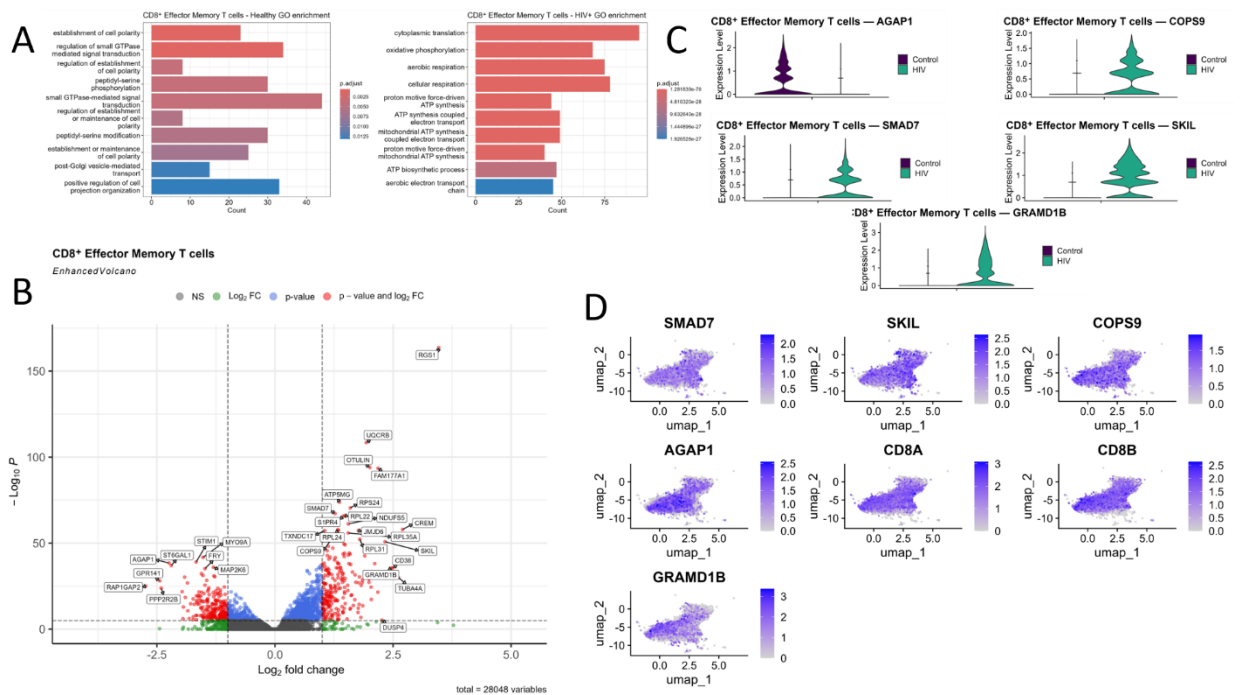


Рисунок 24. Транскриптомный профиль CD8<sup>+</sup> Тем-клеток: (а) Анализ обогащения GO для контрольной и ВИЧ-положительной когорты; (б) Гены с высокой и низкой экспрессией в ВИЧ-положительной когорте, показывающие статистически значимую дифференциальную экспрессию по сравнению с контрольной когортой; (с) Уровни экспрессии ключевых генов в сравниваемых когортах; (д) Уровни экспрессии ключевых генов внутри популяции ВИЧ-положительных Тем-клеток.

Анализ экспрессии генов CD8<sup>+</sup> Тем-клеток в ВИЧ-положительной когорте с помощью аннотации GO выявил преобладание генов, участвующих в метаболических процессах, таких как цитоплазматическая трансляция и окислительное фосфорилирование. В отличие от этого, клетки здоровых доноров демонстрировали преобладание сигнальных путей, связанных с регуляцией клеточной полярности, модификацией белков и GTPаз-зависимой передачей сигнала (Рисунок 24).

Наиболее значительно повышенную регуляцию в CD8<sup>+</sup> Тем-клетках ВИЧ-положительных пациентов показали гены: *RGS1*, *CD38*, *DUSP4*, *S1PR4*, *OTULIN*, *SMAD7* и *FAM177A1* (регуляция иммунного ответа и сигналинга);

*UQCRB*, *ATP5MG*, *NDUFS5* и *TXNDC17* (генерация АТФ и другие митохондриальные функции); *RPS24*, *RPL22*, *RPL24*, *RPL31* и *RPL35A* (биосинтез белка, рибосомные гены); *CREM* и *JMJD6* (транскрипционная регуляция); *TUBA4A* (структурный компонент микротрубочек); *GRAMD1B* (транспорт холестерина); и *COPS9* (процессинг белков). Среди генов со сниженной экспрессией в CD8+ Тем ВИЧ-положительных индивидуумов были: *STIM1*, *RAP1GAP2*, *PPP2R2B*, *MAP2K6* и *GPR141* (регуляция внутриклеточной передачи сигнала, иммунной активации и апоптоза); *MYO9A* (организация цитоскелета и миграция); *ST6GAL1* (модификация белков); *AGAP1* (внутриклеточный транспорт и ремоделирование цитоскелета); и *FRY* (деление клеток и морфогенез).

Особый интерес представляет экспрессия регуляторов цитокиновой сигнализации *SMAD7* и *SKIL*. Это супрессоры TGF- $\beta$ , который ассоциирован с повышенной плотностью рецепторов *CXCR3*, *CCR5* и *CCR7* на CD4+ Т-клетках памяти [184]. Также была отмечена повышенная экспрессия гена *COPS9*, ассоциированного с прогрессированием ВИЧ-инфекции и являющегося компонентом сигнального комплекса COP9 [197]. Гиперэкспрессия компонентов этой сигнальной системы поддерживает репликацию ВИЧ-1 в инфицированных клетках, способствуя проникновению вирионов, участвуя в активации Т-клеток и создавая сигнальную среду, благоприятную для репликации ВИЧ-1 [198]. Однако не все гены со статистически значимой повышенной регуляцией напрямую связаны с ВИЧ-инфекцией, согласно имеющимся данным. Например, ген *GRAMD1B* кодирует трансмембранный белок Aster-B, который функционирует как ключевой регулятор липидного гомеостаза, опосредуя невезикулярный транспорт холестерина из плазматической мембраны в эндоплазматический ретикулум. Согласно недавнему исследованию, *GRAMD1B* также играет роль в модуляции аутофагии и накоплении фосфорилированного тау-белка, связывая его функцию с патогенезом нейродегенеративных заболеваний [199].

Еще один ген со сниженной экспрессией, представляющий интерес - *AGAP1*. Он кодирует белок из семейства Arf GAP, который активирует GTPазы ADP-рибозилирующего фактора (Arf), играющие ключевую роль в мембранном трафике и динамике цитоскелета [200]. *AGAP1* ассоциирован с лизосомальным транспортом, что может способствовать деградации вирусных компонентов, таких как белки, инкапсулированные в вирион, после слияния вируса с клеткой. Данная гипотеза косвенно подтверждается одним исследованием, наблюдавшим повышенную экспрессию *AGAP1* наряду с другими генами мембранного трафика в НК-клетках [201].

### 3.12 Неклассические моноциты (CD14+CD16++)

Во время острой ВИЧ-инфекции неклассические моноциты (CD14+CD16++) переходят в активированное состояние. Эта активация запускает продукцию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , и увеличивает экспрессию генов, контролирующих миграцию. Эти моноциты затем могут преодолевать гемато-энцефалический барьер и способствовать формированию провирусных резервуаров в тканях центральной нервной системы по модели «троянского коня» [202].

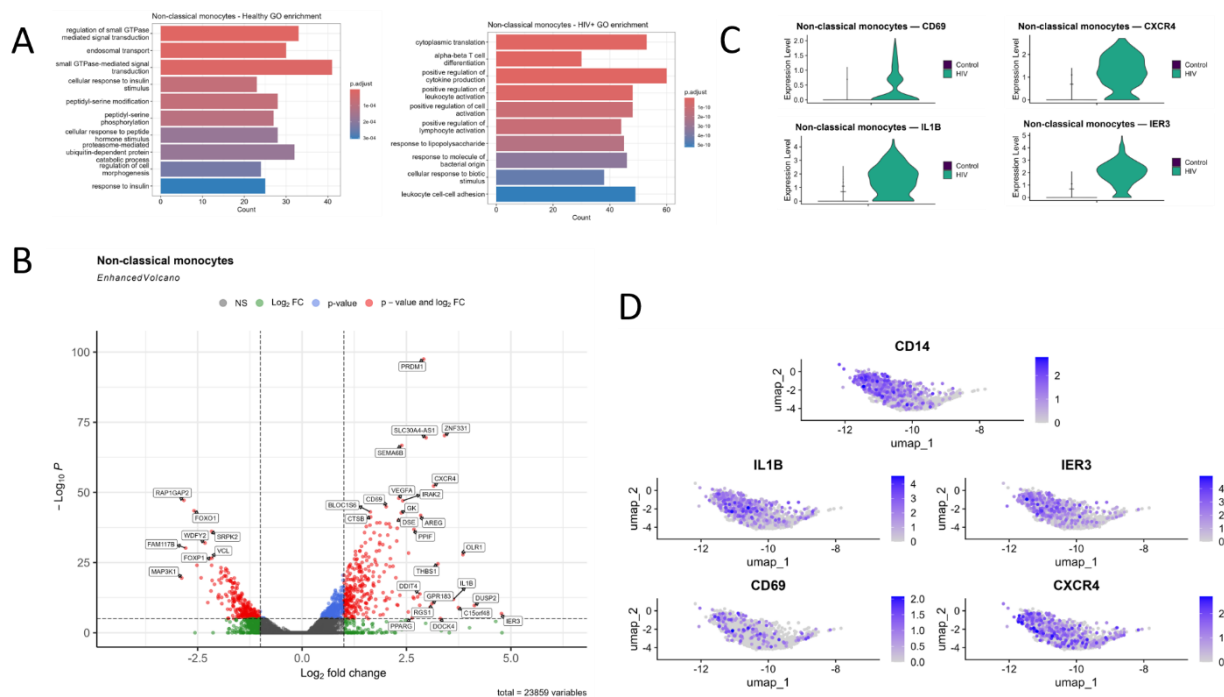


Рисунок 25. Транскрипционный профиль неклассических моноцитов (CD14+CD16<sup>++</sup>): (a) Анализ обогащения GO для контрольной и ВИЧ-позитивной когорт; (b) Тепловая карта значительно генов со статистически значимыми различиями в экспрессии между когортами; (c) Уровни экспрессии ключевых генов в сравниваемых когортах; (d) Уровни экспрессии ключевых генов в популяции ВИЧ-позитивных моноцитов.

Транскрипционный профиль неклассических моноцитов был значительным образом перепрограммирован во время острой ВИЧ-инфекции по сравнению с условно здоровым состоянием (Рисунок 25). У ВИЧ-негативных доноров доминируют пути, связанные с базовым клеточным гомеостазом, включая регуляцию малых ГТРАЗ, эндосомальный транспорт и ответ на инсулиновый стимул, что отражает их роль в поддержании метаболического баланса и внутриклеточного трафика. В отличие от этого, ВИЧ-инфекция вызывает резкий сдвиг в сторону иммуно-активационного фенотипа, характеризующегося значительным обогащением путей позитивной регуляции активации лимфоцитов, продукции цитокинов и адгезии лейкоцитов.

Неклассические моноциты продемонстрировали статистически значимое увеличение экспрессии следующих генов у ВИЧ-позитивных индивидуумов по сравнению с контрольной когортой (Рисунок 25): *IL1B*, *IRAK2*, *IER3*, *DUSP2*, *AREG*, *RGS1* (воспалительный ответ и цитокиновый сигналинг); *CXCR4*, *GPR183* (миграция, хемотаксис и клеточный хоуминг); *DDIT4*, *THBS1*, *PPIF*, *OLR1*, *C15orf48* (сигнальные пути, ассоциированные с апоптозом, клеточным стрессом и ответом на гипоксию); *PRDM1*, *CD69* (активация и дифференцировка клеток); *VEGFA* (ангиогенез, ассоциация с саркомой Капоши и нефропатией); *GK*, *PPARG* (метаболизм); *BLOC1S6*, *DOCK4* (внутриклеточный трафик и организация органелл); *DSE*, *SEMA6B* (синтез компонентов внеклеточного матрикса и адгезия); *CTSB* (деградация

белков в лизосомах); *ZNF331*, *SLC30A4-AS1* (регуляция транскрипции и сплайсинга РНК). Экспрессия нескольких генов в этой клеточной популяции была снижена (Рисунок 25), включая: *RAP1GAP2*, *MAP3K1*, *VCL* (регуляция внутриклеточной передачи сигнала); *FOXO1*, *FOXP1*, *FAM177B* (регуляция транскрипции); *WDFY2* (внутриклеточный транспорт и инсулиновый сигналинг); *SPRL2* (неизвестная функция).

Повышенная экспрессия *CD69*, *CXCR4*, *IL1B* и *IER3* в неклассических моноцитах отражает их активированное состояние и усиленный провоспалительный потенциал. *CD69* служит ранним маркером активации, *CXCR4* опосредует хемотаксис и миграционную активность, потенциально облегчая проникновение ВИЧ, а *IL1B* и *IER3* участвуют в регуляции NF-κB-опосредованного воспалительного ответа и резистентности к апоптозу [203].

### **3.13 Натуральные киллеры (НК-клетки)**

НК-клетки активно взаимодействуют с другими иммунными клетками, такими как ДК, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, посредством прямых клеточных контактов и секреции цитокинов (например, TNF-α, IFN-γ) во время вирусных инфекций. Однако при ВИЧ-инфекции межклеточная коммуникация между НК-клетками и ДК может нарушаться, что негативно сказывается на функциональности как В-, так и Т-лимфоцитов [204]. Основная функция НК-клеток — цитотоксичность, опосредованная экспрессией таких генов, как *PRF1*, *GZMB*, *CCL3* и *CCL4* [5].

