

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, академик РАН, д.м.н., профессор

В.Г. Акимкин

«08»

сентября

2026 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической значимости диссертационной работы Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10.

«Вирусология»

Актуальность темы исследования. ВИЧ-инфекция остается одной из наиболее значимых инфекционных болезней человека, несмотря на существенные успехи современной антиретровирусной терапии. Пожизненная персистенция ВИЧ, формирование латентного провирусного резервуара, высокая генетическая изменчивость возбудителя и возможность изменения его биологических свойств, включая развитие резистентности к антиретровирусным препаратам, определяют необходимость дальнейшего изучения молекулярных механизмов патогенеза заболевания и особенностей циркулирующих генетических вариантов вируса.

Особое значение данная проблема имеет для Российской Федерации, где молекулярно-эпидемиологическая структура эпидемического процесса ВИЧ-инфекции существенно отличается от такового в странах Западной Европы и Северной Америки. Одним из доминирующих на территории России генетических вариантов является суб-субтип А6, а в ряде регионов Сибири широкое распространение получила циркулирующая рекомбинантная форма CRF63_02A6. При этом большая часть накопленных в мире сведений о биологических свойствах ВИЧ-1 получена преимущественно для субтипа В и в меньшей степени для других широко распространенных генетических вариантов вируса.

В связи с этим изучение биологических особенностей эпидемически значимых для России вариантов ВИЧ-1 имеет не только фундаментальное, но и непосредственное практическое значение. Важным представляется исследование именно острой стадии ВИЧ-инфекции, поскольку в этот период формируется связь вирус-хозяин, закладывается совокупность провирусных резервуаров.

Отдельного внимания заслуживает проблема определения корцепторного тропизма ВИЧ-1. Последовательность V3-петли поверхностного гликопротеина gp120 является одним из основных молекулярных детерминантов использования корцепторов CCR5 и CXCR4 для проникновения вирусной частицы ВИЧ в клетку. Генотипические методы определения тропности удобны для практического применения, однако их эффективность зависит от генетического варианта анализируемого вируса и репрезентативности выборки, использованной при создании алгоритма. Поэтому оценка существующих систем интерпретации применительно к российским вариантам ВИЧ-1 и разработка специализированного подхода представляют самостоятельную актуальную научно-практическую задачу.

Современные технологии секвенирования, цифровой ПЦР и транскриптомного анализа единичных клеток позволяют рассматривать

ранний инфекционный процесс комплексно. Именно такой подход реализован в диссертационной работе Елфимова К.А.

Таким образом, актуальность диссертационного исследования К.А. Елфимова, направленного на комплексную характеристику молекулярно-генетических и вирусологических особенностей острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом А6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, не вызывает сомнений.

Научная новизна, обоснованность и достоверность выносимых на защиту положений, научных выводов, рекомендаций и заключений, сформулированных в диссертации. В рамках выполненного исследования автором проведена комплексная характеристика острой ВИЧ-инфекции, вызванной генетическими вариантами ВИЧ-1, имеющими важное эпидемиологическое значение для Российской Федерации.

В результате полногеномного секвенирования клинических изолятов ВИЧ-1 проведена их генетическая характеристика. В исследованной выборке выявлены штаммы суб-субтипа А6, CRF63_02A6, а также уникальные рекомбинантные формы (URF), образованные этими генетическими вариантами.

Существенным достоинством работы является сочетание генотипической характеристики изолятов с их экспериментальным фенотипированием. Для определения корецепторного тропизма использованы клеточные линии U87.CD4.CCR5 и U87.CD4.CXCR4 с контролем репликации вируса по накоплению антигена р24 ВИЧ-1. Наличие экспериментально определенного фенотипа позволило автору не ограничиваться исключительно результатами биоинформатического прогнозирования, а использовать фенотипические данные в качестве «истины» при оценке существующих алгоритмов и разработке собственной модели.

Одним из наиболее интересных результатов исследования является выявление штаммов, использующих CXCR4, в том числе штаммов с X4- и двойной R5/X4-тропностью, уже на острой стадии ВИЧ-инфекции. У 8 из 14

обследованных в рамках данного этапа пациентов были выявлены варианты вируса, способные использовать CXCR4. Полученные данные заслуживают особого внимания, поскольку классические представления о ранней ВИЧ-инфекции предполагают преимущественное присутствие R5-тропных вариантов. В то же время выявленная автором высокая частота CXCR4-использующих изолятов требует дальнейшего изучения на расширенных выборках, что отражено самим автором при обсуждении результатов.

