

**ОТЗЫВ на автореферат диссертации Елфимова Кирилла Артемовича
«Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии
ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02А6 ВИЧ-1», представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10.**

«Вирусология»

Актуальность темы исследования

ВИЧ-1 характеризуется чрезвычайно высокой генетической изменчивостью, обусловленной высокой скоростью мутационного процесса, рекомбинацией и последующим отбором возникающих вариантов. Следствием этого является формирование многочисленных субтипов, суб-субтипов, циркулирующих и уникальных рекомбинантных форм, способных различаться не только по молекулярно-генетическим признакам, но и по отдельным биологическим свойствам. Поэтому изучение генетического разнообразия ВИЧ-1 и его связи с вирусологическим фенотипом остается одним из актуальных направлений современной молекулярной вирусологии.

Особое значение подобные исследования имеют применительно к генетическим вариантам ВИЧ-1, эпидемически значимым для Российской Федерации. Суб-субтип А6 длительное время занимает важное место в структуре российской эпидемии ВИЧ-инфекции, а сформировавшаяся в результате рекомбинационных процессов циркулирующая рекомбинантная форма CRF63_02А6 получила широкое распространение в Сибирском Федеральном Округе (СФО). Продолжающаяся совместная циркуляция различных вариантов ВИЧ-1 создает предпосылки для возникновения новых рекомбинантных форм и дальнейшего изменения молекулярно-генетической структуры вирусной популяции.

В связи с этим диссертационная работа К.А. Елфимова, посвященная комплексному исследованию молекулярно-генетических и вирусологических характеристик острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02А6 ВИЧ-1, является актуальной и представляет значительный научный интерес.

Целью представленного исследования являлась комплексная характеристика молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной указанными генетическими вариантами ВИЧ-1.

Для достижения поставленной цели автором использован широкий комплекс взаимодополняющих методов. Выполнены получение последовательностей практически полных геномов ВИЧ-1 методом секвенирования нового поколения, генотипирование и

филогенетический анализ клинических изолятов, выделение инфекционных штаммов в культуре клеток и экспериментальное определение их репликативных свойств и корецепторной тропности. Кроме того, проведена количественная характеристика провирусной ДНК методом цифровой ПЦР и выполнено секвенирование транскрипта единичных мононуклеаров периферической крови.

Следует положительно оценить формирование когорты пациентов именно в острой стадии ВИЧ-инфекции. В исследование включались лица с документированным предполагаемым сроком инфицирования не более четырех недель, отрицательными или неопределенными результатами иммуноблоттинга и высокой вирусной нагрузкой. Это позволило исследовать биологические свойства вируса и процессы взаимодействия вируса с хозяином на раннем этапе инфекционного процесса.

Особый интерес представляет молекулярно-генетическая характеристика полученных клинических изолятов. Генотипирование по последовательностям практически полных геномов показало преобладание CRF63_02A6, наряду с суб-субтипом A6 и несколькими уникальными рекомбинантными формами. Наличие в исследуемой выборке URF дополнительно демонстрирует динамичность генетической структуры циркулирующей популяции ВИЧ-1 и обоснованность использования генотипирования по практически полногеномным последовательностям, а не отдельным фрагментам генома ВИЧ-1.

Методически важным представляется проведенный автором анализ происхождения участка гена *env* ВИЧ, включающего V3-петлю gp120, у уникальных рекомбинантных форм. Показано, что непосредственно область V3 у исследованных URF не содержала точек рекомбинации. В зависимости от происхождения данного участка рекомбинантные изоляты были включены в соответствующие группы A6 или CRF63_02A6 при последующем анализе корецепторной тропности. Подобный подход представляется обоснованным, поскольку функциональный фенотип в данном случае определяется локальной генетической структурой участка генома, непосредственно связанного с исследуемым признаком.

Существенное место в диссертационной работе занимает изучение корецепторной тропности ВИЧ-1. Фенотипическое исследование показало наличие в общей выборке всех основных вариантов тропности — R5, X4 и R5/X4. Особенно интересным является обнаружение вирусов, способных использовать CXCR4, уже у пациентов в острой стадии ВИЧ-инфекции. В основной когорте X4- или R5/X4-тропные варианты были выявлены у 8 из 14 пациентов.

Полученный результат имеет как фундаментальное, так и практическое значение. Он показывает, что представления о преимущественном распространении R5-тропных вариантов на ранних стадиях инфекции, сформированные в значительной мере на материалах других субтипов, не могут автоматически распространяться на все генетические варианты ВИЧ-1. Биологические свойства CRF63_02A6 должны оцениваться непосредственно на экспериментальном материале, что и было осуществлено в настоящей работе.

Важным достоинством исследования является сопоставление экспериментального фенотипа с результатами генотипического прогнозирования. Автором проведена сравнительная оценка ряда существующих алгоритмов и правил определения тропности по последовательности V3-петли gp120. Установлено, что многие из них обеспечивают высокую точность при исследовании широко распространенных генетических вариантов ВИЧ-1, но существенно уступают при анализе A6 и особенно CRF63_02A6.

Так, для CRF63_02A6 наилучшая точность существующих подходов составляла около 72 %, причем во многих случаях повышение специфичности сопровождалось существенным снижением чувствительности. Эти данные убедительно показывают ограниченность универсального подхода к анализу генетически неоднородной вирусной популяции и необходимость учета эволюционной истории конкретного варианта вируса.

Для решения данной задачи автором разработана модель HIV-V3Augur, основанная на субтип-специфическом прогнозировании корецепторной тропности.