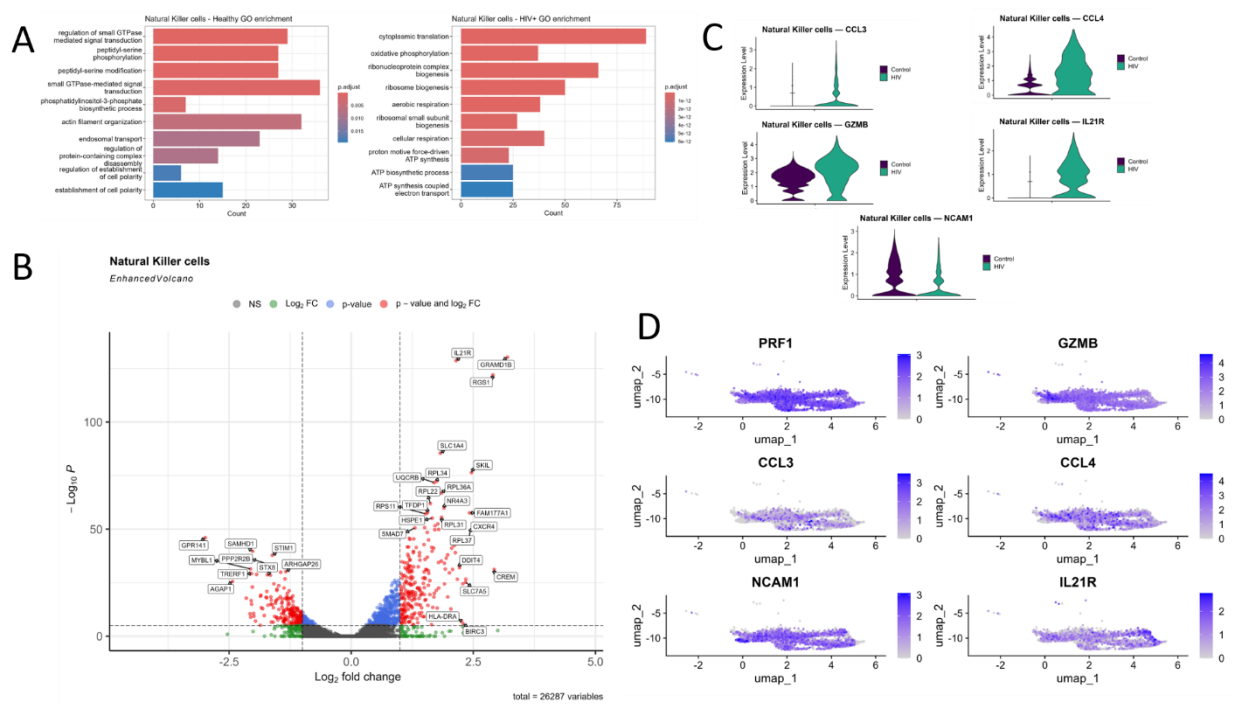


Рисунок 26. Транскриптомный профиль НК-клеток: (а) Анализ обогащения GO для контрольной и ВИЧ-позитивной когорт; (б) Volcano-lot для статистически-значимо дисрегулированных генов; (с) Уровни экспрессии ключевых генов в сравниваемых когортах; (д) Уровни экспрессии ключевых генов в популяции ВИЧ-позитивных НК-клеток.

Транскриптомный профиль НК-клеток сместился от регуляции цитоскелета и сигналинга в сторону энергетического метаболизма во время острой ВИЧ-инфекции (Рисунок 26). У ВИЧ-негативных индивидуумов доминирующими клеточными процессами являются GTPаз-зависимая передача сигнала, фосфорилирование пептидил-серина и организация актиновых филаментов, которые поддерживают механизмы миграции и цитотоксичности. В отличие от этого, ВИЧ-инфекция приводит к активации путей окислительного фосфорилирования, аэробного дыхания и митохондриальной синтеза АТФ, сопровождаясь усилением биосинтеза пуриновых нуклеотидов.

НК-клетки ВИЧ-положительных индивидуумов показали повышенную экспрессию нескольких генов (Рисунок 26), включая: *IL21R*, *RGS1*, *CXCR4*, *NR4A3* и *BIRC3* (активация и передача сигнала в Т-клетках); *SLC7A5*, *SLC1A4*, *UQCRB*, *GRAMD1B* и *HSPE1* (метаболизм, транспорт аминокислот и холестерина, а также фолдинг белков); *RPL22*, *RPL31*, *RPL34*, *RPL36A*, *RPL37* и *RPS11* (рибосомные белки); *SKIL* и *SMAD7* (регуляция пути передачи сигнала TGF-β); *FAM177A1*, *CREM* и *TFDP1* (транскрипционная и эпигенетическая регуляция); *HLA-DRA* (презентация антигена через МНС-II); и *DDIT4* (регуляция апоптоза и ингибирование mTOR-сигналинга). Экспрессия нескольких генов в этой исследуемой группе была снижена по сравнению с контролем (Рисунок 26): *STIM1*, *PPP2R2B* и *GPR141* (регуляция внутриклеточной передачи сигнала и активации); *STX8*, *AGAP1* и *ARHGAP26* (внутриклеточная передача сигнала, транспорт и модуляция динамики цитоскелета); *SAMHD1* (метаболизм нуклеотидов и ингибирование репликации ВИЧ-1); и *TRERF1* (транскрипционная регуляция и контроль клеточного цикла).

Повышенная экспрессия генов *CCL3*, *CCL4*, *GZMB* и *IL21R* в НК-клетках ВИЧ-положительных пациентов отражает их активированное состояние, характеризующееся усиленной активностью хемотаксиса клеток (*CCL3*, *CCL4*), повышенным цитотоксическим потенциалом (*GZMB*) и увеличенной реактивностью к иммуномодулирующим сигналам (*IL21R*). Одновременно сниженная экспрессия *NCAM1* предполагает потенциальные нарушения процессов клеточной миграции и адгезии, что может негативно влиять на функциональность НК-клеток.

### **3.14 Перепрограммирование сигнальных каскадов в мононуклеарных клетках на острой стадии ВИЧ-инфекции**

ВИЧ-инфекция индуцирует значительную перестройку межклеточной коммуникации. Эти изменения отражаются в общем количестве активных

сигнальных путей (Рисунок 27), уровнях активности ключевых путей (Рисунок 8B) и разнообразии сигналинга между субпопуляциями МПК (Рисунок 27).

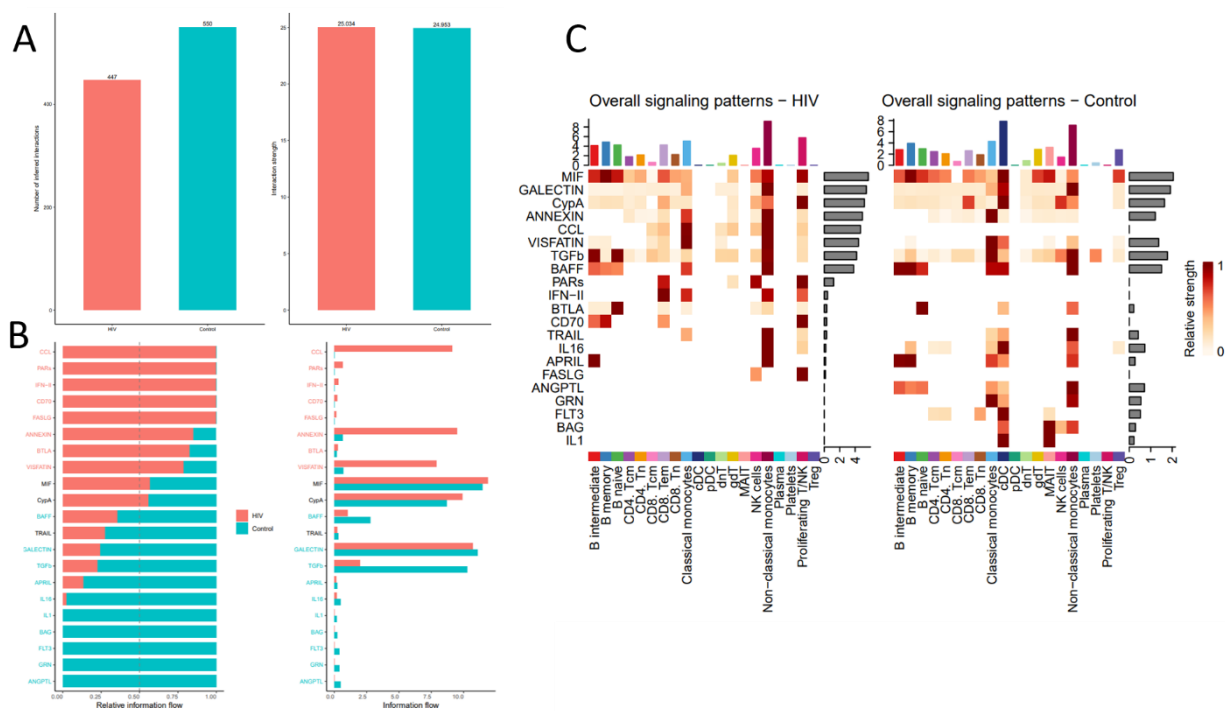


Рисунок 27. Измененный сигналинг в МПК во время острой ВИЧ-инфекции: (а) Общее количество и сила взаимодействий для сигнальных путей; (б) Уровни активности ключевых сигнальных путей; (с) Количество активных сигнальных паттернов для различных популяций МПК у ВИЧ-позитивных (слева) и ВИЧ-негативных (справа) индивидуумов.

МПК индивидуумов с острой ВИЧ-инфекцией показали уменьшение количества активных сигнальных путей, хотя сила взаимодействий внутри оставшихся путей, измеренная по количеству лиганд-рецепторных пар, сохранялась (Рисунок 27). Можно заметить и качественные различия (Рисунок 27). В частности, сигнальные пути, такие как CCL, PARs, IFN-II, CD70, FASLG, ANNEXIN, BTLA и VISFATIN, демонстрировали более высокую активность у ВИЧ-позитивных субъектов, тогда как каскады, включающие BAFF, TRAIL, GALECTIN, TGFb, APRIL, IL16, IL1, BAG, FLT3, GRN и ANGPTL, были более выражены в контрольной когорте. Примечательно, что

пути, такие как CCL (хемотаксис лейкоцитов), PARs (клеточный ответ на воспаление), IFN-II (активация макрофагов, противовирусный ответ), CD70 (пролиферация и дифференцировка Т- и В-клеток) и FASLG (индукция апоптоза), были почти неактивны у ВИЧ-негативных индивидуумов. И наоборот, некоторые сигнальные пути, такие как IL1 (провоспалительная функция), BAG (регуляция апоптоза и аутофагии), FLT3 (пролиферация и дифференцировка дендритных клеток), GRN (регуляция воспаления тканей) и ANGPTL (метаболизм липидов), не показали детектируемой активности у ВИЧ-позитивных индивидуумов.

Количество сигнальных путей, задействованных отдельными популяциями МПК, также претерпевает изменения (Рисунок 27). CD4+ Т-клетки (как CD4+ Tcm, так и CD4+ Tem) демонстрируют сниженную силу взаимодействий в путях MIF и ANNEXIN, в то время как пути IL16 и FLT3 становятся полностью неактивными. CD8+ Т-клетки снижают свою активность в пути CcrA, но активнее вовлекаются в пути PARs, IFN-II, BTLA и CD70. Наиболее выраженное снижение сигнальной активности наблюдается у классических дендритных клеток (cDCs), которые теряют активность в нескольких сигнальных каскадах. В отличие от этого, неклассические моноциты сохраняют активность в широком спектре путей. Однако они прекращают сигнализацию через пути IL1, GRN и ANGPTL, одновременно приобретая активность в каскаде CCL и увеличивая силу взаимодействий в других ранее активных путях.

Важная роль неклассических моноцитов в межклеточной коммуникации была дополнительно подтверждена анализом количества входящих и исходящих сигналов на популяцию (Рисунок 28).

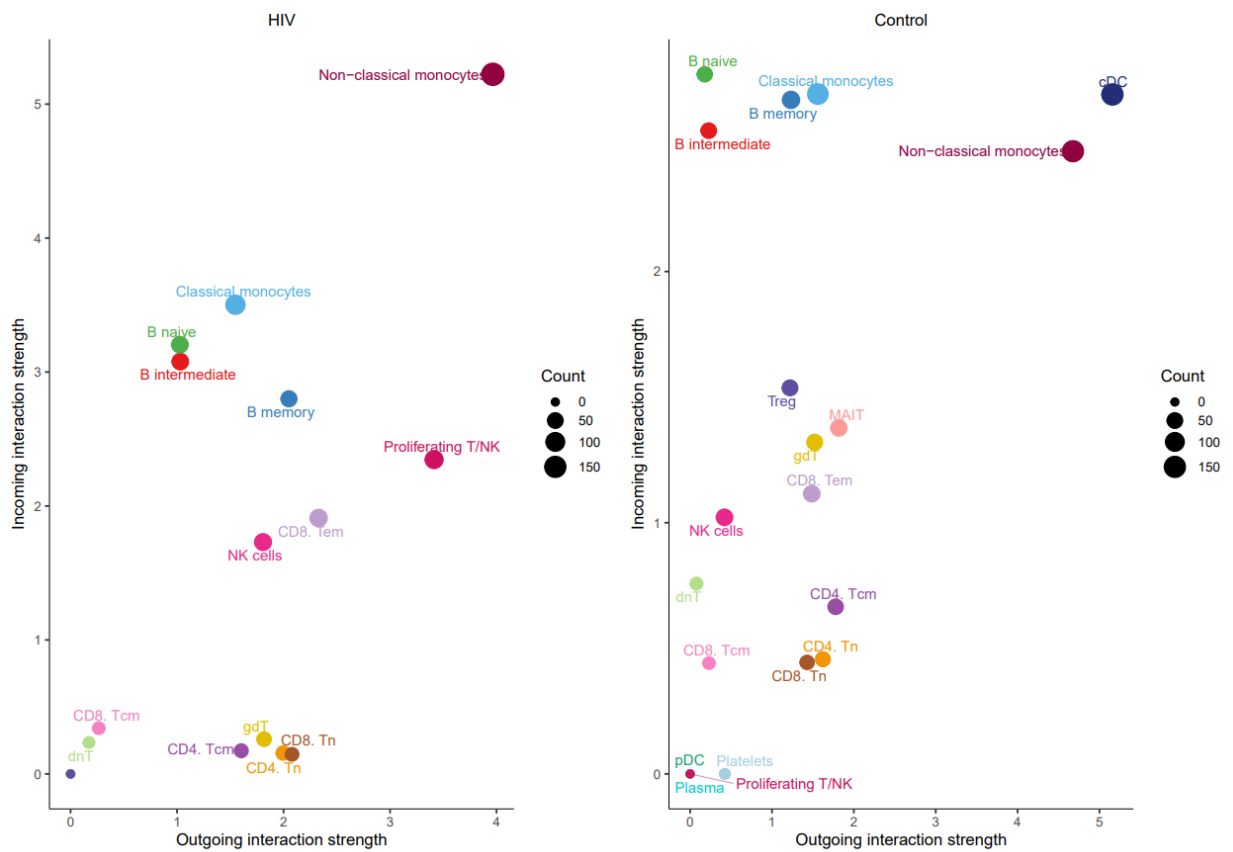


Рисунок 28. Количество исходящих (ось x) и входящих (ось y) сигналов для популяций МПК от ВИЧ-положительных (слева) и ВИЧ-негативных (справа) индивидуумов.

Неклассические моноциты оказываются наиболее активными клетками как в отправке, так и в получении сигналов. Повышенную сигнальную активность также продемонстрировали НК-клетки (Рисунок 29).

