

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор” по специалността 01.06.13 Вирусология

Рецензент: Проф. д-р Златко Николов Кълвачев, дмн
Военно-медицинска Академия, София, Член на научното жури съгласно
заповед N 55 от 19.05.2011 на Директора на НЦЗПБ.

Тема на дисертацията: „Молекулярно-вирусологично характеризиране на
епидемията от HIV-1 в България чрез секвениране и филогенетичен анализ”

Автор: Ивайло Алексиев Иванов, биолог-специалист в Националната потвърдителна
лаборатория по HIV, Вирусологичен отдел, НЦЗПБ

Научен ръководител: проф. д-р Христо Тасков, дмн

Проблемът, свързан с HIV инфекциите у нас е актуален както от медицинска, така и от социална и икономическа гледна точка. Според данните, представени в дисертацията регистрираните серопозитивни у нас в края на 2009 г. са 1 100, но детайлно молекулярно-вирусологично и молекулярно-епидемиологично проучване досега не е провеждано.

Структура на дисертационния труд. Представеният дисертационен труд е написан на 190 стандартни страници и съдържа 46 фигури и 9 таблици. Литературният указател наброява 251 заглавия с пълна библиография – 12 на кирилица и 234 на латиница, както и 5 Internet-източника.

Дисертацията е оформена съгласно възприетата официална схема:

Титулна страница, Съдържание – 2 стр., Използвани съкращения – 1 стр., Списък на приложените таблици и фигури – 2 стр., Въведение – 2 стр., Обзор на литературата – 45 стр., Цел и задачи – 2 стр., Материали и методи – 28 стр., Резултати и обсъждане – 54 стр., Обща дискусия – 11 стр., Изводи и заключение – 2 стр., Резюме – 4 стр., Декларация за оригиналност (приноси) – 2 стр., Литературен списък – 23 стр. и други приложения – 8 стр.

Литературна осведоменост и оценка на обзорния материал.

Представеният значителен по обем на информацията и правилно изготвен литературен обзор показва задълбочената теоретична осведоменост на автора. В началото са представени исторически данни за човешките ретровируси, вкл. откриването на първия от тях – HTLV-1 (Poiesz et al., 1980 г.), изолирането на причинителя на СПИН, днес известен с наименованието HIV, регистрирането на първия случай на инфекцията у нас, актуалната ретровирусна класификация и филогенетичните връзки сред ретровирусното семейство. Подробно са описани структурата, жизнения цикъл, специфичните характеристики и молекулярните особености на HIV-1, както и класическите и генетичните методи за диагностика и мониторинг на инфекцията. Логично, специално внимание е отделено на методите за секвениране и начините за провеждане на филогенетичен анализ, последвано от анализ на литературата, представяща еволюцията и разнообразието от субтипове и циркулиращи рекомбинантни форми на HIV-1 по света. Тази информация е отлично онагледена с фигури 10-14 и таблица 4, съдържаща генетични карти на циркулиращите към момента (началото на 2011 г.) рекомбинантни форми на HIV- 1 и 2.

Обзорът на литературата завършва с оценка на отражението на генетичното разнообразие на HIV върху трансмисията, диагностиката и мониторирането на инфекцията, терапията и прогресията на заболяването, както и възможността за разработване на ефективни ваксини.

Цитираните 251 литературни източници са умело използвани и допринасят за аналитична им обработка. Въз основа на този анализ Ивайло Алексиев мотивирано формулира целта на дисертационната си теза и конкретизира задачите, които определят обема и посоката на изследванията.

Целта и задачите, които си поставят за решаване Ивайло Алексиев и неговият научен ръководител са значими и перспективни, предвид разнообразието от субтипове и циркулиращи рекомбинантни форми (CRFs) на HIV-1 у нас и необходимостта от по-добро разбиране, проследяване и контролиране на епидемията. Проучването на генетичните характеристики на циркулиращите у нас форми на HIV и ролята им при протичането на инфекцията имат теоретично и практическо значение, особено що се отнася до локалните епидемии с „независима еволюция”, при които генетичното разнообразие има отражение върху различни аспекти на контрола. Формулираните 6 основни задачи конкретизират поставената цел и маркират реализирането и чрез:

- секвениране, субтипирание и анализиране на разпространените генетични форми на HIV-1, придобити по различен начин в различни региони на страната и
- ретроспективен анализ на HIV епидемията в България за последните 25 г., вкл. идентифициране динамиката на вирусната циркулация сред различни уязвими групи и установяване на миграцията на вируса от страната към други географски райони.

В раздела **„Материали и методи”** са представени достатъчни като количество и произход клинични материали (кръвни проби), които са обработени по начин и с методи, отговарящи на целта и задачите на дисертацията. Те позволяват да се правят правилни анализи и заключения относно основните характеристики и специфичните детайли на циркулиращите HIV варианти у нас.