Особенно интересным с молекулярно-эволюционной точки зрения представляется принцип построения модели для CRF63_02A6. При ее создании было учтено происхождение области гена *env* данного рекомбинантного варианта от CRF02_AG. Таким образом, эволюционная история соответствующего участка генома использована не только для классификации вируса, но и непосредственно при построении алгоритма прогнозирования его функционального фенотипа.

Практическим результатом работы является создание автономного программного приложения HIV-V3Augur с графическим интерфейсом, позволяющего проводить генотипирование и прогнозирование тропности по нуклеотидной последовательности V3. Автор корректно рассматривает разработанную программу как вспомогательный инструмент и отмечает необходимость ее дальнейшей валидации на расширенных независимых выборках.

Важный раздел диссертационной работы посвящен количественной характеристике провирусного пула ВИЧ-1. С применением цифровой ПЦР показано, что уже на ранних

стадиях инфекционного процесса формируется значительный и гетерогенный пул провирусной ДНК.

С молекулярно-генетической точки зрения существенно, что для анализа были адаптированы праймеры и зонды с учетом последовательностей российских генетических вариантов ВИЧ-1. Высокая вариабельность вирусного генома способна влиять не только на результаты филогенетического анализа или генотипического прогнозирования, но и на эффективность амплификации нуклеиновых кислот-мишеней. Поэтому адаптация молекулярно-диагностического подхода к исследуемым геновариантам повышает методическую значимость выполненной работы.

Дополняет исследование анализ транскриптома единичных клеток периферической крови. Он позволил выявить выраженную перестройку клеточного состава и профилей экспрессии генов при острой ВИЧ-инфекции. Показаны признаки генерализованной иммунной активации, изменение представленности отдельных популяций Т-лимфоцитов и NK-клеток, выраженные транскрипционные изменения в неклассических моноцитах и перестройка межклеточных сигнальных взаимодействий.

Таким образом, работа объединяет исследование генома вируса, его экспериментального фенотипа, структуры провирусного пула и молекулярной реакции клеток организма хозяина. Это позволяет перейти от простой регистрации генетических различий между вариантами ВИЧ-1 к анализу возможных функциональных последствий этих различий.

Достоверность полученных результатов определяется использованием современных методов секвенирования, филогенетического и рекомбинационного анализа, экспериментальным исследованием биологических свойств клинических изолятов, фенотипической верификацией корцепторной тропности и использованием современных статистических и биоинформатических подходов. Важным достоинством является сопоставление результатов *in silico* с экспериментальными данными *in vitro*.

Автореферат последовательно и достаточно полно отражает содержание диссертации, научную новизну, методологию, основные результаты и практическую значимость работы. Положения, выносимые на защиту, соответствуют представленным экспериментальным данным. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых научных изданиях и представлены на профильных научных конференциях.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний к представленному автореферату нет. Вместе с тем высокая интенсивность рекомбинационных процессов у ВИЧ-1 закономерно ставит вопрос об устойчивости субтип-специфических алгоритмов прогнозирования к дальнейшей эволюции вирусной популяции. В исследовании автор обоснованно учитывает происхождение именно области *env/V3* у выявленных уникальных рекомбинантных форм и относит их к соответствующей группе независимо от мозаичной структуры остальных участков генома. В связи с этим представляет интерес мнение автора, следует ли при дальнейшем развитии HIV-V3Augur ориентироваться преимущественно на локальное эволюционное происхождение анализируемого участка V3, а не на формальную классификацию всего вирусного генома, особенно при появлении новых URF и CRF. Также интересно, потребует ли продолжающаяся эволюция CRF63_02A6 периодического переобучения модели на новых последовательностях.

Другой вопрос связан с внутрипопуляционной изменчивостью ВИЧ-1. Корецепторная тропность может определяться не только доминирующим вариантом вирусной популяции, но и присутствием минорных вариантов V3, потенциально способных использовать CXCR4. В связи с этим хотелось бы уточнить, насколько, по мнению автора, учет частот отдельных вариантов V3 при глубоком секвенировании способен повысить информативность генотипического прогнозирования тропности и может ли дальнейшее развитие HIV-V3Augur предусматривать анализ не одной результирующей последовательности, а структуры внутрипациентной вирусной популяции.

Высказанные вопросы имеют дискуссионный и перспективный характер, соответствуют направлениям дальнейшего развития исследования и не снижают научной и практической значимости выполненной работы.

Заключение

Диссертационная работа Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1» представляет собой завершенное самостоятельное научно-квалификационное исследование, в котором решена актуальная научная задача, имеющая существенное значение для современной вирусологии.

В работе получены новые данные о молекулярно-генетических и биологических свойствах эпидемически значимых для Российской Федерации вариантов ВИЧ-1, выполнен анализ практически полных вирусных геномов и рекомбинантных форм, исследованы репликативные свойства и корецепторная тропность клинических изолятов, разработан

субтип-специфический инструмент ее генотипического прогнозирования, количественно охарактеризован ранний провирусный пул и получены новые сведения о молекулярных изменениях иммунных клеток.

Особого внимания заслуживает продемонстрированная в работе связь между генетической структурой вируса и его функциональным фенотипом. Учет эволюционного происхождения отдельных участков генома при разработке генотипического предиктора представляет методически обоснованный подход к исследованию генетически неоднородной и активно эволюционирующей вирусной популяции.

По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, методическому уровню, достоверности полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Елфимов Кирилл Артемович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

В.н.с лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН,
д.б.н. Игорь Викторович Бабкин
e-mail: babkin@lbio.ru
Тел. +7 (383)363-51-57

 И.В. Бабкин
01.09.2026

Подпись И.В. Бабкина заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН



 Е. Б. Логашенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН),
Новосибирск, 630090, пр-т академика Лаврентьева, д.8.
Тел. +7(383)363-51-50; e-mail: niboch@lbio.ru