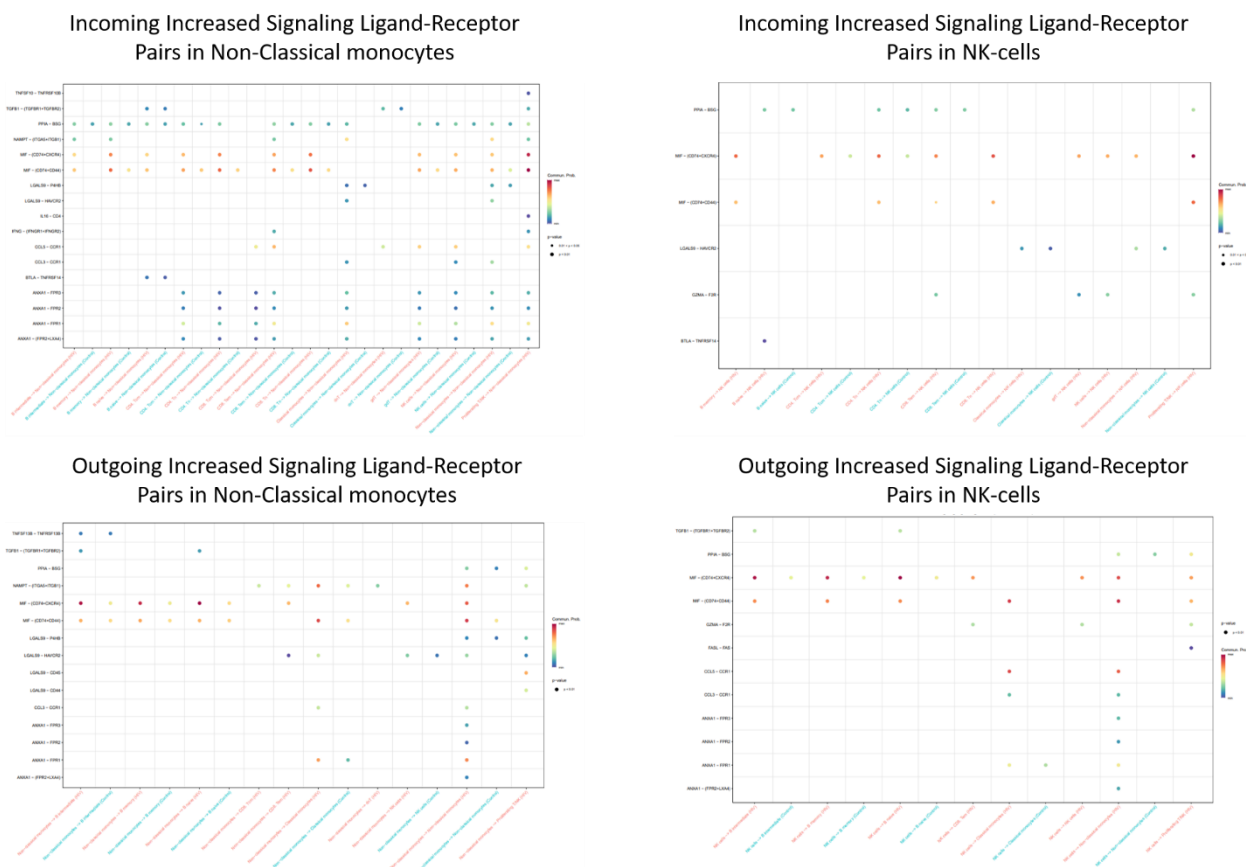


Рисунок 29. Обогащенные лиганд-рецепторные взаимодействия в неклассических моноцитах и НК-клетках. Взаимодействия, показывающие более высокую прогнозируемую активность в ВИЧ-позитивной когорте по сравнению с контролем.

Обогащенные входящие взаимодействия в неклассических моноцитах, такие как MIF-(CD74+CXCR4), MIF-(CD74+CD44), ANXA1-FPR1 и CCL5-CCR1, указывают на усиленный хемотаксис, адгезию и провоспалительную активацию во время острой ВИЧ-инфекции. Одновременно обогащенные исходящие взаимодействия (NAMPT-(ITGA5+ITGB1); LGALS9-CD45) отражают увеличенную секрецию факторов, модулирующих межклеточные контакты и чувствительность рецепторов (Рисунок 29). В совокупности эти изменения могут способствовать поддержанию воспалительного ответа на ранней стадии ВИЧ-инфекции.

Усиленные входящие взаимодействия (MIF-(CD74+CXCR4); MIF-(CD74+CD44)) в NK-клетках во время острой ВИЧ-инфекции указывают на повышенную восприимчивость к MIF-опосредованной передаче сигнала, что потенциально влияет на их активацию и направленную миграцию. Одновременно увеличенные исходящие взаимодействия — PPIA-BSG, MIF-(CD74+CXCR4/CD44), CCL5-CCR1 и ANXA1-FPR1 — демонстрируют расширенную секреторную способность NK-клеток, что может усиливать сети межклеточной коммуникации и поддерживать ранние воспалительные реакции при ВИЧ-инфекции.

Наиболее значительное снижение активности было зафиксировано для популяций Treg, MAIT и  $\gamma\delta$  T-клеток (Рисунок 30).

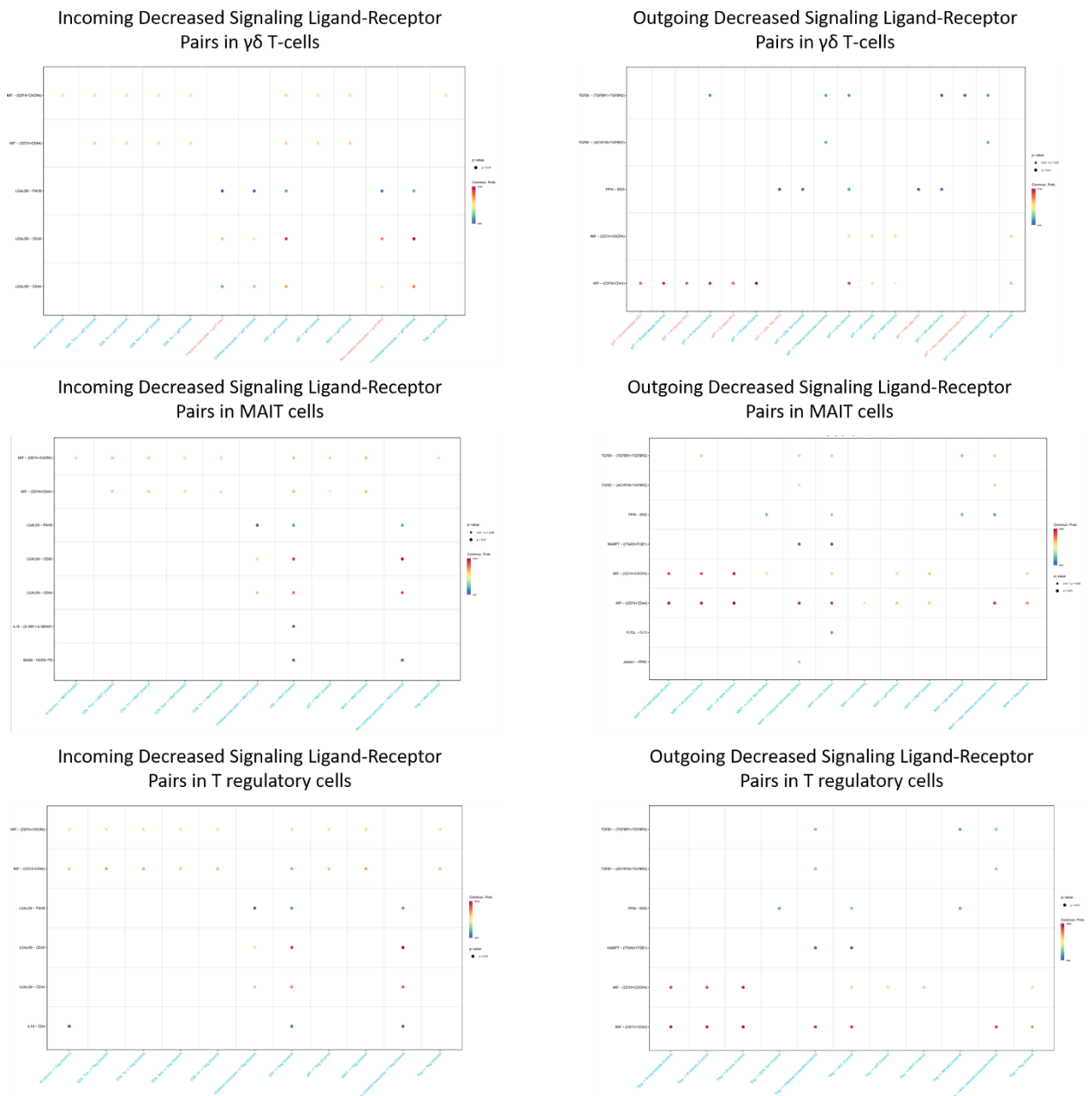


Рисунок 30. Ослабленные лиганд-рецепторные взаимодействия в  $\gamma\delta$  T, MAIT и T-регуляторных клетках. Взаимодействия, показывающие более низкую прогнозируемую активность в ВИЧ-положительной когорте по сравнению с контролем.

Мы обнаружили, что  $\gamma\delta$  T-лимфоциты, MAIT-клетки и регуляторные T-клетки у ВИЧ-положительных индивидуумов демонстрируют значительное снижение прогнозируемой сигнальной активности по осям лиганд-рецепторов MIF-(CD74+CXCR4), MIF-(CD74+CD44), LGALS9-CD45 и LGALS9-CD44 по сравнению с ВИЧ-негативными донорами. При нормальном иммунном ответе

MIF связывается с CD74 (часто в комплексе с CXCR4 или CD44), способствуя воспалительным и антиапоптотическим процессам, которые рекрутируют лейкоциты и поддерживают их выживание [205]. Аналогично, галектин-9 (LGALS9) усиливает стабильность и супрессорную функцию индуцированных Treg-клеток через CD44 [206]. Во время острой ВИЧ-инфекции  $\gamma\delta$  и MAIT-клетки обычно запускают быстрые противовирусные ответы (например, продукцию IFN- $\gamma$  и цитолитическую активность), в то время как Treg-клетки помогают сдерживать чрезмерную активацию МПК. Ослабленная передача сигналов через MIF/Gal-9, вероятно, лишает эти клетки важных активирующих и хемотаксических сигналов, тем самым нарушая их эффективность — например, блокада взаимодействий Gal-9-CD44 нарушает функциональность Treg [206]. В совокупности ослабленная сигнальная поддержка  $\gamma\delta$ , MAIT и Treg-клеток во время острой ВИЧ-инфекции, вероятно, подрывает их противовирусный потенциал и нарушает регуляцию иммунного ответа.

Относительный уровень активности (Рисунок 27) демонстрирует, что в ВИЧ-позитивной когорте доминируют пути цитокиновой сигнализации (IFN- $\Pi$ , TNF, CD70, VEGF, IL1, IL2 и др.). Абсолютный, ненормализованный уровень активности сигнальных путей (Information Flow) показывает, что в контрольной когорте эти цитокиновые пути практически неактивны, тогда как в ВИЧ-позитивной когорте они проявляют активность, хотя и более низкую по сравнению с другими сигнальными путями (VISFATIN, CCL, ANNEXIN, MIF; Рисунок 27).

### **3.15 Межклеточная коммуникация МПК во время острой стадии ВИЧ-инфекции**

Изменения в сигнальных путях привели к преобразованиям в сети межклеточных взаимодействий (Рисунок 31).

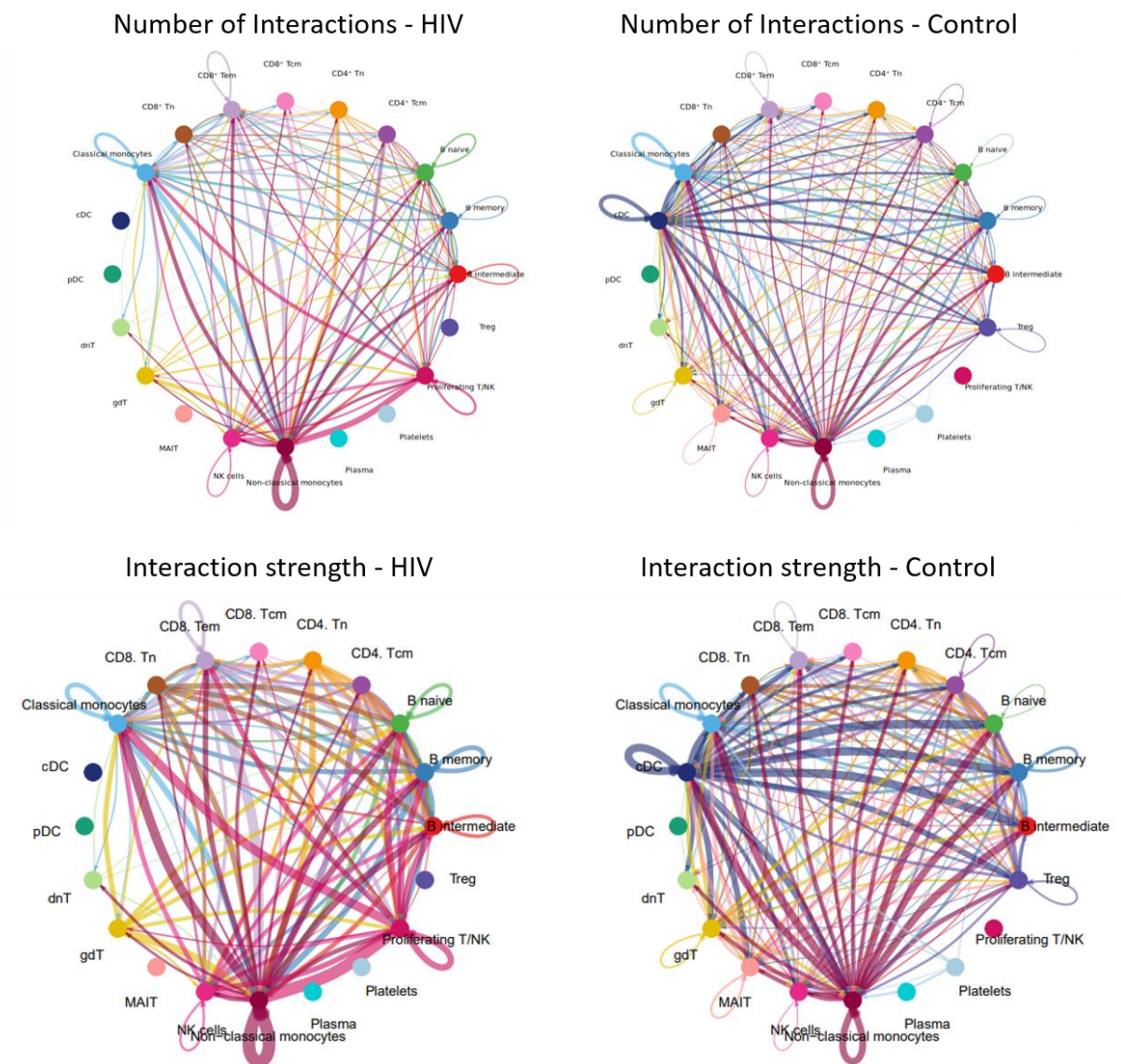


Рисунок 31. Сеть межклеточной коммуникации между популяциями МПК. Количество и сила взаимодействий между популяциями МПК у лиц с острой ВИЧ-1 инфекцией (слева) и в контроле (ВИЧ-негативные доноры, справа).

Результаты демонстрируют, что острая стадия ВИЧ-инфекции характеризуется существенным сокращением количества и интенсивности клеточных взаимодействий внутри популяций МПК (Рисунок 31). Например, популяции дендритных клеток (cDCs, pDCs) показали минимальную коммуникацию с другими типами клеток; аналогично, Treg, MAIT-клетки и

плазматические клетки были не участвовали в сети межклеточных коммуникаций.

