

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертации Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы исследования не вызывает сомнений. ВИЧ-инфекция остаётся одной из самых серьёзных глобальных проблем здравоохранения, а в Российской Федерации эпидемиологическая ситуация продолжает оставаться напряжённой. Особого внимания заслуживают генетические варианты ВИЧ-1, доминирующие на постсоветском пространстве: суб-субтип А6 и циркулирующая рекомбинантная форма CRF63_02A6. В Сибирском регионе доля CRF63_02A6 среди вновь выявленных случаев достигает 80% и более, однако молекулярно-биологические и вирусологические характеристики этих вариантов, особенно в острую стадию инфекции, оставались практически не изученными. В частности, отсутствовали данные о тропности, провирусном ландшафте и транскриптомных перестройках иммунных клеток при инфицировании этими геновариантами. Представленная работа восполняет этот пробел, что определяет её высокую актуальность как в фундаментальном, так и в прикладном аспектах.

Проведена комплексная вирусологическая характеристика клинических изолятов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 и CRF63_02A6, выделенных от пациентов в острой стадии инфекции. Показано, что изоляты CRF63_02A6 обладают более высокой репликативной активностью *in vitro* (фенотип rapid/high) по сравнению с изолятами суб-субтипа А6. При этом установлена неожиданно высокая частота выявления штаммов с X4- и двойной R5/X4-тропностью (у 8 из 14 пациентов) уже в острую фазу, что противоречит классической парадигме о доминировании R5-тропных вариантов на ранних стадиях инфекции. Этот результат имеет важное клинико-прогностическое значение.

Разработана и валидирована оригинальная модель машинного обучения (HIV-V3Augur) для генотипического предсказания тропности изолятов ВИЧ-1, адаптированная для суб-субтипа А6 и CRF63_02A6. Показано, что существующие глобальные алгоритмы (Geno2Pheno, WebPSSM, правило 11/25 и др.) демонстрируют низкую эффективность при анализе российских геновариантов, тогда как разработанная модель обеспечивает сбалансированные метрики (чувствительность 79–87%, специфичность 79–100%, точность 77–95%).

Впервые с помощью метода анализа интактной провирусной ДНК (IPDA) количественно охарактеризован провирусный ландшафт при острой инфекции, вызванной А6 и CRF63_02A6, показано раннее формирование массивного пула провирусной ДНК с резким преобладанием дефектных геномов (медиана интактных – 405 копий на 10^6 клеток, дефектных – 24 443).

Впервые с использованием технологии секвенирования РНК единичных клеток охарактеризован транскриптомный профиль мононуклеаров периферической крови при острой ВИЧ-инфекции, вызванной регионально значимыми геновариантами. Выявлены перестройки клеточного состава, изменения экспрессии генов иммунной активации, сигнальных путей TGF- β и mTOR, а также перестройка сетей межклеточной коммуникации с формированием центрального регуляторного узла из неклассических моноцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы очень высока. Полученные данные существенно расширяют фундаментальные представления о патогенезе острой ВИЧ-инфекции применительно к генетическим вариантам, циркулирующим в России и странах бывшего СССР. Практическая значимость заключается в разработке и внедрении в лабораторную практику программного обеспечения HIV-V3Augur, которое позволяет в рутинном режиме определять тропность изолятов ВИЧ-1 и может использоваться для обоснованного назначения антагонистов CCR5 (маравирока) в соответствии с клиническими рекомендациями. Разработанные праймеры и зонды для IPDA, адаптированные к российским геновариантам, могут быть внедрены в лаборатории, проводящие мониторинг латентного резервуара ВИЧ-1. Результаты работы также имеют значение для эпидемиологического надзора и прогнозирования течения заболевания.

Методология и методы исследования соответствуют современному уровню вирусологической науки. Автор использовал комплекс высокотехнологичных методов: полногеномное секвенирование, фенотипическое определение тропности на клеточных линиях U87.CD4.CCR5/CXCR4, цифровую ПЦР, секвенирование РНК единичных клеток, а также биоинформатические подходы, включая машинное обучение и статистическое моделирование. Это обеспечивает высокую достоверность полученных результатов.

Структура и содержание автореферата полностью соответствуют требованиям. Автореферат написан чётким научным языком, логично выстроен, содержит все необходимые разделы (введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы). Представленные рисунки и таблицы наглядно иллюстрируют основные положения работы. Выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Достоверность результатов обеспечена использованием валидированных протоколов, референсных баз данных (LANL), а также применением репрезентативных выборок и адекватных статистических методов (10-кратная кросс-валидация, балансировка классов SMOTE, коррекция батч-эффектов Harmony). Результаты апробированы на российских и международных конференциях, опубликованы в рецензируемых журналах (в том числе рекомендованных ВАК).

Замечания и вопросы по автореферату (носящие дискуссионный характер):

В работе показано, что у 8 из 14 пациентов в острую стадию выявлены Х4- или дуально-тропные штаммы. С чем, по Вашему мнению, может быть связана столь высокая частота – с особенностями рекомбинантной структуры CRF63_02A6 (в частности, env-области от CRF02_AG) или с иными эпидемиологическими/хозяин-зависимыми факторами?

Для анализа транскриптома единичных клеток использованы данные трёх пациентов с острой ВИЧ-инфекцией. Не могли бы Вы пояснить, каким образом осуществлялся отбор этих пациентов и насколько полученные транскриптомные паттерны, по Вашему мнению, репрезентативны для всей когорты?

Разработанная модель HIV-V3Augur показала высокую точность для CRF63_02A6 (94,9%), однако обучение проводилось на модели, адаптированной для CRF02_AG, из-за ограниченного числа фенотипированных последовательностей. Планируется ли в дальнейшем расширение обучающей выборки для CRF63_02A6 и валидация модели на более крупных независимых наборах данных?

Какие из выявленных транскрипционных маркеров (например, повышение экспрессии CXCR4, IL1B, снижение HLA-C) могли бы служить потенциальными биомаркерами для прогнозирования скорости прогрессирования заболевания у пациентов с острой ВИЧ-инфекцией, вызванной российскими вариантами?

Указанные вопросы не снижают общей положительной оценки работы и носят уточняющий характер.

Заключение. Диссертационная работа Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1» представляет собой законченное, самостоятельно выполненное научное исследование, содержащее решение актуальной фундаментальной и прикладной задачи – комплексной характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной доминирующими в России генетическими вариантами. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объёму и достоверности полученных результатов работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (с изменением Постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Заведующий лабораторией диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций

государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии

и микробиологии», Республика Беларусь,

доктор биологических наук, доцент

Гасич Е.Л.

Гасич Е.Л. удостоверяю
ведущий специалист по наградам

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», 220114, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Филимонова, 23 Тел.: +375 (17) 358-32-67; e-mail: rrpcem@belriem.by