Изследвани са 207 кръвни проби на лица, живеещи с HIV-1, което представлява около 19% от официално регистрираните у нас в периода 1986-2009 г. носители на вируса. Характеристиките на пробите - произход (пол, възраст, начин на заразяване, регион), предварителна обработка и съхранение са подробно описани в раздела. Декларирано е спазване на съответствието при всички извършени дейности с принципите на добрата лабораторна практика, етичните норми и изискванията на стандарта „Медицинска вирусология”.

Използвани са два основни метода на изследване и анализ – секвенционен и филогенетичен. Начините за приложението им са разнообразни. Секвенирането на фрагмент от *pol* гена на HIV-1 е извършено чрез TRUGENE® HIV-1 генотипиращ кит и системата за секвениране на гел - OpenGene™ DNA Siemens и/или генотипиращ кит Viroseq HIV-1 Genotyping Test, Abbott на еднокapилярeн секвенатор Applied Biosystems Sequencer 310.

Получените секвенции са използвани за обстоен филогенетичен анализ. Всички 207 секвенции са анализирани с Интернет базирани инструменти за субтипирание и филогенетичен анализ: REGA2 и COMET. За всяка секвенция е извършен BLAST Search в NCBI и най-сходните секвенции от базите данни са използвани за мануална обработка. Секвенциите, които не се числят към нито една от референтните групи са анализирани за установяване на точки на рекомбинация с RIP в Los Alamos и Скрит Markov Model (jumping profile Hidden Markov Model- jpHMM).

За окончателния филогенетичен анализ са използвани изолираните български секвенции, най-сходните секвенции от BLAST Search и референтните HIV-1 секвенции от базата данни в Los Alamos. Секвенциите са подравнени (aligning) с помощта на модерен BioEdit софтуер. Филогенетичният анализ е извършен чрез построяване на филогенетични дървета с помощта на специализиран софтуер: MEGA4 с алгоритъм NJ, Bootscan анализ с 1000 повторения, модел - нуклеотиди, с Kimura 2-parameter. Извършен е и анализ със софтуер Phylip с алгоритъм Maximum parsimony и алгоритъм ML за молекулярен часовник и за филогеографски анализ.

Проведените изследвания са поставени методологично правилно, опитите са стриктно изведени, което позволява възпроизводимост на резултатите и контрол на експериментите във всеки момент от провеждането им.

За всички използвани методи са представени подробни протоколи. Богатият изследователски и сравнителен материал, както и коректно проведените изследвания осигуряват получаването на достоверни и убедителни резултати.

Разделът „**Резултати и Обсъждане**” е разпределен в 2 части, представени логично и последователно. В първата част са представени резултатите от изследванията с Интернет-базирани инструменти, използвани за предварителен анализ с цел оптимизиране работата в последващия мануален филогенетичен анали на секвенциите изолирани от България.

Изследваните секвенции от фрагмент на *pol* гена на HIV-1 са субтипирани най-напред с широко използваната Интернет-базирана програма REGA2, сравнявайки ги с набор от референтни консенсусни секвенции на чисти субтипове и с такива на циркулиращи рекомбинантни форми. Подобни изследвания са проведени и с нововъведената

Интернет-базирана програма за субтипирание на HIV-1 секвенции COMET. Сравнителното проучване доказва по-високата ефективност на втората програма, което се потвърждава и от други (Struck, 2010). Допълнително са установени и точките на актуалните рекомбинации на изследваните секвенции, представляващи циркулиращи рекомбинантни форми, за което е използвана Интернет-базираната програма GOBICS. Всички резултати са прегледно изложени в табл. 7.

Частта „Резултати от мануален филогенетичен анализ” представя таблично и обсъжда текстуално резултатите от проучването, което с помощта на „молекулярен часовник” установява, че българските разклонения от субтип A1, както и разклоненията II и III от субтип B са се появили в началото на 90-те години на XX век, а появата на субтип B от разклонение I и IV най-вероятно е в средата на 80-те години на XX век.

След резултатите за оценка на времето до най-близкия общ предшественик на българските изолати, логично следва анализ, проследяващ миграцията на HIV-1 между (от и към) България и други географски региони. Получените данни са ценни от епидемиологична гледна точка и база за по-добър контрол и мониторинг на HIV-1 епидемията у нас.

Втората част на раздела представя и обсъжда резултатите от изследванията, свързани с разпространението на различните генетични форми на HIV-1 в България и молекулярно-епидемиологичната оценка на епидемията у нас.

След построяване на филогенетични дървета, съдържащи секвенции на 207 български изолата, референтни HIV-1 секвенции от базата-данни в Лос Аламос и сходните секвенции от BLAST се установява, че повечето от случаите (70%) се разпределят в 6 различни субтипа на HIV-1, а останалите около 29% са 5 различни вида циркулиращи и комплексни рекомбинантни форми на HIV-1. При 3 случая (1%) не е могло причисляване към нито една от горните групи и най-вероятно тези секвенции представляват уникални рекомбинантни форми (URFs).