К популяциям, демонстрирующим значительное сокращение, хотя и не полную потерю, межклеточной коммуникации, относились CD4<sup>+</sup> T-клетки (T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub>), CD8<sup>+</sup> T-клетки (T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub>),  $\gamma\delta$  T-клетки и double-negative T (dnT) клетки. Относительное сохранение многочисленных взаимодействий наблюдается у популяций классических (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) и неклассических (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) моноцитов, что согласуется с анализом активности сигнальных путей и входящих/исходящих сигналов, где неклассические моноциты также оказываются наиболее активными клетками.

Более детальный анализ показывает, что плазматические клетки у ВИЧ-позитивных индивидуумов проявляют значительно меньше взаимодействий со своими T-хелперными клетками (T<sub>fh</sub>-подобными и CD4<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> клетками), тогда как в контроле эти взаимодействия выражены. Кроме того, мы наблюдали уменьшение количества взаимодействий между различными T-клеточными субпопуляциями (например, CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> - CD8<sup>+</sup> T<sub>em</sub>, перекрестное взаимодействие CD4<sup>+</sup> - CD8<sup>+</sup>, взаимодействия с  $\gamma\delta$ T и dnT клетками), в то время как в контрольной группе эта сеть была более обширной. Хотя классические моноциты сохранили больше контактов, чем большинство популяций, они утратили свою центральную роль в сети межклеточных коммуникаций, которая перешла к неклассическим моноцитам.

## Глава 4. Обсуждение полученных результатов

В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной доминирующими в России генетическими вариантами - суб-субтипом А6 и рекомбинантной формой CRF63\_02A6, объединяющее анализ репликативных свойств клинических изолятов, их тропности, провирусного ландшафта и транскриптомного профиля мононуклеаров периферической крови (МПК). Полученные данные позволяют существенно расширить существующие представления о ранней ВИЧ-инфекции в контексте генетического разнообразия вируса.

Одним из наблюдений стало то, что изоляты CRF63\_02A6 в культуре МПК демонстрируют более высокую репликативную активность (фенотип rapid/high) по сравнению с изолятами суб-субтипа А6, для которых был более характерен фенотип slow/low. Известно, что повышенная репликативная способность изолята, инфицирующего пациента, ассоциируется с более быстрым прогрессированием заболевания [207]. В этой связи наши данные хорошо согласуются с немногочисленными клиническими наблюдениями, показавшими, что инфекция ВИЧ-1, вызванная CRF63\_02A6, протекает тяжелее, с более высокими пиками вирусной нагрузки [89]. Важно отметить, что высокая вирусная нагрузка при инфицировании CRF63\_02A6 может быть следствием не только особенностей иммунного ответа хозяина, но и врожденно более высокого репликативного потенциала самого вируса, что подтверждается и другими исследованиями, выявившими связь между репликативной способностью трансмиссивных вирусов и последующей динамикой заболевания [88].

Одновременно мы обнаружили неожиданно высокую частоту выявления штаммов с X4- и двойной R5/X4-тропностью (у 8 из 14 пациентов) уже на острой стадии инфекции. Это наблюдение противоречит классической парадигме, согласно которой в ранние фазы доминируют R5-тропные

варианты, а X4-тропные возникают лишь на поздних стадиях у 50-60% пациентов (данные указаны для субтипа В ВИЧ-1) [9, 102]. В то же время существуют данные, что частота переключения корцептора может варьировать между разными субтипами [101]. Наши результаты, напротив, указывают на то, что для варианта CRF63\_02A6 наличие CXCR4-использующих штаммов на ранних этапах может быть скорее правилом, чем исключением. Возможно, это является следствием уникальной генетической архитектуры CRF63\_02A6 (мозаичная структура с env-областью от CRF02\_AG) и связанной с этим повышенной генетической изменчивости [66]. Важно подчеркнуть, что X4 тропность ассоциирована с ускоренным снижением числа CD4+ Т-лимфоцитов и быстрым прогрессированием до СПИДа [10, 106], причём мутации, обеспечивающие смену тропности, могут также способствовать ускользанию от нейтрализации антителами [109]. Таким образом, высокая частота выявления X4-тропных штаммов CRF63\_02A6 уже в острую стадию может быть связана с ускоренным прогрессированием заболевания, наблюдаемым у некоторых пациентов с этой рекомбинантной формой [89].

Обнаруженная нами высокая частота X4-тропных вариантов CRF63\_02A6 также поставила под вопрос возможность использования существующих генотипических алгоритмов, разработанных для глобально распространенных субтипах В и С. Проведённое нами сравнение подтвердило это: точность существующих моделей для CRF63\_02A6 была низкой, причём они систематически завышали долю X4-тропных штаммов. Эти результаты полностью согласуются с независимыми исследованиями, показавшими, что для не-В субтипов, включая CRF02\_AG и CRF01\_AE, существующие алгоритмы работают хуже, а для субтипа А и его рекомбинантных форм могут быть вовсе неприменимы [122, 124, 125]. В более широком смысле наши данные подтверждают концепцию, что для точного генотипического предсказания тропности необходимы алгоритмы, обученные на

последовательностях конкретного генетического варианта. В связи с этим мы разработали и валидировали субтип-специфичную модель HIV-V3Augur, которая представляет собой программу для Windows с пользовательским графическим интерфейсом, которая заполняет пробел, связанный с низкой эффективностью генотипического предсказания тропности изолятов субтипа A6 и CRF63\_02A6.

Количественный анализ провирусных резервуаров с помощью метода IPDA показал, что уже в острую фазу, вызванную A6 и CRF63\_02A6, формируется выраженный пул провирусной ДНК, представленный преимущественно дефектными геномами. Само по себе это наблюдение не является новым и согласуется с данными, полученными для субтипа B [85, 86]. Более того, в недавних работах, проведённых на субтипах B и C, также было показано, что дефектный пул провирусной ДНК может коррелировать с вирусной нагрузкой и активностью иммунного ответа [87]. Новизна нашей работы заключается в том, что это первое прямое количественное подтверждение данного феномена для российских вариантов. Важно отметить, что дефектные провирусы, хотя и не способны к продукции инфекционных вирионов, могут транскрибироваться и продуцировать вирусные белки, поддерживая тем самым хроническую иммунную активацию даже на фоне эффективной терапии [87]. С этой точки зрения особенно важен тот факт, что высокий репликативный потенциал CRF63\_02A6 в культуре клеток сочетался с высоким общим числом резервуаров (включая дефектные), что косвенно указывает на его способность поддерживать высокий уровень иммунной активации и воспаления с самого начала заболевания.

Результаты секвенирования транскриптома единичных клеток (scRNA-seq) позволили впервые охарактеризовать изменения в иммунной системе при встрече с вариантами A6 и CRF63\_02A6. Выявленное нами снижение доли наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и увеличение доли CD8<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти и NK-клеток на фоне сокращения Treg и MAIT-клеток в целом

согласуется с данными, полученными в других исследованиях, которые показали у пациентов в острой стадии ВИЧ-инфекции активацию интерферон-индуцированных генов, экспансию цитотоксических субпопуляций и повышение экспрессии генов, связанных с пролиферацией [5]. Более поздние работы также подтвердили, что ВИЧ-инфицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки на ранней стадии усиливают экспрессию генов HLA класса I и антивирусных генов, ассоциированных с контролем виремии [156]. Мы также обнаружили, что уже в острую фазу ответ иммунной системы носит черты, характерные для хронического воспаления и истощения. В частности, в CD4<sup>+</sup> T<sub>cm</sub>-клетках была повышена экспрессия негативных регуляторов пути TGF- $\beta$ , что может быть связано с попыткой ограничения воспаления ценой снижения противовирусного ответа [184]. Активация неклассических моноцитов, которые становились центральным хабом межклеточных взаимодействий, согласуется с литературными данными, указывающими на их ключевую роль в поддержании провоспалительного фенотипа и возможном формировании резервуаров в центральной нервной системе [202]. Одновременное снижение активности и функциональности регуляторных популяций (Treg, MAIT) лишает систему противовесов, способствуя прогрессии иммунопатологии. В целом, этот профиль указывает на то, что при инфицировании CRF63\_02A6 и A6 иммунная система испытывает перегрузку, которая закладывает основу для быстрого развития иммунодефицита.

При интерпретации полученных данных необходимо учитывать ряд ограничений. Во-первых, это относительно небольшой размер выборки, особенно для части scRNA-seq-анализа (n=3), что может влиять на общность статистических выводов. Во-вторых, наша модель машинного обучения HIV-V3Augur, несмотря на высокую точность в кросс-валидации, требует независимой валидации на более крупных выборках изолятов, особенно по отношению к CRF63\_02A6 ВИЧ-1. Наконец, выявленные транскриптомные изменения отражают лишь молекулярный профиль клеток периферической

крови и могут не в полной мере отражать события, происходящие в тканевых резервуарах (например, в лимфоидной ткани кишечника или лимфоузлах). Тем не менее, высокая согласованность наших данных с клиническими и вирусологическими параметрами позволяет предположить, что они отражают ключевые патогенетические механизмы.

Данная работа демонстрирует, что циркулирующие в России варианты ВИЧ-1, в особенности CRF63\_02A6, могут иметь специфичный набор биологических свойств, включая высокую репликативную активность, предрасположенность к раннему переключению тропности и способность индуцировать выраженные иммунные дисфункции уже на ранней стадии ВИЧ-инфекции. Дальнейшие исследования должны быть направлены на более глубокое изучение функциональной активности выявленных генов-кандидатов и расширение когорт для валидации модели.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной генетическими вариантами суб-субтипа А6 и CRF63\_02А6, доминирующими в России. Работа охватывает молекулярно-генетические, вирусологические и клеточно-иммунологические аспекты, что позволило получить целостную картину раннего инфекционного процесса, вызванного этими регионально значимыми штаммами.

Сформирована репрезентативная когорта ВИЧ-положительных пациентов в острой стадии инфекции (стадии 2Б и 2В по Покровскому, стадии I-V по Fiebig) с высокой вирусной нагрузкой ( $\geq 10^6$  копий РНК/мл). Генотипирование изолятов подтвердило корректность проведенного анализа. ВИЧ-инфекция пациентов основной когорты исследования была вызвана ВИЧ-1 суб-субтипа А6, CRF63\_02А6 или URF, которые были образованы этими вариантами.

Методом цифровой ПЦР (IPDA) впервые количественно охарактеризован провирусный ландшафт при острой инфекции, вызванной А6 и CRF63\_02А6. Показано, что медианное число провирусных копий составляет 26 034 на  $10^6$  МПК, из которых подавляющее большинство (медиана 24 443) представлено дефектными геномами. Доля интактных, потенциально репликационно-компетентных резервуаров относительно невелика (медиана 405 копий на  $10^6$  клеток). Это согласуется с данными, полученными для других субтипов, и подтверждает, что уже на ранних этапах инфекции формируется гетерогенный пул провирусов с доминированием дефектных копий.

Важным результатом работы стала разработка и валидация инструмента для генотипического предсказания тропности изолятов А6 и CRF63\_02А6 - модели машинного обучения HIV-V3Augur. Предварительно проведён сравнительный анализ восьми существующих моделей и правил (Geno2pheno,

WebPSSM, T-CUP 2.0, правило 11/25, правило Delobel и др.) на обширном наборе референсных последовательностей из базы данных LANL и собственных фенотипированных изолятов. Установлено, что для глобально распространённых субтипов В, С и CRF01\_AE многие существующие модели достигают высокой точности ( $\geq 95\%$ ), тогда как для А6 и особенно для CRF63\_02A6 их эффективность резко снижается (лучшая точность 85% и 72% соответственно), причём достижение высокой чувствительности всегда сопровождается потерей специфичности. Разработанный ансамблевый классификатор (стекинг RandomForest и SVM), обученный на признаках PseAAC и RSCU с 10-кратной кросс-валидацией, для суб-субтипа А6 показал сбалансированные метрики (чувствительность 79%, специфичность 79%, точность 77%), а для CRF63\_02A6 с использованием модели, обученной на CRF02\_AG и дополненной SMOTE - точность 95% при чувствительности 87% и специфичности 100%. HIV-V3Augur реализован в виде автономного приложения с графическим интерфейсом, что делает его доступным для лабораторий без специальной биоинформатической подготовки.

Анализ транскриптома единичных клеток МПК (scRNAseq) выявил перестройку клеточного состава и транскрипционных профиля МПК. Отмечено снижение доли наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, увеличение доли CD8<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти, NK-клеток и пролиферирующих Т/NK-клеток на фоне значительного сокращения регуляторных Т-клеток (Treg) и MAIT-клеток, что указывает на состояние генерализованной иммунной активации. Pseudo bulk РНК анализ продемонстрировал повышение экспрессии генов, связанных с иммунной активацией (*NR4A1*, *NR4A2*, *NR4A3*), отрицательной регуляцией сигналинга (*DUSP1*, *DUSP2*, *RGS1*), провоспалительными ответами (*THBS1*, *SRGN*, *OLR1*) и клеточным стрессом (*ATF3*, *IER3*), а также снижение экспрессии генов цитоскелетной организации и метаболизма сфинголипидов.

Некоторые детали иммунного ответа во время острой стадии ВИЧ-инфекции были выявлены и при детальном анализе транскриптома отдельных популяций МПК. В CD4<sup>+</sup> Тсм-клетках обнаружена повышенная экспрессия негативных регуляторов пути TGF-β (*SMAD7*, *PMEPA1*, *SKIL*), рецептора *CXCR4* и фактора *FOSL2*, наряду со снижением экспрессии STIM1 и генов пролиферации (*SKAP1*, *RASGRF2*). В CD8<sup>+</sup> Тсм-клетках отмечена гиперэкспрессия *IL21R*, длинной некодирующей РНК *NEAT1* (противовирусный фактор) и гена *RGS1*, а также снижение экспрессии *HLA-C*, что может указывать на адаптацию российских вариантов ВИЧ-1 к ускользанию от иммунного ответа. В CD8<sup>+</sup> Тсм-клетках повышен уровень COPS9 (компонент сигнасомы *COP9*, ассоциированный с поддержкой репликации ВИЧ) и снижена экспрессия *AGAP1* (потенциально связанного с лизосомальной деградацией вирусных компонентов).

Наиболее выраженные изменения зафиксированы в неклассических моноцитах (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), которые при острой инфекции приобретают активированный провоспалительный профиль с повышением экспрессии *IL1B*, *CXCR4*, *CD69* и *IER3*. Эти клетки становятся центральным регуляторным узлом межклеточной коммуникации, как показано анализом лиганд-рецепторных взаимодействий: они демонстрируют максимальное количество исходящих и входящих сигналов, включая обогащённые взаимодействия MIF-(CD74+CXCR4), ANXA1-FPR1 и CCL5-CCR1. Одновременно сигнальная активность регуляторных популяций (Treg, MAIT, γδ Т-клеток) по осям MIF-CD74 и LGALS9-CD45 значительно ослаблена, что может способствовать дисбалансу иммунного ответа и персистенции вируса.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что острая стадия ВИЧ-инфекции, вызванная вариантами А6 и CRF63\_02А6, характеризуется не просто массивной активацией провоспалительных путей, но и сложным перепрограммированием внутриклеточных сигнальных каскадов, перераспределением коммуникационных сетей в сторону неклассических

моноцитов и ранним формированием дисфункции ключевых антивирусных популяций. Результаты работы вносят вклад в понимание патогенеза ранней ВИЧ-инфекции применительно к регионально значимым генотипам и предоставляют практический инструмент (HIV-V3Augur) для генотипического предсказания тропности, востребованный при назначении ингибиторов проникновения в Российской Федерации.