Отдельный блок работы посвящен анализу эффективности существующих методов генотипического предсказания тропности. Автором проведено сравнение восьми используемых в настоящее время моделей и эмпирических правил. Показано, что алгоритмы, демонстрирующие высокие показатели при анализе широко представленных в международных базах данных генетических вариантов ВИЧ-1, характеризуются снижением эффективности применительно к суб-субтипу A6 и особенно CRF63_02A6. Данный результат имеет существенное методическое значение, поскольку автор демонстрирует ограниченность использования систем интерпретации, созданных преимущественно на данных глобально распространенных вариантов, на регионально специфичные варианты ВИЧ-1.

На основании полученных данных автором разработана собственная модель машинного обучения HIV-V3Augur, использующая характеристики нуклеотидной последовательности V3 gp120, включая относительную частоту использования синонимичных кодонов и признаки псевдоаминокислотного состава. Созданная модель продемонстрировала сбалансированные и улучшенные характеристики по отношению к предсказанию тропности суб-субтипа A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1, что является заделом для ее использования при назначении препаратов класса CCR5-антагонисты российским пациентам. Помимо собственно алгоритма автором разработано автономное программное приложение с графическим пользовательским интерфейсом, что существенно повышает перспективы практического применения полученных результатов в

лабораториях, не располагающих специализированной биоинформатической подготовкой персонала.

Принципиально новым направлением работы является количественная оценка провирусного ландшафта при острой инфекции, вызванной А6 и CRF63_02A6. С использованием адаптированного протокола IPDA и цифровой ПЦР показано раннее формирование значительного и гетерогенного провирусного пула с преобладанием дефектных провирусных резервуаров. Результат подтверждает, что выраженная неоднородность ландшафта провирусных резервуаров формируется уже на ранних этапах инфекционного процесса.

Значительный объем оригинальных данных получен при исследовании транскриптома единичных моноклеарных клеток периферической крови. Показано, что острая ВИЧ-инфекция сопровождается существенным изменением как клеточного состава, так и транскрипционного профиля отдельных популяций иммунных клеток. Выявлены изменения, затрагивающие CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки памяти, NK-клетки, моноциты и другие субпопуляции.

Автором продемонстрирована активация провоспалительных и противовирусных сигнальных программ, включая пути NF-κB, TNF и интерферонов, изменение экспрессии генов миграции и клеточного хоуминга, а также перестройка метаболических и апоптотических программ. Особый интерес представляют результаты, свидетельствующие о выраженной активации неклассических моноцитов. При анализе межклеточной коммуникации именно эта популяция приобретала одну из центральных ролей в сети обмена сигналами, тогда как для ряда Т-клеточных, дендритных и регуляторных популяций отмечалось уменьшение количества и интенсивности взаимодействий.

В совокупности полученные данные позволяют сделать вывод о глубокой перестройке иммунной системы уже в острую фазу инфекции и одновременно демонстрируют сложный характер этого ответа, сочетающего

признаки противовирусной активации с молекулярными изменениями, способными способствовать хроническому воспалению, иммунной дисфункции и персистенции вируса.

Достоверность результатов обеспечивается использованием современных молекулярно-биологических, вирусологических и биоинформатических методов исследования, включая полногеномное секвенирование, экспериментальное фенотипирование вирусных изолятов, цифровую ПЦР и секвенирование РНК единичных клеток. Для анализа данных использованы современные статистические подходы, включая обобщенные линейные смешанные модели, стратифицированную кросс-валидацию, методы анализа дифференциальной экспрессии и коррекции батч-эффектов.

Полученные автором результаты логически связаны между собой, положения, выносимые на защиту, соответствуют представленным экспериментальным данным, а сформулированные выводы отражают содержание выполненной работы.

Структура и общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа К.А. Елфимова построена по классической схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка литературы.

Работа изложена на 180 страницах, иллюстрирована 31 рисунком, содержит 5 таблиц. Библиографический указатель включает 207 отечественных и зарубежных источников.

Во «Введении» обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и пять задач работы, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения о достоверности и апробации результатов, а также личном вкладе автора.

