

## **ОТЗЫВ**

**Новосибирского государственного университета  
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**

Вирусы с РНК-геномом характеризуются высокой генетической изменчивостью и способностью быстро адаптироваться к изменяющимся условиям существования. В случае ВИЧ-1 следствием длительной эволюции и рекомбинационных процессов стало формирование многочисленных генетических вариантов вируса, различающихся по географическому распространению и, возможно, по отдельным биологическим свойствам. В связи с этим одной из актуальных задач современной вирусологии является установление взаимосвязи между генотипическими характеристиками вируса и его функциональным фенотипом.

Особенно важной эта проблема является для генетических вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Российской Федерации и странах ближнего зарубежья. Суб-субтип А6 занимает доминирующее положение в значительной части страны, тогда как циркулирующая рекомбинантная форма CRF63\_02А6 получила широкое распространение в Сибирском регионе и продолжает участвовать в формировании новых рекомбинантных вариантов.

Несмотря на эпидемиологическую значимость суб-субтипа А6 и CRF63\_02А6, значительная часть существующих представлений о биологических свойствах ВИЧ-1, включая особенности предсказания корцепторной тропности, сформирована при исследовании иных генетических вариантов вируса. Широко применяемые алгоритмы генотипического прогнозирования тропности нередко создавались на выборках, в которых российские генетические варианты ВИЧ-1 были представлены недостаточно.

В связи с этим диссертационная работа К.А. Елфимова, направленная на комплексное исследование молекулярно-генетических и вирусологических

особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной А6 и CRF63\_02А6, является актуальной и представляет несомненный научный интерес.

Целью работы являлась комплексная характеристика молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63\_02А6 ВИЧ-1.

Важным достоинством исследования является сочетание нескольких методических подходов, позволяющих последовательно перейти от характеристики генома вируса к определению его функциональных свойств и анализу клеточного ответа организма хозяина.

Автором сформирована когорта пациентов с острой ВИЧ-инфекцией. В исследование включались лица с документированным предполагаемым интервалом инфицирования не более четырех недель, отрицательным или неопределенным результатом иммуноблоттинга и высокой вирусной нагрузкой - не менее  $10^6$  копий РНК ВИЧ-1/мл. Такой подход обеспечил возможность исследования вируса и реакции клеток иммунной системы в ранний период инфекционного процесса.

Для молекулярно-генетической характеристики клинических изолятов были получены последовательности, охватывающие практически полный геном ВИЧ-1, проведены филогенетический анализ и проверка присутствия уникальных рекомбинантных форм (URF). Использование практически полногеномного секвенирования представляется важным методическим преимуществом, поскольку для ВИЧ-1 рекомбинационные события являются нередким явлением, и генотипирование изолятов по одному или нескольким фрагментам генома может быть недостоверным.

Существенную ценность имеет получение инфекционных клинических изолятов от пациентов основной когорты и их последующее экспериментальное исследование. Вирусологический фенотип оценивался по динамике накопления р24 в клеточных культурах, а корецепторная тропность определялась с использованием линий U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4. Подобный подход представляется логичным и правильным, поскольку позволяет не ограничиваться анализом нуклеотидных последовательностей, а получить прямое экспериментальное подтверждение функционального свойства вируса. Именно наличие достоверно фенотипированных изолятов делает последующую проверку существующих инструментов для генотипического предсказания тропности возможной.

В общей фенотипированной выборке автором выявлены 11 R5-тропных, один X4-тропный и семь R5/X4-тропных изолятов. Особого внимания заслуживает обнаружение X4- и R5/X4-вариантов уже в острую стадию ВИЧ-инфекции. В основной когорте такие вирусы выявлялись у 8 из 14 пациентов.

Полученный результат интересен с фундаментальных позиций, поскольку свидетельствует о том, что закономерности формирования корцепторного фенотипа могут зависеть от генетического варианта ВИЧ-1 и не полностью соответствовать классической модели, сформированной преимущественно при изучении других вариантов вируса.

Одним из наиболее сильных разделов диссертационной работы является сопоставление экспериментально установленного фенотипа тропности с результатами его генотипического прогнозирования.