Перспективными направлениями дальнейших исследований являются сравнительное изучение транскриптомного профиля единичных клеток у пациентов в острой стадии и элитных контроллеров, расширение выборки штаммов с детальным фенотипированием для повышения статистической мощности и валидации модели HIV-V3Augur на независимых когортах, а также использование других омиксных технологий (метагеномики) для сбора и анализа комменсальных вирусов и бактерий (анелловирозов, пегивирозов и др.), которые являются активными участниками сигнальных путей, задействованных в патогенезе ВИЧ-инфекции.

## ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Впервые в России и мире была применена технология цифровой ПЦР для оценки количества и целостности провирусной ДНК суб-субтипа А6 и CRF63\_02А6. Выявлено, что медиана общего числа резервуаров ВИЧ-1 в 15 случаях острой ВИЧ-инфекции составляет 26 034 копий на  $10^6$  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 А6 и CRF63\_02А6 в сравнении с другими моделями. Чувствительность, специфичность и точность в отношении суб-субтипа А6 составили 79%, 79% и 77% соответственно. В отношении CRF63\_02А6 87%, 100% и 95%. Данное программное обеспечение перспективно для использования в клинической практике и имеет высокую значимость при использовании ингибиторов проникновения ВИЧ-1 и оценке 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 А6 и CRF63\_02А6, 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 противоапоптотических 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- $\beta$  и mTOR, а также резкое снижение взаимодействий между цитотоксическими клетками (NK, CD8<sup>+</sup> 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.

## **Благодарности**

Автор приносит благодарность коллегам из отдела ретровирусов, сотрудникам отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, сотрудникам лаборатории респираторных вирусных инфекций ФИЦ ФТМ. Автор выражает признательность сотруднику лаборатории биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ кандидату биологических наук М.Е. Меняйло за методическую поддержку в подготовке образцов клеток к секвенированию транскриптома. Автор благодарит сотрудников кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета кандидата биологических наук А.Г. Мензорова, кандидата биологических наук А.М. Гусаченко и доктора биологических наук Н.Б. Рубцова за многократные возможности апробации результатов работы в форме доклада, и методическую поддержку в смежных с темой диссертационной работы областях. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю кандидату биологических наук Н.М. Гашниковой за всестороннюю помощь в планировании и реализации исследования, осуществление консультаций по вопросам публикаций и особенностям работы с патогенными биологическими агентами, поддержку в формировании рабочих контактов с коллегами из других лабораторий и институтов. Автор также выражает благодарность семье и близким за поддержку при подготовке работы.

## Список используемых сокращений

ADCC - антителозависимая клеточная цитотоксичность  
(antibody-dependent cellular cytotoxicity)

AUC - площадь под ROC-кривой (area under the curve)

CCR5 - C-C хемокиновый рецептор 5 типа

CRF - циркулирующая рекомбинантная форма (circulating recombinant form)

CXCR4 - C-X-C хемокиновый рецептор 4 типа

ddPCR - капельная цифровая ПЦР (droplet digital PCR)

DEG - дифференциально экспрессируемые гены (differentially expressed genes)

DMSO - диметилсульфоксид

FBS - фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)

FPR - частота ложноположительных результатов (false positive rate)

FSU - бывший Советский Союз (former Soviet Union)

GALT - лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником  
(gut-associated lymphoid tissue)

GLMM - обобщённая линейная смешанная модель (generalized linear mixed model)

GO - Gene Ontology

GUI - графический пользовательский интерфейс (graphical user interface)

GWAS - полногеномное ассоциативное исследование (genome-wide association study)

HESN - ВИЧ-экспонированные серонегативные лица (HIV-exposed seronegative)

HLA - человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigen)

IFN - интерферон

IL - интерлейкин

IPDA - анализ интактной провирусной ДНК (intact proviral DNA assay)

LANL - Лос-Аламосская национальная лаборатория (Los Alamos National Laboratory)

LPS - липополисахарид

LTR - длинный концевой повтор (long terminal repeat)

MAIT - слизисто-ассоциированные инвариантные Т-клетки (mucosal-associated invariant T cells)

MCC - коэффициент корреляции Мэтьюса (Matthews correlation coefficient)

MHC - главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)

ML - машинное обучение (machine learning)

MSM - мужчины, имеющие секс с мужчинами (men who have sex with men)

NGS - секвенирование нового поколения (next-generation sequencing)

NK - натуральные киллеры (natural killers)

PAMPs - патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns)

PBS - фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline)

PCA - анализ главных компонент (principal component analysis)

PseAAC - псевдо-аминокислотный состав (pseudo amino acid composition)

PSSM - позиционно-специфическая матрица (position-specific scoring matrix)

QVOA - количественный анализ вирусного роста (quantitative viral outgrowth assay)

RBF - радиальная базисная функция (radial basis function)

RSCU - относительная частота синонимичных кодонов (relative synonymous codon usage)

scRNA-seq - секвенирование РНК единичных клеток (single-cell RNA sequencing)

SIV - вирус иммунодефицита обезьян (simian immunodeficiency virus)

SMOTE - синтетическое увеличение минорного класса (synthetic minority over-sampling technique)

SVM - метод опорных векторов (support vector machine)

T<sub>cm</sub> - Т-клетки центральной памяти (central memory T cells)

T<sub>em</sub> - Т-клетки эффекторной памяти (effector memory T cells)

Th17 - Т-хелперы 17 типа

T<sub>reg</sub> - регуляторные Т-клетки (regulatory T cells)

UMAP - равномерная аппроксимация и проекция многообразия (uniform manifold approximation and projection)

URF - уникальная рекомбинантная форма (unique recombinant form)

γδТ - гамма-дельта Т-клетки

АРТ - антиретровирусная терапия

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ВИЧ-1 - вирус иммунодефицита человека 1 типа

ВИЧ-2 - вирус иммунодефицита человека 2 типа

ИФА - иммуноферментный анализ

МПК - мононуклеарные клетки периферической крови

СПИД - синдром приобретённого иммунодефицита

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Addissouky, T. A. Genomic frontiers in HIV research: from pathogenesis to curative strategies / T. A. Addissouky // *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. – 2025. – Vol. 26, № 1. – P. 148. DOI: 10.1186/s43042-025-00777-6.
2. HIV capsids: orchestrators of innate immune evasion, pathogenesis and pandemicity / K. L. Morling, M. ElGhazaly, R. S. B. Milne [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2025. – Vol. 106, № 1. DOI: 10.1099/jgv.0.002057.
3. Mechanisms of Immune Evasion in HIV-1: The Role of Virus-Host Protein Interactions / A. Mouzakis, V. Petrakis, E. Tryfonopoulou [et al.] // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2025. – Vol. 47, № 5. – P. 367. DOI: 10.3390/cimb47050367.
4. Advancements in single-cell techniques for examining the HIV reservoir: pathways to a cure / N. Mbhele, B. Chimukangara, L. Tyers [et al.] // *mBio*. – 2025. – Vol. 16, № 7. – P. e00655-25. DOI: 10.1128/mbio.00655-25.
5. Integrated single-cell analysis of multicellular immune dynamics during hyperacute HIV-1 infection / S. W. Kazer, T. P. Aicher, D. M. Muema [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26, № 4. – P. 511–518. DOI: 10.1038/s41591-020-0799-2.
6. Iyer, L. R. Current insight into HIV-1 persistence from single-cell transcriptome profiling in acutely treated cohorts of infection / L. R. Iyer, R. Thomas // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2025. – Vol. 20, № 5. – P. 481–487. DOI: 10.1097/COH.0000000000000962.
7. Interactions of Monocytes, HIV, and ART Identified by an Innovative scRNAseq Pipeline: Pathways to Reservoirs and HIV-Associated Comorbidities / R. León-Rivera, B. Morsey, M. Niu [et al.] // *mBio*. – 2020. – Vol. 11, № 4. – P. e01037-20. DOI: 10.1128/mBio.01037-20.

8. Early Transcriptomic Signatures of Immune Response Modulation Following Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Patients / E. A. Stolbova, A. V. Pokrovskaya, A. B. Shemshura [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26, № 21. – P. 10678. DOI: 10.3390/ijms262110678.
9. Immune activation correlates with and predicts CXCR4 co-receptor tropism switch in HIV-1 infection / B. J. Connell, L. E. Hermans, A. M. J. Wensing [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 15866. DOI: 10.1038/s41598-020-71699-z.
10. Faster HIV-1 Disease Progression among Brazilian Individuals Recently Infected with CXCR4-Utilizing Strains / M. C. A. Sucupira, S. Sanabani, R. M. Cortes [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e30292. DOI: 10.1371/journal.pone.0030292.
11. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2020 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel / M. S. Saag, R. T. Gandhi, J. F. Hoy [et al.] // *JAMA*. – 2020. – Vol. 324, № 16. – P. 1651. DOI: 10.1001/jama.2020.17025.
12. The Molecular Epidemiology of HIV-1 in Russia, 1987–2023: Subtypes, Transmission Networks and Phylogenetic Story / A. Lebedev, D. Kireev, A. Kirichenko [et al.] // *Pathogens*. – 2025. – Vol. 14, № 8. – P. 738. DOI: 10.3390/pathogens14080738.
13. Origin and evolution of HIV-1 subtype A6 / S. H. Abidi, L. Aibekova, S. Davlidova [et al.] // *PLOS ONE*. – 2021. – Vol. 16, № 12. – P. e0260604. DOI: 10.1371/journal.pone.0260604.
14. Baryshev, P. B. HIV-1 Genetic Diversity in Russia: CRF63\_02A1, a New HIV Type 1 Genetic Variant Spreading in Siberia / P. B. Baryshev, V. V. Bogachev, N. M. Gashnikova // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2014. – Vol. 30, № 6. – P. 592–597. DOI: 10.1089/aid.2013.0196.

15. Spatiotemporal dynamics of HIV-1 CRF63\_02A6 sub-epidemic / M. V. Sivay, L. V. Maksimenko, I. P. Osipova [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 946787. DOI: 10.3389/fmicb.2022.946787.
16. Env-pseudoviruses based on the HIV-1 genetic variant circulating in Siberia / N. B. Rudometova, A. A. Fando, D. N. Shcherbakov [et al.] // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2025. – Vol. 29, № 4. – P. 600–607. DOI: 10.18699/vjgb-25-63.
17. Characterization of a New HIV-1 Second-Generation Circulating Recombinant Form CRF173\_63A6 in the Jewish Autonomous Region of Russia / V. E. Ekushov, M. R. Halikov, A. V. Totmenin [et al.] // *Pathogens*. – 2025. – Vol. 14, № 9. – P. 836. DOI: 10.3390/pathogens14090836.
18. Exploring HIV-1 Maturation: A New Frontier in Antiviral Development / A. McGraw, G. Hillmer, S. M. Medehincu [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16, № 9. – P. 1423. DOI: 10.3390/v16091423.
19. HIV Biology: Detailed Insight into Virion Structural Organization and Its Pathogenesis / D. Agrawal, K. Chand, L. Preethi [et al.]. – Singapore : Springer Nature Singapore, 2024. DOI: 10.1007/978-981-97-4480-0\_22.
20. Mechanisms of Immune Evasion in HIV-1: The Role of Virus-Host Protein Interactions / A. Mouzakis, V. Petrakis, E. Tryfonopoulou [et al.] // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2025. – Vol. 47, № 5. – P. 367. DOI: 10.3390/cimb47050367.
21. Involvement of Human Cellular Proteins and Structures in Realization of the HIV Life Cycle: A Comprehensive Review, 2024 / A. N. Schemelev, V. S. Davydenko, Y. V. Ostankova [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16, № 11. – P. 1682. DOI: 10.3390/v16111682.

22. Moezpoor, M. R. Help or Hinder: Protein Host Factors That Impact HIV-1 Replication / M. R. Moezpoor, M. Stevenson // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16, № 8. – P. 1281. DOI: 10.3390/v16081281.
23. 30 years of HIV therapy: Current and future antiviral drug targets / J. Nuwagaba, J. A. Li, B. Ngo [et al.] // *Virology*. – 2025. – Vol. 603. – P. 110362. DOI: 10.1016/j.virol.2024.110362.
24. Sundquist, W. I. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation / W. I. Sundquist, H.-G. Krausslich // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2012. – Vol. 2, № 7. – P. a006924–a006924. DOI: 10.1101/cshperspect.a006924.
25. Bbosa, N. HIV subtype diversity worldwide / N. Bbosa, P. Kaleebu, D. Ssemwanga // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. 153–160. DOI: 10.1097/COH.0000000000000534.
26. Global associations of key populations with HIV-1 recombinants: a systematic review, global survey, and individual participant data meta-analysis / N. Nchinda, R. Elangovan, J. Yun [et al.] // *Frontiers in Public Health*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1153638. DOI: 10.3389/fpubh.2023.1153638.
27. Junqueira, D. M. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic / D. M. Junqueira, S. E. D. M. Almeida // *Virology*. – 2016. – Vol. 495. – P. 173–184. DOI: 10.1016/j.virol.2016.05.003.
28. The Changing Epidemiological Profile of HIV-1 Subtype B Epidemic in Ukraine / T. I. Vasylyeva, M. Liulchuk, L. Du Plessis [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2019. – Vol. 35, № 2. – P. 155–163. DOI: 10.1089/aid.2018.0167.
29. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Eastern Europe and Russia / M. A. A. Van De Klundert, A. Antonova, G. Di Teodoro [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 10. – P. 2099. DOI: 10.3390/v14102099.

30. Characterization of HIV-1 Epidemic in Kyrgyzstan / M. V. Sivay, A. V. Totmenin, D. P. Zyryanova [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 753675. DOI: 10.3389/fmicb.2021.753675.

31. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 genetic variants circulating in the countries of Eastern European and Central Asia in 2010-2019 / L. I. A. Lapovok, K. A. A. Kirichenko, S. A. V. Shlykova [et al.] // *Èpidemiologiâ i Infekcionnye Bolezni. Aktual'nye voprosy*. – 2022. – Vol. 3\_2022. – P. 31–40. DOI: 10.18565/epidem.2022.12.3.31-40.

32. HIV Epidemic in Asia: Implications for HIV Vaccine and Other Prevention Trials / N. Phanuphak, Y.-R. Lo, Y. Shao [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2015. – Vol. 31, № 11. – P. 1060–1076. DOI: 10.1089/aid.2015.0049.

33. Daw, M. A. Epidemiological characterization and geographic distribution of human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome infection in North African countries / M. A. Daw, M. O. Ahmed // *World Journal of Virology*. – 2021. – Vol. 10, № 2. – P. 69–85. DOI: 10.5501/wjv.v10.i2.69.

34. Faria, N. R. Phylogeographic Insights into the Origins and Epidemic History of the Human Immunodeficiency Virus Type 2 / N. R. Faria, J. Esbjörnsson, P. Lemey // *Encyclopedia of AIDS* / ed. by T. J. Hope, M. Stevenson, D. D. Richman. – New York, NY : Springer New York, 2013. – P. 1–9. DOI: 10.1007/978-1-4614-9610-6\_44-1.