Авторът доказва, че субтип B е най-често срещаната генетична форма на HIV-1 в България, установен при малко над 50% от изследваните изолати и прави подробен, и задълбочен анализ върху начина на предаване, региона на заразяване и времето на регистрация на инфекцията/пациента. По подобен начин са представени и резултатите за другите по-рядко срещани „чисти” субтипове на HIV-1 у нас: A1, C, F1, G и H.

Интересен от научна и практическа гледна точка е резултата, че около 1/3 от изследваните генетичните форми на HIV-1 в България са циркулиращи рекомбинантни и комплексни форми, описани и анализирани подробно в текста.

В края на този раздел е направен молекулярно-епидемиологичен анализ на HIV-1 епидемията в България. С помощта на филогенетичния анализ, за първи път се установява динамиката на циркуляция на генетичните форми на HIV-1 през годините на епидемията по уязвими групи, по възрастови групи и според пътя на предаване на инфекцията сред лицата, живеещи с HIV-1 в България.

Всички резултати представени в раздела са онагледени прецизно и разбираемо. Те са единствените засега комплексно представени данни от този тип за HIV-1 в България, и като цяло представляват оригинален принос.

Като съществени приноси с научно-приложен характер могат да бъдат определени и (а) успешно секвенираните фрагменти от *pol* гена на HIV-1 от 207 от общо 1100 лица с HIV-1 инфекция, регистрирани между януари 1986 г. и декември 2009 г.; (б) извършения филогенетичен анализ на HIV-1, чрез построяване на филогенетично дърво от секвенции изолирани от български пациенти с HIV-1 и референтни секвенции от международните бази-данни, чрез използване на специализиран софтуер; (в) установеното разпространение субтипове и циркулиращи рекомбинантни форми на HIV-1 в България; (г) уточняването на разпространените генетични форми на HIV-1 сред различните уязвими групи от страната; (д) установената динамиката на движение и циркулация на генетичните варианти на HIV-1 в България, включително с изработване на модел на молекулярен часовник; (е) разработване на миграционен модел за движение на HIV-1 между България и други географски райони от Европа, Африка и САЩ.

Всички тези данни са ценни за процеса на контрол и мониторинг на HIV-1 епидемията у нас, но с успех могат да бъдат ползвани и от различни международни изследователски и контролиращи екипи и органи.

Личният принос на дисертанта в разработването на дисертационния труд е несъмнен. За него може да се съди и от представените научни публикации, доклади и съобщения, обсъждащи резултати от дисертацията.

Науко-метрични показатели. Във връзка с разработения дисертационен труд са представени 4 публикации и 12 съобщения на различни научни форуми (7 национални и 5 международни).

Оценката на публикациите показва, че са изпълнени изискванията за присъждане на ОНС „Доктор” – Ивайло представя 2 публикации в престижното международно списание „AIDS Research and Human Retroviruses”, 2008 (IF 2,024), които са цитирани общо 8 пъти досега. Представени са и 2 публикации в наши списания – „Problems of Infectious Diseases”, 2009 и „Инфектология”, 2010 г. С изключение на една, публикациите и представените на научни форуми съобщения на И. Алексиев са колективни. Той е първи автор в 2-те журнални статии издадени у нас и в 9 от научните съобщения.

Освен това, Алексиев е участник в 7 проекта и форми на обучение през периода 2005-2010 г. и е внедрил 2 разработки през същия период.

Критични бележки. Дисертацията беше обсъждана на различни етапи от подготовката и написването и, като бяха направени редица корекции и забележки, вкл. и на вътрешната защита. Всички те са взети предвид при окончателната редакция на разработката.

Заклучение:

Дисертацията на Ивайло Алексиев Иванов е актуална, прецизно изпълнена и подходящо оформена. Разработвайки я, авторът е придобил както необходимите знания за събиране и анализ на специализирана научна информация, така и значителни практически умения за работа с молекулярни техники. Представените в разработката резултати са лична заслуга на автора и имат съществена теоретична и практическа стойност.

Представеният автореферат отразява правилно основните постижения на дисертацията. Съгласен съм с представените Научни приноси с теоретичен и приложен характер. Рецензията отговаря на изискванията и критериите на за присъждане на образователната и научната степен "Доктор".

Предвид гореизложеното, предлагам на уважаемите членове на журито при НЦЗПБ да оценят положително дисертационния труд на Ивайло Алексиев и да му присъдят образователната и научна степен „Доктор” по специалност 01.06.13 Вирусология.

13.06.2011
София


Рецензент:
Проф. д-р Златко Кьлвачев, дмн