Автором проведена сравнительная оценка ряда существующих правил и программных инструментов, использующих последовательность V3-петли gp120. Показано, что высокая общая точность некоторых методов может быть связана преимущественно с их высокой специфичностью при недостаточной чувствительности к Х4-использующим вариантам. Особенно выраженное снижение качества прогнозирования наблюдалось для российских генетических вариантов ВИЧ-1.

Для CRF63\_02A6 точность наиболее успешных существующих подходов составляла около 72 %. Таким образом, перенос моделей, обученных преимущественно на других генетических вариантах ВИЧ-1, на существенно отличающуюся вирусную популяцию оказался ограниченно эффективным.

Этот результат хорошо иллюстрирует одну из принципиальных проблем современного применения методов машинного обучения в биомедицине: качество модели определяется не только выбранным алгоритмом, но прежде всего репрезентативностью обучающего набора и его соответствием анализируемому биологическому объекту.

Для решения выявленной проблемы К.А. Елфимовым разработан собственный инструмент HIV-V3Augur, основанный на использовании субтип-специфических моделей машинного обучения. В качестве признаков использовались характеристики нуклеотидной и аминокислотной последовательности V3, включая относительную частоту использования синонимичных кодов (RSCU) и псевдоаминокислотный состав (pseAAC). Для создания большинства моделей использован ансамблевый подход с применением алгоритмов машинного обучения Random Forest и SVM.

Методически интересным является решение, примененное для CRF63\_02A6. В связи с крайне небольшим числом фенотипированных последовательностей данного варианта в международных базах непосредственное построение полноценной обучающей выборки было невозможно. Автор использовал данные CRF02\_AG, учитывая происхождение от него области гена *env* ВИЧ-1, включая V3 gp120, в геноме CRF63\_02A6, и применил балансировку классов методом SMOTE. При этом автор

справедливо указывает на необходимость осторожной интерпретации столь высоких результатов для CRF63\_02A6 из-за ограниченности количества независимо фенотипированных последовательностей и необходимость дальнейшей внешней валидации модели.

Положительно следует оценить реализацию разработанного алгоритма в форме автономного программного приложения HIV-V3Augur. Пользователь имеет возможность загрузить последовательность в формате FASTA, выполнить автоматическое или ручное генотипирование, провести прогнозирование тропности с использованием соответствующей модели и сохранить результаты анализа. Такое решение представляет собой пример перехода от результатов фундаментального молекулярно-вирусологического исследования к созданию законченного вычислительного инструмента. Отдельно следует отметить открытость исходного кода программы, что создает возможности для независимой проверки, модификации и дальнейшего совершенствования подхода.

Интересным продолжением молекулярно-генетического блока работы является исследование провирусного ландшафта. Методом цифровой ПЦР автором показано, что выраженный провирусный пул формируется уже в острую стадию ВИЧ-инфекции. Медианное общее количество провирусных копий составило 26 034 на  $10^6$  моноклеаров периферической крови, при этом основную его часть составляли дефектные провирусные геномы — медиана 24 443 копии. Медиана интактных провирусов составила 405 копий на  $10^6$  клеток. Данные результаты дополняют представления о раннем этапе взаимодействия ВИЧ-1 с клеткой хозяина и показывают, что уже в первые недели инфекционного процесса формируется выраженно гетерогенный пул интегрированной вирусной ДНК.

Значимый объем новых данных получен при анализе транскриптома единичных клеток. Выявлено снижение доли наивных CD4+ и CD8+ Т-клеток, Treg- и MAIT-клеток при одновременном увеличении доли CD8+ эффекторных Т-клеток памяти, NK-клеток и пролиферирующих Т/NK-клеток. Полученные изменения указывают на формирование выраженного состояния иммунной активации уже в острую стадию заболевания.

На транскрипционном уровне обнаружено изменение экспрессии генов, связанных с иммунной активацией, клеточным стрессом, внутриклеточным сигналингом, воспалением, миграцией и энергетическим метаболизмом. Наиболее выраженные изменения выявлены в неклассических моноцитах, которые приобретают активированный провоспалительный фенотип и занимают центральное положение в реконструированной сети межклеточной коммуникации.