35. Global and Regional Estimates for Subtype-Specific Therapeutic and Prophylactic HIV-1 Vaccines: A Modeling Study / R. Elangovan, M. Jenks, J. Yun [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 690647. DOI: 10.3389/fmicb.2021.690647.

36. Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 genetic diversity in HIV positive individuals on antiretroviral therapy in a cross sectional study conducted in Teso, Western Kenya / M. Adhiambo, O. Makwaga, F. Adungo [et al.] // *Pan African Medical Journal*. – 2021. – Vol. 38. DOI: 10.11604/pamj.2021.38.335.26357.

37. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review / B. T. Foley, T. Leitner, D. Paraskevis [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 46. – P. 150–158. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.10.018.

38. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D sub-subtypes reclassification / N. Désiré, L. Cerutti, Q. Le Hingrat [et al.] // *Retrovirology*. – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 80. DOI: 10.1186/s12977-018-0461-y.

39. HIV-2 diversity displays two clades within group A with distinct geographical distribution and evolution / B. Visseaux, M. Bertine, Q. Le Hingrat [et al.] // *Virus Evolution*. – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. veab024. DOI: 10.1093/ve/veab024.

40. Identification and Molecular Characterization of Subsubtype A4 in Central Africa / N. Vidal, C. Mulanga, S. E. Bazepeo [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2006. – Vol. 22, № 2. – P. 182–187. DOI: 10.1089/aid.2006.22.182.

41. HIV-1 Sub-Subtype A6: Settings for Normalised Identification and Molecular Epidemiology in the Southern Federal District, Russia / M. Schlösser, V. V. Kartashev, V. H. Mikkola [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 475. DOI: 10.3390/v12040475.

42. High-Level Drug-Resistant Mutations among HIV-1 Subtype A6 and CRF02\_AG in Kazakhstan / A. Sanaubarova, E. Pujol-Hodge, N. Dzissyuk [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 7. – P. 1407. DOI: 10.3390/v15071407.

43. Global and regional genetic diversity of HIV-1 in 2010–21: systematic review and analysis of prevalence / M. Nair, L. Gettins, M. Fuller [et al.] // *The Lancet Microbe*. – 2024. – Vol. 5, № 11. – P. 100912. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00151-4.
44. Increasing intra- and inter-subtype HIV diversity despite declining HIV incidence in Uganda / S. Kim, G. Kigozi, M. A. Martin [et al.] // *HIV/AIDS*. – 2024. DOI: 10.1101/2024.03.14.24303990.
45. HIV virological failure and drug resistance in a cohort of Tanzanian HIV-infected adults / C. Hawkins, N. Ulenga, E. Liu [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71, № 7. – P. 1966–1974. DOI: 10.1093/jac/dkw051.
46. Structural Features and Genetic Diversity in *Gag* Gene of Rare HIV-1 Subtypes from the Democratic Republic of Congo / C. Godwe, N. Vidal, J. Muwonga [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2024. – Vol. 40, № 3. – P. 181–187. DOI: 10.1089/aid.2022.0154.
47. Winichakoon, P. The Emerging of CRF01\_AE: A Clinical Story and Future HIV/AIDS Situation in Thailand / P. Winichakoon, S. Tongjai // *Current HIV Research*. – 2020. – Vol. 18, № 2. – P. 74–84. DOI: 10.2174/1570162X18666200129160723.
48. Preda, M. Romania, a Harbour of HIV-1 Subtype F1: Where Are We after 33 Years of HIV-1 Infection? / M. Preda, L. C. S. Manolescu // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 9. – P. 2081. DOI: 10.3390/v14092081.
49. Bello, G. Phylodynamics of HIV-1 subtype F1 in Angola, Brazil and Romania / G. Bello, J. M. Afonso, M. G. Morgado // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2012. – Vol. 12, № 5. – P. 1079–1086. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.03.014.

50. Prevalence of HIV-1 Subtypes and Drug Resistance-Associated Mutations in HIV-1-Positive Treatment-Naive Pregnant Women in Pointe Noire, Republic of the Congo (Kento-Mwana Project) / B. Bruzzone, F. Saladini, L. Sticchi [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2015. – Vol. 31, № 8. – P. 837–840. DOI: 10.1089/aid.2015.0105.

51. Molecular Epidemiology of HIV-1 in African Countries: A Comprehensive Overview / M. Giovanetti, M. Ciccozzi, C. Parolin [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, № 12. – P. 1072. DOI: 10.3390/pathogens9121072.

52. Geographic and Population Distributions of Human Immunodeficiency Virus (HIV)–1 and HIV-2 Circulating Subtypes: A Systematic Literature Review and Meta-analysis (2010–2021) / A. Williams, S. Menon, M. Crowe [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 228, № 11. – P. 1583–1591. DOI: 10.1093/infdis/jiad327.

53. HIV-1 subtype H near-full length genome reference strains and analysis of subtype-H-containing inter-subtype recombinants: / W. Janssens, T. Laukkanen, M. O. Salminen [et al.] // *AIDS*. – 2000. – Vol. 14, № 11. – P. 1533–1543. DOI: 10.1097/00002030-200007280-00009.

54. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004 / J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys [et al.] // *AIDS*. – 2006. – Vol. 20, № 16. – P. W13–W23. DOI: 10.1097/01.aids.0000247564.73009.bc.

55. Re-analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Cyprus and Greece, initially designated ‘subtype I’, reveals a unique complex A/G/H/K/? mosaic pattern / D. Paraskevis, M. Magiorkinis, A. M. Vandamme [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2001. – Vol. 82, № 3. – P. 575–580. DOI: 10.1099/0022-1317-82-3-575.

56. Near Full-Length Sequence of HIV Type 1 Subtype J Strain 04CMU11421 from Cameroon / J. Yamaguchi, A. Vallari, C. Ngansop [et al.] //

AIDS Research and Human Retroviruses. – 2010. – Vol. 26, № 6. – P. 693–697.  
DOI: 10.1089/aid.2009.0305.

57. Global and regional epidemiology of HIV-1 recombinants in 1990–2015: a systematic review and global survey / J. Hemelaar, R. Elangovan, J. Yun [et al.] // *The Lancet HIV*. – 2020. – Vol. 7, № 11. – P. e772–e781. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30252-6.

58. Günthard, H. F. Phylogenetics and molecular evolution to understand and curb the HIV pandemic / H. F. Günthard, K. Kusejko, R. D. Kouyos // *Nature Reviews Microbiology*. – 2026. – Vol. 24, № 1. – P. 76–92. DOI: 10.1038/s41579-025-01202-w.

59. Human Immunodeficiency Virus-1 Diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the Most Common Subtypes / A. Lebedev, N. Lebedeva, F. Moskaleychik [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 320. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00320.

60. Genetic Diversity of HIV-1 in Krasnoyarsk Krai: Area with High Levels of HIV-1 Recombination in Russia / L. V. Maksimenko, A. V. Totmenin, M. P. Gashnikova [et al.] // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol. 2020, № 1. – P. 9057541. DOI: 10.1155/2020/9057541.

61. Prevalence of HIV drug resistance at antiretroviral treatment failure across regions of Russia / E. Ozhmegova, A. Lebedev, A. Antonova [et al.] // *HIV Medicine*. – 2024. – Vol. 25, № 7. – P. 862–872. DOI: 10.1111/hiv.13642.

62. Epidemiology of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance in HIV patients with virologic failure of first-line therapy in the country of Georgia / E. Karkashadze, N. Dvali, N. Bolokadze [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2019. – Vol. 91, № 2. – P. 235–240. DOI: 10.1002/jmv.25245.

63. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries / A. Kirichenko, D. Kireev, A. Lopatukhin [et al.] // PLOS ONE. – 2022. – Vol. 17, № 1. – P. e0257731. DOI: 10.1371/journal.pone.0257731.

64. Tracing the origin of an imported HIV-1 sub-subtype A6 strain first identified in Zhejiang Province, China / J. Zhang, Q. Fan, L. Ye [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2022. – Vol. 106. – P. 105388. DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105388.

65. Spatiotemporal Characteristics of the HIV-1 CRF02\_AG/CRF63\_02A1 Epidemic in Russia and Central Asia / E.-G. Kostaki, T. Karamitros, M. Bobkova [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2018. – Vol. 34, № 5. – P. 415–420. DOI: 10.1089/aid.2017.0233.

66. Short Communication: Molecular Epidemiology, Phylogeny, and Phylodynamics of CRF63\_02A1, a Recently Originated HIV-1 Circulating Recombinant Form Spreading in Siberia / N. S. Shcherbakova, L. A. Shalamova, E. Delgado [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2014. – Vol. 30, № 9. – P. 912–919. DOI: 10.1089/aid.2014.0075.

67. A Rapid Expansion of HIV-1 CRF63\_02A1 Among Newly Diagnosed HIV-Infected Individuals in the Tomsk Region, Russia / N. M. Gashnikova, V. V. Bogachev, P. B. Baryshev [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2015. – Vol. 31, № 4. – P. 456–460. DOI: 10.1089/aid.2014.0375.

68. Predominance of CRF63\_02A1 and multiple patterns of unique recombinant forms of CRF63\_A1 among individuals with newly diagnosed HIV-1 infection in Kemerovo Oblast, Russia / N. M. Gashnikova, D. P. Zyryanova, E. M. Astakhova [et al.] // Archives of Virology. – 2017. – Vol. 162, № 2. – P. 379–390. DOI: 10.1007/s00705-016-3120-4.

69. HIV-1 resistance to antiretroviral drugs among infected residents of Altai Krai with antiretroviral therapy failure / T. M. Nalimova, N. P. Kriklivaya, V.

E. Ekushov [et al.] // South of Russia: ecology, development. – 2026. – Vol. 20, № 4. – P. 43–56. DOI: 10.18470/1992-1098-2025-4-4.

70. The relevance of using methods of molecular epidemiology of HIV to characterize territorial epidemics: Sakhalin region, Russia / I. P. Osipova, A. V. Totmenin, P. G. Bersenev [et al.] // South of Russia: ecology, development. – 2023. – Vol. 18, № 3. – P. 126–132. DOI: 10.18470/1992-1098-2023-3-126-132.

71. Epidemiological Features of HIV Infection and Molecular Genetic Characteristics of HIV-1 Circulating in the Magadan Region / V. O. Kotova, E. A. Bazykina, L. A. Balakhontseva [et al.] // ЗДОРОВЬЕ НАСЕЛЕНИЯ И СРЕДА ОБИТАНИЯ - ЗНнСО / PUBLIC HEALTH AND LIFE ENVIRONMENT. – 2025. – P. 83. DOI: 10.35627/2219-5238/2025-33-12-83-93.

72. Kireev, D. E. Genomic surveillance of HIV infection in the Russian Federation / D. E. Kireev, A. A. Kirichenko, V. G. Akimkin // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. – 2025. – Vol. 16, № 4. – P. 17–27. DOI: 10.22328/2077-9828-2024-16-4-17-27.

73. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection / E. W. Fiebig, D. J. Wright, B. D. Rawal [et al.] // AIDS. – 2003. – Vol. 17, № 13. – P. 1871–1879. DOI: 10.1097/00002030-200309050-00005.

74. Chéret, A. Acute HIV-1 Infection: Paradigm and Singularity / A. Chéret // Viruses. – 2025. – Vol. 17, № 3. – P. 366. DOI: 10.3390/v17030366.

75. Association between the cytokine storm, immune cell dynamics, and viral replicative capacity in hyperacute HIV infection / D. M. Muema, N. A. Akilimali, O. C. Ndumnego [et al.] // BMC Medicine. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 81. DOI: 10.1186/s12916-020-01529-6.

76. Role of Apoptosis in HIV Pathogenesis / C. Jabea Ekabe, N. Asaba Clinton, E. K. Agyei [et al.] // *Advances in Virology*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 1–10. DOI: 10.1155/2022/8148119.

77. Paim, A. C. Mechanisms of Human Immunodeficiency Virus-Associated Lymphocyte Regulated Cell Death / A. C. Paim, A. D. Badley, N. W. Cummins // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2020. – Vol. 36, № 2. – P. 101–115. DOI: 10.1089/aid.2019.0213.

78. Macrophages: Key Cellular Players in HIV Infection and Pathogenesis / M. Woottum, S. Yan, S. Sayettat [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16, № 2. – P. 288. DOI: 10.3390/v16020288.

79. Toll-like receptor agonists enhance HIV-specific T cell response mediated by plasmacytoid dendritic cells in diverse HIV-1 disease progression phenotypes / M. R. Jimenez-Leon, C. Gasca-Capote, L. Tarancon-Diez [et al.] // *eBioMedicine*. – 2023. – Vol. 91. – P. 104549. DOI: 10.1016/j.ebiom.2023.104549.

80. HIV-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) - Mediating Antibodies Decline while NK Cell Function Increases during Antiretroviral Therapy (ART) / S. S. Jensen, A. Fomsgaard, M. Borggren [et al.] // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 12. – P. e0145249. DOI: 10.1371/journal.pone.0145249.

81. HIV-1–Host Interaction in Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT): Effects on Local Environment and Comorbidities / S. Moretti, I. Schietroma, G. Sberna [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 15. – P. 12193. DOI: 10.3390/ijms241512193.

82. Vanhamel, J. Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? / J. Vanhamel, A. Bruggemans, Z. Debyser // *Journal of Virus Eradication*. – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 3–9. DOI: 10.1016/S2055-6640(20)30275-2.

83. The reservoir of latent HIV / J. Chen, T. Zhou, Y. Zhang [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 945956. DOI: 10.3389/fcimb.2022.945956.

84. Siliciano, J. D. Enhanced Culture Assay for Detection and Quantitation of Latently Infected, Resting CD4+ T-Cells Carrying Replication-Competent Virus in HIV-1-Infected Individuals / J. D. Siliciano, R. F. Siliciano // *Human Retrovirus Protocols* / ed. by T. Zhu. – Totowa, NJ : Humana Press, 2005. – P. 3–15. – (Methods in Molecular Biology ; Vol. 304). DOI: 10.1385/1-59259-907-9:003.

85. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection / K. M. Bruner, A. J. Murray, R. A. Pollack [et al.] // *Nature Medicine*. – 2016. – Vol. 22, № 9. – P. 1043–1049. DOI: 10.1038/nm.4156.

86. Intact proviral DNA assay analysis of large cohorts of people with HIV provides a benchmark for the frequency and composition of persistent proviral DNA / F. R. Simonetti, J. A. White, C. Tumiotto [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117, № 31. – P. 18692–18700. DOI: 10.1073/pnas.2006816117.

87. Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins / H. Imamichi, M. Smith, J. W. Adelsberger [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117, № 7. – P. 3704–3710. DOI: 10.1073/pnas.1917876117.

88. Comparison of viral phenotype and inflammatory biomarker responses in acute HIV-1 subtype A and C infections / S. McInally, D. T. Claiborne, E. El-Badry [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1649731. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1649731.

89. Clinical and laboratory characteristic of acute HIV-infection in adult residents of Novosibirsk region / Ya. S. Ulyanova, N. M. Gashnikova, V. V. Ivlev

[et al.] // Journal Infectology. – 2019. – Vol. 11, № 2. – P. 40–44. DOI: 10.22625/2072-6732-2019-11-2-40-44.