В главе «Обзор литературы» последовательно рассмотрены общая характеристика и жизненный цикл ВИЧ-1, современный взгляд на

эпидемиологию ВИЧ-инфекции, а также на происхождение и распространение суб-субтипа А6 и рекомбинантной формы CRF63_02A6 ВИЧ-1. Значительное внимание уделено особенностям острой фазы ВИЧ-инфекции, механизмам использования корецепторов CCR5 и CXCR4, клиническому значению определения тропности и существующим фенотипическим и генотипическим методам ее оценки. Отдельный раздел посвящен современным омиксным технологиям и возможностям их применения для изучения ВИЧ-инфекции. Литературный обзор основан на современных публикациях, логически связан с задачами исследования и позволяет обосновать выбранные автором экспериментальные и аналитические подходы.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны когорты исследования, методика выделения и криоконсервации мононуклеарных клеток периферической крови, выделение вирусной РНК, полногеномное секвенирование и генотипирование ВИЧ-1. Представлены методы получения клинических изолятов и фенотипического определения тропности, принципы формирования референсных наборов последовательностей из базы LANL, алгоритмы генотипического прогнозирования тропности, способы построения признаковых пространств и моделей машинного обучения. Описаны архитектура модели машинного обучения HIV-V3Augur, методы статистического анализа, подготовка библиотек для секвенирования РНК единичных клеток, предобработка и аннотация данных, pseudo-bulk анализ дифференциальной экспрессии и исследование межклеточной коммуникации. Представлены также дизайн праймеров и зондов для оценки провирусного резервуара, получение положительных контролей и протокол цифровой ПЦР. Описание методов является достаточным для понимания дизайна исследования и оценки воспроизводимости основных экспериментальных этапов.

В главе «Результаты собственных исследований» последовательно представлены характеристика выборки, результаты генотипирования и фенотипирования клинических изолятов, сравнительная оценка

существующих моделей генотипического определения тропности, создание и валидация HIV-V3Augur и разработка пользовательского интерфейса.

Далее автор приводит результаты исследования провирусного ландшафта, транскриптомного профилирования единичных клеток, подробный анализ изменений в отдельных субпопуляциях - CD4⁺ Tcm, CD8⁺ Tcm, CD8⁺ Tem, неклассических моноцитах и NK-клетках. Завершающие разделы главы посвящены интегральному анализу сигнальных каскадов и реконструкции сетей межклеточной коммуникации при острой ВИЧ-инфекции.

Глава «Обсуждение полученных результатов» содержит сопоставление собственных данных с результатами отечественных и зарубежных исследований. Автор критически рассматривает обнаруженную высокую частоту CXCR4-использующих вариантов, различия репликативной активности A6 и CRF63_02A6, результаты оценки провирусного резервуара и транскриптомного анализа. Следует положительно отметить, что автор не ограничивается констатацией полученных результатов, а рассматривает возможные биологические механизмы и указывает ограничения выполненного исследования. В «Заключении» обобщены основные результаты исследования.

По теме диссертационного исследования опубликовано 6 научных работ, включая 3 статьи в научных журналах и 3 публикации в материалах всероссийских и международных конференций. Полученные результаты прошли апробацию на профильных научных мероприятиях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для развития соответствующей отрасли науки. Проведенное исследование и полученные соискателем результаты имеют существенное значение для вирусологии, молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции и разработки методов лабораторной диагностики ВИЧ-1.

Впервые проведено комплексное изучение двух эпидемически значимых для России вариантов вируса в период острой стадии ВИЧ-

инфекции, включающее генотипирование, анализ репликативных свойств и корцепторного тропизма, оценку провирусного резервуара и исследование транскриптома иммунных клеток.

С точки зрения молекулярной эпидемиологии важное значение имеет получение дополнительных полногеномных аннотированных (с известной тропностью) последовательностей суб-субтипа A6, CRF63_02A6 и уникальных рекомбинантных форм. Накопление подобных данных необходимо для дальнейшего изучения эволюции ВИЧ-1 на территории Российской Федерации и совершенствования систем молекулярного эпидемиологического надзора.

С методической точки зрения значимым результатом является экспериментальная демонстрация ограничений универсальных алгоритмов генотипического определения тропности при работе с регионально специфичными генетическими вариантами ВИЧ-1. Созданный автором HIV-V3Augur представляет собой перспективный пример субтип-ориентированного подхода к интерпретации последовательностей V3 gp120.

Особенно следует отметить наличие в работе экспериментально фенотипированных клинических изолятов. Формирование коллекций последовательностей с надежно определенным фенотипом является необходимым условием дальнейшего совершенствования генотипических алгоритмов и представляет самостоятельную научную ценность.