Представляется важным, что автор не ограничивается перечислением дифференциально экспрессируемых генов, а пытается объединить полученные результаты на уровне функциональных клеточных программ. Показаны изменения TGF- $\beta$ - и mTOR-зависимого сигналинга, метаболическая перестройка отдельных клеточных популяций и изменение взаимодействий между элементами врожденного и адаптивного иммунитета.

В целом работа демонстрирует современный междисциплинарный подход к исследованию вирусной инфекции. В ней объединены классические вирусологические методы, клеточные модели, секвенирование нового поколения, цифровая ПЦР, одноклеточная транскриптомика и методы машинного обучения.

Особенно удачным представляется принцип экспериментальной верификации вычислительных результатов. Фенотипическая тропность клинических изолятов в данном исследовании не заменяется прогнозированием по последовательности, а используется как экспериментальная основа для разработки и проверки алгоритма. Такой подход существенно повышает убедительность полученных результатов.

Достоверность основных положений работы обеспечивается использованием современных и взаимодополняющих методов, экспериментальным определением биологических свойств клинических изолятов, применением референсных последовательностей и международных баз данных, а также использованием современных статистических и биоинформатических методов анализа.

Автореферат полно отражает содержание диссертационной работы, ее цель и задачи, основные методические подходы, научную новизну и полученные результаты. Основные результаты исследования опубликованы в рецензируемых научных изданиях и представлены на профильных научных мероприятиях.

### **Замечания и вопросы**

Принципиальных замечаний к представленному автореферату нет. Вместе с тем дальнейшее развитие разработанного подхода HIV-V3Augur представляет значительный интерес. В настоящее время прогнозирование основано преимущественно на признаках, извлекаемых из первичной последовательности V3 gp120. С учетом быстрого развития методов предсказания пространственной структуры белков возникает вопрос, рассматривает ли автор возможность дополнения базы данных признаков структурными характеристиками области V3, распределения заряда, доступности отдельных аминокислотных остатков или другими структурными

параметрами взаимодействия gp120 ВИЧ-1 с клеточными рецепторами CCR5 и CXCR4. Представляется интересным определить, позволит ли подобная гибридная модель повысить устойчивость прогнозирования для рекомбинантных и генетически удаленных вариантов ВИЧ-1 либо последовательность V3 уже содержит достаточный объем информации для решения этой задачи.

Другой вопрос касается собственно фенотипической верификации. В работе изолят, демонстрирующий репликацию как на U87.CD4.CCR5, так и на U87.CD4.CXCR4, определяется как R5/X4-тропный. При дальнейшем развитии исследования было бы интересно установить, во всех ли таких случаях речь идет о действительно вирусном изоляте с двойной тропностью либо культура может содержать смесь генетически близких R5- и X4-тропных вариантов. По мнению автора, насколько целесообразно в перспективе сочетать используемую систему фенотипирования с анализом отдельных вирусных клонов или более глубоким секвенированием V3 до и после селекции на клетках, экспрессирующих соответствующий корецептор? Подобный эксперимент мог бы дополнительно связать конкретную нуклеотидную последовательность с экспериментально установленным клеточным фенотипом.

Высказанные вопросы носят дискуссионный и перспективный характер, направлены на дальнейшее развитие полученных результатов и не снижают научной и практической значимости выполненного исследования.

### **Заключение**

Автореферат диссертации Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63\_02A6 ВИЧ-1» отражает основные положения выполненной диссертационной работы.

Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача, имеющая значение для развития вирусологии и изучения патогенеза ВИЧ-инфекции. Полученные автором результаты обладают научной новизной, имеют теоретическую и практическую значимость.

По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, обоснованности и достоверности полученных результатов диссертационная работа К. А. Елфимова соответствует требованиям пунктов 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), 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.

Отзыв составил:

доцент, заведующая лабораторией молекулярного инжиниринга ИММТ НГУ  
кандидат биологических наук \_\_\_\_\_ Е.А. Прокопьева

Подпись Е.А. Прокопьевой заверяю: \_\_\_\_\_

Ученый секретарь

Новосибирского государственного университета,

кандидат химических наук

«30» сентября 2026 г.



\_\_\_\_\_ Е.А. Тарабан

Сведения о организации:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет»

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Телефон: +7 (383) 363-40-00

E-mail: rector@nsu.ru