90. V3: HIV's Switch-Hitter / O. Hartley, P. J. Klasse, Q. J. Sattentau [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2005. – Vol. 21, № 2. – P. 171–189. DOI: 10.1089/aid.2005.21.171.

91. Evolution of Multiple Domains of the HIV-1 Envelope Glycoprotein during Coreceptor Switch with CCR5 Antagonist Therapy / Y. Du, E. Wu, X. Gao [et al.] // Microbiology Spectrum. – 2022. – Vol. 10, № 4. – P. e00725-22. DOI: 10.1128/spectrum.00725-22.

92. Dual-tropic HIV type 1 isolates vary dramatically in their utilization of CCR5 and CXCR4 coreceptors / J. Toma, J. M. Whitcomb, C. J. Petropoulos [et al.] // AIDS. – 2010. – Vol. 24, № 14. – P. 2181–2186. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32833c543f.

93. *Short Communication: HIV Type 1 Phenotype, Tropism, and Sequence Patterns: Association and Preference* / X.-N. Dong, X. Chen, Y. Chen [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2005. – Vol. 21, № 3. – P. 234–238. DOI: 10.1089/aid.2005.21.234.

94. Net charge and position 22 of the V3 loop are associated with HIV-1 tropism in recently infected female sex workers in Nairobi, Kenya / H. K. Abisi, L. E. Otieno, E. Irungu [et al.] // Medicine. – 2022. – Vol. 101, № 49. – P. e32024. DOI: 10.1097/MD.00000000000032024.

95. Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: Implications for phenotype conversion / O. Rosen, M. Sharon, S. R. Quadt-Akabayov [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103, № 38. – P. 13950–13955. DOI: 10.1073/pnas.0606312103.

96. Structural Basis for Coreceptor Selectivity by The HIV Type 1 V3 Loop / T. Cardozo, T. Kimura, S. Philpott [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2007. – Vol. 23, № 3. – P. 415–426. DOI: 10.1089/aid.2006.0130.

97. Selected amino acid changes in HIV-1 subtype-C gp41 are associated with specific gp120V3 signatures in the regulation of co-receptor usage / S. Dimonte, M. Babakir-Mina, F. Mercurio [et al.] // Virus Research. – 2012. – Vol. 168, № 1–2. – P. 73–83. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.06.019.

98. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates / A. J. Low, W. Dong, D. Chan [et al.] // AIDS. – 2007. – Vol. 21, № 14. – P. F17–F24. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3282ef81ea.

99. N-Linked Glycosylation Sites Adjacent to and within the V1/V2 and the V3 Loops of Dualtropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate DH12 gp120 Affect Coreceptor Usage and Cellular Tropism / R. A. Ogert, M. K. Lee, W. Ross [et al.] // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75, № 13. – P. 5998–6006. DOI: 10.1128/JVI.75.13.5998-6006.2001.

100. Efficiency of Bridging-Sheet Recruitment Explains HIV-1 R5 Envelope Glycoprotein Sensitivity to Soluble CD4 and Macrophage Tropism / O. O’Connell, A. Repik, J. D. Reeves [et al.] // Journal of Virology. – 2013. – Vol. 87, № 1. – P. 187–198. DOI: 10.1128/JVI.01834-12.

101. Matume, N. D. HIV-1 subtype C predicted co-receptor tropism in Africa: an individual sequence level meta-analysis / N. D. Matume, D. M. Tebit, P. O. Bessong // AIDS Research and Therapy. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 5. DOI: 10.1186/s12981-020-0263-x.

102. Grivel, J.-C. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? / J.-C. Grivel, R. J. Shattock, L. B. Margolis // Journal of Translational Medicine. – 2011. – Vol. 9, № S1. – P. S6. DOI: 10.1186/1479-5876-9-S1-S6.

103. Productive HIV-1 infection of human cervical tissue ex vivo is associated with the secretory phase of the menstrual cycle / E. Saba, M. Origoni, G. Taccagni [et al.] // *Mucosal Immunology*. – 2013. – Vol. 6, № 6. – P. 1081–1090. DOI: 10.1038/mi.2013.2.

104. Characterization of a Human Cervical CD4+ T Cell Subset Coexpressing Multiple Markers of HIV Susceptibility / L. R. McKinnon, B. Nyanga, D. Chege [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187, № 11. – P. 6032–6042. DOI: 10.4049/jimmunol.1101836.

105. Zhou, S. Evolution driven by a varying host environment selects for distinct HIV-1 entry phenotypes and other informative variants / S. Zhou, N. Long, R. Swanstrom // *Frontiers in Virology*. – 2023. – Vol. 3. – P. 1291996. DOI: 10.3389/fviro.2023.1291996.

106. He, S. Relationships Between HIV-Mediated Chemokine Coreceptor Signaling, Cofilin Hyperactivation, Viral Tropism Switch and HIV-Mediated CD4 Depletion / S. He, Y. Wu // *Current HIV Research*. – 2020. – Vol. 17, № 6. – P. 388–396. DOI: 10.2174/1570162X17666191106112018.

107. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Switching: V1/V2 Gain-of-Fitness Mutations Compensate for V3 Loss-of-Fitness Mutations / C. Pastore, R. Nedellec, A. Ramos [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80, № 2. – P. 750–758. DOI: 10.1128/JVI.80.2.750-758.2006.

108. Pastore, C. Intrinsic Obstacles to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Switching / C. Pastore, A. Ramos, D. E. Mosier // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78, № 14. – P. 7565–7574. DOI: 10.1128/JVI.78.14.7565-7574.2004.

109. Humoral Immune Pressure Selects for HIV-1 CXCR4-chemokine Receptor 4-using Variants / N. Lin, O. A. Gonzalez, L. Registre [et al.] // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 8. – P. 237–247. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.04.040.

110. Tracking coreceptor switch of the transmitted/founder HIV-1 identifies co-evolution of HIV-1 antigenicity, coreceptor usage and CD4 subset targeting: the RV217 acute infection cohort study / M. H. Marichannegowda, M. Zemil, L. Wieczorek [et al.] // *eBioMedicine*. – 2023. – Vol. 98. – P. 104867. DOI: 10.1016/j.ebiom.2023.104867.

111. Frequent Inpatient Recombination between Human Immunodeficiency Virus Type 1 R5 and X4 Envelopes: Implications for Coreceptor Switch / M. Mild, J. Esbjörnsson, E. M. Fenyö [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81, № 7. – P. 3369–3376. DOI: 10.1128/JVI.01295-06.

112. Richman, D. D. The Impact of the Syncytium-Inducing Phenotype of Human Immunodeficiency Virus on Disease Progression / D. D. Richman, S. A. Bozzette // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1994. – Vol. 169, № 5. – P. 968–974. DOI: 10.1093/infdis/169.5.968.113. Emergence and Persistence of CXCR4-Tropic HIV-1 in a Population of Men from the Multicenter AIDS Cohort Study / J. C. Shepherd, L. P. Jacobson, W. Qiao [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 198, № 8. – P. 1104–1112. DOI: 10.1086/591623.

114. Relationship Between HIV Coreceptor Tropism and Disease Progression in Persons With Untreated Chronic HIV Infection / M. B. Goetz, R. Leduc, J. R. Kostman [et al.] // *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 259–266. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181989a8b.

115. Emergence of CXCR4-tropic HIV-1 variants followed by rapid disease progression in hemophilic slow progressors / T. Hayashida, K. Tsuchiya, Y. Kikuchi [et al.] // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 5. – P. e0177033. DOI: 10.1371/journal.pone.0177033.

116. Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation: / M. D. Hazenberg, S. A. Otto,

D. Hamann [et al.] // AIDS. – 2003. – Vol. 17, № 10. – P. 1419–1424. DOI: 10.1097/00002030-200307040-00001.

117. The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients / M. M. Santoro, D. Armenia, L. Fabeni [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2012. – Vol. 18, № 8. – P. E289–E298. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03905.x.

118. Validation of an enhanced sensitivity Trofile<sup>TM</sup> HIV-1 co-receptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5 / L. Trinh, D. Han, W. Huang [et al.] // Journal of the International AIDS Society. – 2008. – Vol. 11, № Suppl 1. – P. P197. DOI: 10.1186/1758-2652-11-S1-P197.

119. Lin, N. H. Tropism testing in the clinical management of HIV-1 infection: / N. H. Lin, D. R. Kuritzkes // Current Opinion in HIV and AIDS. – 2009. – Vol. 4, № 6. – P. 481–487. DOI: 10.1097/COH.0b013e328331b929.

120. Tropismo del VIH. Técnicas disponibles y utilidad / F. Gutiérrez, J. Carlos Rodríguez, F. García [et al.] // Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. – 2011. – Vol. 29. – P. 45–50. DOI: 10.1016/S0213-005X(11)70043-X.

121. Comparison of Genotypic and Phenotypic HIV Type 1 Tropism Assay: Results from the Screening Samples of Cenicriviroc Study 202, a Randomized Phase II Trial in Treatment-Naive Subjects / R. M. Kagan, E. P. Johnson, M. F. Siaw [et al.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2014. – Vol. 30, № 2. – P. 151–159. DOI: 10.1089/aid.2013.0123.

122. HIV-1 Tropism Determination Using a Phenotypic Env Recombinant Viral Assay Highlights Overestimation of CXCR4-Usage by Genotypic Prediction Algorithms for CRRF01\_AE and CRF02\_AG / M. Mulinge, M. Lemaire, J.-Y. Servais [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. e60566. DOI: 10.1371/journal.pone.0060566.

123. Crous, S. Appraising the performance of genotyping tools in the prediction of coreceptor tropism in HIV-1 subtype C viruses / S. Crous, R. K. Shrestha, S. A. Travers // *BMC Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 203. DOI: 10.1186/1471-2334-12-203.

124. Performance of Geno2Pheno[coreceptor] to infer coreceptor use in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype A / I. Vicenti, A. Lai, A. Giannini [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2019. – Vol. 111. – P. 12–18. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.12.007.

125. Genotypic Prediction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF02-AG Tropism / S. Raymond, P. Delobel, M. Mavigner [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – Vol. 47, № 7. – P. 2292–2294. DOI: 10.1128/JCM.02439-08.

126. Le Clerc, S. Large-Scale “OMICS” Studies to Explore the Physiopathology of HIV-1 Infection / S. Le Clerc, S. Limou, J.-F. Zagury // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – Vol. 10. – P. 799. DOI: 10.3389/fgene.2019.00799.

127. Omic Technologies in HIV: Searching Transcriptional Signatures Involved in Long-Term Non-Progressor and HIV Controller Phenotypes / E. De La Torre-Tarazona, R. Ayala-Suárez, F. Díez-Fuertes [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 926499. DOI: 10.3389/fimmu.2022.926499.

128. The Proteomic Characterization of Plasma or Serum from HIV-Infected Patients / N. A. Haverland, L. M. Villeneuve, P. Ciborowski [et al.]. – New York, NY : Springer New York, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-3046-3\_20.

129. Olivier, C. Metabolic insights into HIV/TB co-infection: an untargeted urinary metabolomics approach / C. Olivier, L. Luies // *Metabolomics*. – 2024. – Vol. 20, № 4. – P. 78. DOI: 10.1007/s11306-024-02148-5.

130. Metagenomic analysis of blood microbiota alterations: insights into HIV progression and immune restoration / Y. Chen, R. Zhang, J. Wen [et al.] //

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2025. – Vol. 15. – P. 1619059.  
DOI: 10.3389/fcimb.2025.1619059.

131. Human immunodeficiency virus and antiretroviral therapies exert distinct influences across diverse gut microbiomes / K. S. Jabbar, S. Priya, J. Xu [et al.] // Nature Microbiology. – 2025. – Vol. 10, № 11. – P. 2720–2735. DOI: 10.1038/s41564-025-02157-7.

132. HIV-1 Infection Alters the Viral Composition of Plasma in Men Who Have Sex with Men / K. Liu, Y. Li, R. Xu [et al.] // mSphere. – 2021. – Vol. 6, № 3. – P. e00081-21. DOI: 10.1128/mSphere.00081-21.

133. Plasma Virome Reveals Blooms and Transmission of Anellovirus in Intravenous Drug Users with HIV-1, HCV, and/or HBV Infections / Y. Li, L. Cao, M. Ye [et al.] // Microbiology Spectrum. – 2022. – Vol. 10, № 4. – P. e01447-22. DOI: 10.1128/spectrum.01447-22.

134. Short-term antiretroviral therapy may not correct the dysregulations of plasma virome and cytokines induced by HIV-1 infection / Y. Ma, M. Zhang, Z. Wang [et al.] // Virulence. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 2467168. DOI: 10.1080/21505594.2025.2467168.

135. Alterations of the gut microbiome in HIV infection highlight human anelloviruses as potential predictors of immune recovery / C. Boukadida, A. Peralta-Prado, M. Chávez-Torres [et al.] // Microbiome. – 2024. – Vol. 12, № 1. – P. 204. DOI: 10.1186/s40168-024-01925-7.

136. Longitudinal cervicovaginal bacteriome and virome alterations associate with discordant shedding and ART duration in women living with HIV in Peru / E. A. Kaelin, C. Mitchell, J. Soria [et al.] // Nature Communications. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 7904. DOI: 10.1038/s41467-025-63158-y.

137. Temporal proteomic analysis of HIV infection reveals remodelling of the host phosphoproteome by lentiviral Vif variants / E. J. Greenwood, N. J.

Matheson, K. Wals [et al.] // *eLife*. – 2016. – Vol. 5. – P. e18296. DOI: 10.7554/eLife.18296.

138. Global post-translational modification profiling of HIV-1-infected cells reveals mechanisms of host cellular pathway remodeling / J. R. Johnson, D. C. Crosby, J. F. Hultquist [et al.] // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 39, № 2. – P. 110690. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110690.

139. Dynamics of the blood plasma proteome during hyperacute HIV-1 infection / J. Nazziwa, E. Freyhult, M.-G. Hong [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 10593. DOI: 10.1038/s41467-024-54848-0.

140. Profiling of proteome changes in plasma of HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy / T. Li, H. Qu, H. Ding [et al.] // *PROTEOMICS – Clinical Applications*. – 2022. – Vol. 16, № 6. – P. 2100099. DOI: 10.1002/prca.202100099.

141. Distinct inflammation-related proteins associated with T cell immune recovery during chronic HIV-1 infection / L.-Y. Wan, H.-H. Huang, C. Zhen [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12, № 1. – P. 2150566. DOI: 10.1080/22221751.2022.2150566.

142. Quantitative proteomics analysis reveals unique but overlapping protein signatures in HIV infections / M. Al-Mozaini, A. Alzahrani, I. Alsharif [et al.] // *Journal of Infection and Public Health*. – 2021. – Vol. 14, № 6. – P. 795–802. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.03.009.

143. Distinct Plasma Protein Profiles Distinguish Faster from Slower Disease Progression in HIV-1 and HIV-2 infections / E. Johansson, J. Nazziwa, E. Freyhult [et al.] // *HIV/AIDS*. – 2024. DOI: 10.1101/2024.07.23.24310457.

144. Plasma metabolomics by nuclear magnetic resonance reveals biomarkers and metabolic pathways associated with the control of HIV-1 infection/progression / L. G. Gómez-Archila, M. Palomino-Schätzlein, W. Zapata-

Builes [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1204273. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1204273.