Данные о раннем формировании гетерогенного провирусного резервуара расширяют фундаментальные представления о персистенции ВИЧ-1 при инфицировании вариантами, характерными для российской эпидемии.

Результаты транскриптомного анализа единичных клеток и исследования межклеточной коммуникации демонстрируют, что уже на острой стадии ВИЧ-инфекции происходит глубокая перестройка функционального состояния иммунных клеток. Полученные результаты формируют основу для дальнейшей экспериментальной проверки выявленных молекулярных мишеней и исследования их роли в патогенезе заболевания.

Рекомендации по использованию результатов и выводов, приведенных в диссертации. Полученные результаты могут быть использованы в исследованиях молекулярной эпидемиологии ВИЧ-1, включая изучение суб-субтипа А6, CRF63_02А6, и связанных с ними уникальных или циркулирующих рекомбинантных форм. Сформированная коллекция последовательностей и фенотипированных изолятов представляет интерес для разработки и валидации методов определения корецепторного тропизма. Программное обеспечение HIV-V3Augur после дополнительной независимой валидации может применяться в вирусологических и молекулярно-диагностических лабораториях. Разработанные подходы к оценке провирусного резервуара, а также данные транскриптомики единичных клеток могут быть использованы в дальнейших исследованиях персистенции ВИЧ-1 и механизмов ранней иммунной дисфункции, а также при разработке лекарственных препаратов, направленных на подавление репликации ВИЧ или истощения иммунных клеток.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Диссертационная работа К.А. Елфимова является законченным научным исследованием, написана научным языком, имеет логичную структуру и содержит значительный объем экспериментального материала. Результаты представлены наглядно, хорошо иллюстрированы и сопровождаются статистическим анализом. Поставленные задачи последовательно решены, а выводы в целом соответствуют представленным результатам.

К достоинствам работы следует отнести сочетание классических вирусологических методов с современными молекулярно-генетическими и биоинформатическими технологиями. Особенно ценным представляется использование фенотипического определения тропности в качестве референсного метода при оценке генотипических алгоритмов и первое использование технологии секвенирования транскриптома единичных клеток для исследования иммунного ответа на острую стадию ВИЧ-инфекции у пациентов из Российской Федерации.

Недостатком работы является не полное соответствие сформулированных задач и сделанных выводов. В частности, первая задача не нашла отражение в выводах, решение второй и третьей задач отражено в выводе №2, а решение пятой задачи описано в выводах № 3, 4 и 5. При этом сделанные выводы отражают основные результаты выполненной работы.

Следует также отметить наличие некоторых недостатков, которые связаны со стилистическими неточностями, опечатками, которые не влияют на научную ценность проведенного исследования.

Заключение. Диссертационная работа Елфимова Кирилла Артемовича «Молекулярно-генетические и вирусологические характеристики острой стадии ВИЧ-инфекции, вызванной суб-субтипом A6 и CRF63_02A6 ВИЧ-1» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой решена актуальная научная задача, имеющая значение для развития вирусологии и исследований ВИЧ-инфекции.

В работе получены новые данные о биологических свойствах эпидемически значимых для Российской Федерации генетических вариантов ВИЧ-1 в острой стадии инфекционного процесса, проведена экспериментальная и генотипическая характеристика корцепторного тропизма, разработан специализированный алгоритм его предсказания, охарактеризован провирусный ландшафт и исследованы изменения транскриптома ключевых антивирусных популяций моноклеарных клеток периферической крови.

Полученные результаты имеют научную и практическую значимость, обладают достаточной степенью обоснованности и достоверности. Содержание работы соответствует научной специальности 1.5.10. Вирусология.

По актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа К.А. Елфимова соответствует требованиям п. 9-14 «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.

Отзыв на диссертационную работу К.А. Елфимова был заслушан, обсужден и одобрен на расширенном заседании Ученого совета ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора с участием специалистов лаборатории диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции (протокол № 7 от 08.09.2026 г.).

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией
диагностики и молекулярной
эпидемиологии ВИЧ-инфекции,
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
доктор медицинских наук



Киреев Д. Е.



Подпись д.м.н. Киреева Д.Е. заверяю:
Ученый секретарь
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, канд. мед. наук



Никитина Т.С.

Сведения о ведущей организации:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а. Тел. 8-495-672-10-69, e-mail: cri@pcr.ru