145. A taxon-specific measurement of disruption in a multi-modal study of microbiomes and metabolomes reveals system-wide dysbiosis preceding HIV-1 infection / F. Fouladi, Y. Chen, S. Bera [et al.] // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 10204. DOI: 10.1038/s41467-025-64822-z.

146. Next-Generation Sequencing Reveals HIV-1-Mediated Suppression of T Cell Activation and RNA Processing and Regulation of Noncoding RNA Expression in a CD4<sup>+</sup> T Cell Line / S. T. Chang, P. Sova, X. Peng [et al.] // *mBio*. – 2011. – Vol. 2, № 5. – P. e00134-11. DOI: 10.1128/mBio.00134-11.

147. Proteo-Transcriptomic Dynamics of Cellular Response to HIV-1 Infection / M. Golumbeanu, S. Desfarges, C. Hernandez [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 213. DOI: 10.1038/s41598-018-36135-3.

148. Nef-induced differential gene expression in primary CD4<sup>+</sup> T cells following infection with HIV-1 isolates / R. L. Furler, A. Ali, O. O. Yang [et al.] // *Virus Genes*. – 2019. – Vol. 55, № 4. – P. 541–544. DOI: 10.1007/s11262-019-01670-2.

149. HIV-1 Infection Transcriptomics: Meta-Analysis of CD4<sup>+</sup> T Cells Gene Expression Profiles / A. V. C. Coelho, R. Gratton, J. P. B. D. Melo [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 244. DOI: 10.3390/v13020244.

150. Gene dysregulation in acute HIV-1 infection – early transcriptomic analysis reveals the crucial biological functions affected / E. Parker, M. A. Judge, L. Pastor [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1074847. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1074847.

151. Transcriptome Sequencing of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Elite Controller-Long Term Non Progressors / F. Díez-Fuertes, H. E. De La

Torre-Tarazona, E. Calonge [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 14265. DOI: 10.1038/s41598-019-50642-x.

152. Transcriptome Analysis Identifies Altered Biological Processes and Novel Markers in Human Immunodeficiency Virus-1 Long-Term Non-Progressors / D. Lee, C.-H. Yoon, S. Y. Choi [et al.] // *Infection & Chemotherapy*. – 2021. – Vol. 53, № 3. – P. 489. DOI: 10.3947/ic.2021.0031.

153. Transcriptomic study reveals changes of lncRNAs in PBMCs from HIV-1 patients before and after ART / Y. Zhou, Y. Huang, X. Chen [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 22493. DOI: 10.1038/s41598-023-49595-z.

154. Transcriptomic crosstalk between viral and host factors drives aberrant homeostasis of T-cell proliferation and cell death in HIV-infected immunological non-responders / S. Tang, Y. Lu, F. Sun [et al.] // *Journal of Infection*. – 2024. – Vol. 88, № 5. – P. 106151. DOI: 10.1016/j.jinf.2024.106151.

155. Transcriptomic HIV-1 reservoir profiling reveals a role for mitochondrial functionality in HIV-1 latency / S. Man, J. Jansen, S. Kroeze [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2025. – Vol. 21, № 1. – P. e1012822. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012822.

156. Multi-omics single-cell analysis reveals key regulators of HIV-1 persistence and aberrant host immune responses in early infection / D. Lee, S. Y. Choi, S.-I. Shin [et al.] // *eLife*. – 2025. – Vol. 14. – P. RP104856. DOI: 10.7554/eLife.104856.

157. Prothymosin- $\alpha$  enhances phosphatase and tensin homolog expression and binds with tripartite motif-containing protein 21 to regulate Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in human bladder cancer / Y. Tsai, Y. Jou, H. Tsai [et al.] // *Cancer Science*. – 2019. – Vol. 110, № 4. – P. 1208–1219. DOI: 10.1111/cas.13963.

158. Single-cell transcriptomics identifies prothymosin  $\alpha$  restriction of HIV-1 in vivo / A. Geretz, P. K. Ehrenberg, R. J. Clifford [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2023. – Vol. 15, № 707. – P. eadg0873. DOI: 10.1126/scitranslmed.adg0873.

159. Remodeling of the chromatin landscape in peripheral blood cells in patients with severe Delta COVID-19 / V. E. Akimov, D. I. Tychinin, O. A. Antonova [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1415317. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1415317.

160. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM / H. Li // *arXiv*. – 2013. DOI: 10.48550/ARXIV.1303.3997.

161. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar / N. D. Grubaugh, K. Gangavarapu, J. Quick [et al.] // *Genome Biology*. – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 8. DOI: 10.1186/s13059-018-1618-7.

162. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. – 2021. – Vol. 38, № 7. – P. 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120..

163. Larsson, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets / A. Larsson // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 22. – P. 3276–3278. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu531.

164. Katoh, K. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization / K. Katoh, J. Rozewicki, K. D. Yamada // *Briefings in Bioinformatics*. – 2019. – Vol. 20, № 4. – P. 1160–1166. DOI: 10.1093/bib/bbx108.

165. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis / J. Trifinopoulos, L.-T. Nguyen, A. von Haeseler [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, № W1. – P. W232–W235. DOI: 10.1093/nar/gkw256.

166. Letunic, I. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool / I. Letunic, P. Bork // *Nucleic Acids Research*. – 2024. – Vol. 52, № W1. – P. W78–W82. DOI: 10.1093/nar/gkae268.

167. A Computer Program Designed to Screen Rapidly for HIV Type 1 Intersubtype Recombinant Sequences / A. C. Siepel, A. L. Halpern, C. Macken [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1995. – Vol. 11, № 11. – P. 1413–1416. DOI: 10.1089/aid.1995.11.1413.

168. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage / T. Lengauer, O. Sander, S. Sierra [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2007. – Vol. 25, № 12. – P. 1407–1410. DOI: 10.1038/nbt1371.

169. Reliable Genotypic Tropism Tests for the Major HIV-1 Subtypes / K. Cashin, L. R. Gray, K. L. Harvey [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 8543. DOI: 10.1038/srep08543.

170. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics / P. J. A. Cock, T. Antao, J. T. Chang [et al.] // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25, № 11. – P. 1422–1423. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp163.

171. Cao, D.-S. propy: a tool to generate various modes of Chou's PseAAC / D.-S. Cao, Q.-S. Xu, Y.-Z. Liang // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, № 7. – P. 960–962. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt072.

172. Matthews, B. W. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme / B. W. Matthews // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. – 1975. – Vol. 405, № 2. – P. 442–451. DOI: 10.1016/0005-2795(75)90109-9.

173. Chen, X. HIV-1 tropism prediction by the XGboost and HMM methods / X. Chen, Z.-X. Wang, X.-M. Pan // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 9997. DOI: 10.1038/s41598-019-46420-4.

174. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis / Y. Hao, T. Stuart, M. H. Kowalski [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2024. – Vol. 42, № 2. – P. 293–304. DOI: 10.1038/s41587-023-01767-y.
175. Doublet identification in single-cell sequencing data using scDblFinder / P.-L. Germain, A. Lun, C. Garcia Meixide [et al.] // *F1000Research*. – 2022. – Vol. 10. – P. 979. DOI: 10.12688/f1000research.73600.2.
176. Integrated analysis of multimodal single-cell data / Y. Hao, S. Hao, E. Andersen-Nissen [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184, № 13. – P. 3573–3587.e29. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.048.
177. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters / G. Yu, L.-G. Wang, Y. Han [et al.] // *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. – 2012. – Vol. 16, № 5. – P. 284–287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.
178. Jin, S. CellChat for systematic analysis of cell–cell communication from single-cell transcriptomics / S. Jin, M. V. Plikus, Q. Nie // *Nature Protocols*. – 2025. – Vol. 20, № 1. – P. 180–219. DOI: 10.1038/s41596-024-01045-4.
179. Practical bioinformatics pipelines for single-cell RNA-seq data analysis / H. Jiangping, L. Lihui, C. Jiekai [et al.] // *Biophysics Reports*. – 2022. – Vol. 8, № 3. – P. 158–169. DOI: 10.52601/bpr.2022.210041.
180. Single cell transcriptome sequencing of stimulated and frozen human peripheral blood mononuclear cells / C. Derbois, M.-A. Palomares, J.-F. Deleuze [et al.] // *Scientific Data*. – 2023. – Vol. 10, № 1. – P. 433. DOI: 10.1038/s41597-023-02348-z.
181. Okoye, A. A. CD 4+ T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure / A. A. Okoye, L. J. Picker // *Immunological Reviews*. – 2013. – Vol. 254, № 1. – P. 54–64. DOI: 10.1111/imr.12066.

182. CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> central memory T cells contribute to HIV persistence in HIV-infected individuals on long-term ART / C.-B. Song, L.-L. Zhang, X. Wu [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 95. DOI: 10.1186/s12967-020-02245-8.

183. High CCR5 Density on Central Memory CD4<sup>+</sup> T Cells in Acute HIV-1 Infection Is Mostly Associated with Rapid Disease Progression / X. Yang, Y. Jiao, R. Wang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e49526. DOI: 10.1371/journal.pone.0049526.

184. Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Promotes HIV-1 Infection in Activated and Resting Memory CD4<sup>+</sup> T Cells / L. Y. Yim, K. S. Lam, T.-Y. Luk [et al.] // *Journal of Virology*. – 2023. – Vol. 97, № 5. – P. e00270-23. DOI: 10.1128/jvi.00270-23.

185. Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes / X. Pan, H.-M. Baldauf, O. T. Keppler [et al.] // *Cell Research*. – 2013. – Vol. 23, № 7. – P. 876–885. DOI: 10.1038/cr.2013.74.

186. A systematic comparison of FOSL1, FOSL2 and BATF-mediated transcriptional regulation during early human Th17 differentiation / A. Shetty, S. K. Tripathi, S. Junttila [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Vol. 50, № 9. – P. 4938–4958. DOI: 10.1093/nar/gkac256.

187. Novel STIM1-dependent control of Ca<sup>2+</sup> clearance regulates NFAT activity during T-cell activation / E. Samakai, R. Hooper, K. A. Martin [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2016. – Vol. 30, № 11. – P. 3878–3886. DOI: 10.1096/fj.201600532R.

188. Künzli, M. CD4<sup>+</sup> T cell memory / M. Künzli, D. Masopust // *Nature Immunology*. – 2023. – Vol. 24, № 6. – P. 903–914. DOI: 10.1038/s41590-023-01510-4.

189. HIV rapidly targets a diverse pool of CD4+ T cells to establish productive and latent infections / P. Gantner, S. Buranapraditkun, A. Pagliuzza [et al.] // *Immunity*. – 2023. – Vol. 56, № 3. – P. 653–668.e5. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.01.030.

190. Long-term antiretroviral therapy initiated in acute HIV infection prevents residual dysfunction of HIV-specific CD8+ T cells / H. Takata, J. C. Kakazu, J. L. Mitchell [et al.] // *eBioMedicine*. – 2022. – Vol. 84. – P. 104253. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104253.

191. Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point / Z. M. Ndhlovu, P. Kanya, N. Mewalal [et al.] // *Immunity*. – 2015. – Vol. 43, № 3. – P. 591–604. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.08.012.

192. Pallikkuth, S. The role of interleukin-21 in HIV infection / S. Pallikkuth, A. Parmigiani, S. Pahwa // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2012. – Vol. 23, № 4–5. – P. 173–180. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2012.05.004.

193. NEAT1 Long Noncoding RNA and Paraspeckle Bodies Modulate HIV-1 Posttranscriptional Expression / Q. Zhang, C.-Y. Chen, V. S. R. K. Yedavalli [et al.] // *mBio*. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. e00596-12. DOI: 10.1128/mBio.00596-12.

194. REGULATOR OF G protein signaling 1 is a potential target in gastric cancer and impacts tumor-associated macrophages / M. Wu, X. Xu, C. Yang [et al.] // *Cancer Science*. – 2024. – Vol. 115, № 4. – P. 1085–1101. DOI: 10.1111/cas.16083.

195. Kulpa, D. A. The emerging role of HLA-C in HIV-1 infection: HLA-C in HIV-1 infection / D. A. Kulpa, K. L. Collins // *Immunology*. – 2011. – Vol. 134, № 2. – P. 116–122. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03474.x.

196. Single-cell analysis of immune cell transcriptome during HIV-1 infection and therapy / J. Pollara, S. Khanal, R. W. Edwards [et al.] // *BMC Immunology*. – 2022. – Vol. 23, № 1. – P. 48. DOI: 10.1186/s12865-022-00523-2.
197. CSNAP Is a Stoichiometric Subunit of the COP9 Signalosome / S. Rozen, M. G. Füzesi-Levi, G. Ben-Nissan [et al.] // *Cell Reports*. – 2015. – Vol. 13, № 3. – P. 585–598. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.021.
198. Kinoshita, S. M. COP9 Signalosome Component JAB1/CSN5 Is Necessary for T Cell Signaling through LFA-1 and HIV-1 Replication / S. M. Kinoshita, P. O. Krutzik, G. P. Nolan // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. e41725. DOI: 10.1371/journal.pone.0041725.
199. GRAMD1B is a regulator of lipid homeostasis, autophagic flux and phosphorylated tau / D. Acosta Ingram, E. Turkes, T. Y. Kim [et al.] // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 3312. DOI: 10.1038/s41467-025-58585-w.
200. GGAPs, a New Family of Bifunctional GTP-Binding and GTPase-Activating Proteins / C. Xia, W. Ma, L. J. Stafford [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2003. – Vol. 23, № 7. – P. 2476–2488. DOI: 10.1128/MCB.23.7.2476-2488.2003.
201. Transcriptional and chromatin profiling of human blood innate lymphoid cell subsets sheds light on HIV -1 pathogenesis / Y. Wang, L. Lifshitz, N. J. Silverstein [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2023. – Vol. 42, № 16. – P. e114153. DOI: 10.15252/embj.2023114153.
202. Monocytes across life span in HIV infection: lights and shadows / A. Neri, G. Olivieri, C. Pighi [et al.] // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2025. – Vol. 20, № 2. – P. 133–144. DOI: 10.1097/COH.0000000000000910.

203. Wallis, Z. K. Monocytes in HIV and SIV Infection and Aging: Implications for Inflamm-Aging and Accelerated Aging / Z. K. Wallis, K. C. Williams // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 409. DOI: 10.3390/v14020409.

204. Alrubayyi, A. Natural killer cells during acute HIV-1 infection: clues for HIV-1 prevention and therapy / A. Alrubayyi, S. Rowland-Jones, D. Peppas // *AIDS*. – 2022. – Vol. 36, № 14. – P. 1903–1915. DOI: 10.1097/QAD.0000000000003319.

205. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Promotes Increased Proportions of the Highly Permissive Th17-like Cell Profile during HIV Infection / C. Trifone, L. Baquero, A. Czernikier [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 10. – P. 2218. DOI: 10.3390/v14102218.

206. Galectin-9 Mediates HIV Transcription by Inducing TCR-Dependent ERK Signaling / F. Colomb, L. B. Giron, T. A. Premeaux [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 267. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00267.

207. CD4+ cell count recovery after combined antiretroviral therapy in the modern combined antiretroviral therapy era / H. Roul, M. Mary-Krause, J. Ghosn [et al.] // *AIDS*. – 2018. – Vol. 32, № 17. – P. 2605–2614. DOI: 10.1097/QAD.0000000000002010.