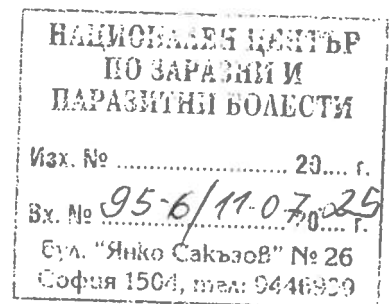




РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на ЛЮБОМИРА СВИЛЕНОВА ГРИГОРОВА
на тема **«Молекулярно-вирусологичен анализ на трансмисионните клъстери на
въведените и разпространени HIV-1 субтипове в България»**

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по научната специалност
Вирусология в Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и
информатика; Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научен ръководител: доц. ИВАЙЛО АЛЕКСИЕВ ИВАНОВ, д-р

Рецензент: проф. д-р Нели Стоянова Корсун, дмн,
член на научно жури, определено със заповед № 196 от 30.06.2025 г. на Директора на
НЦЗПБ

Биография

Любомира Григорова завършва средно образование през 2014 г. в Математическата гимназия "Гео Милев" – гр. Плевен. От 2014 до 2018 г. е студентка в Биологическия факултет при Софийския университет „Св. Климент Охридски“, където придобива бакалавърска степен по специалността „Молекулярна биология“. В същия университет тя получава магистърска степен по специалността „Качество и безопасност на храните“ през 2020 г. От август 2018 г. работи като биолог в НРПЛ по HIV към НЦЗПБ, а от октомври 2020 г. до септември 2023 г. е редовен докторант в тази лаборатория с научен ръководител доц. Ивайло Алексиев. През май 2023 г. в продължение на една седмица тя преминава обучение като участник в Курс на тема „Молекулярна епидемиология и клъстерен анализ“ в Università Campus Bio-Medico di Roma (UCBM), Рим, Италия. По време на COVID-19 пандемията Л.Григорова активно се включва в PCR диагностиката и секвенирането на SARS-CoV-2 и е съавтор в 8 научни публикации, посветени на тази инфекция. Има общо 20 научни публикации, всички с импакт фактор или импакт ранг. H индексът ѝ (Scopus) е 5.

Актуалност на темата на дисертационния труд

Пандемията от HIV/СПИН предизвиква глобална криза, която по броя на жертвите и щетите, нанесени на човешкото общество, е сравнима с последиците от двете световни войни. Според данни на UNAIDS от старта на епидемията през 1981 г. до 2023 г. 88,4 млн души по света са били инфектирани с HIV, а 42,3 млн са починали от заболявания, свързани със СПИН. Към 2023 г. 39,9 млн души глобално живеят с HIV. В България в края на 2024 г. инфектираните с HIV са 4569.

Огромният мащаб на пандемията от HIV/СПИН, голямото разнообразие от генетични форми на вируса, циркулиращи по света и липсата на специфична профилактика налагат

провеждане на молекулярно-епидемиологични проучвания на пътищата на трансмисия на вируса-причинител, на засегнатите групи население и на връзките между тях с цел ограничаване на вирусното разпространение. Нуждата от по-добро разбиране на епидемиологията на HIV инфекцията в страната и от разработване на ефективни стратегии за нейните превенция и контрол определя актуалността и значимостта на темата на дисертацията.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран съгласно изискванията на Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). Той е с обем от 203 стр. Съдържа: заглавна страница; съдържание (3 стр.); списък с използвани съкращения (3 стр.); списък на фигури (2 стр.); списък на таблици (1 стр.); въведение (2 стр.); литературен обзор (53 стр.); цел и задачи (1 стр.); материали и методи (53 стр.); резултати (50 стр.); дискусия (9 стр.); изводи (2 стр.); приноси (2 стр.); литературна справка (14 стр., включваща 198 литературни източници); благодарности (1 стр.); публикации и участия, свързани с дисертационния труд (5 стр.). Съотношението между отделните раздели на дисертационния труд отговаря на приетите изисквания. Изложението е онагледено от 19 таблици и 42 фигури.

Преглед и оценка на дисертационния труд

В *увода* на дисертационния труд Л. Григорова описва историята на откриването на HIV, мащабите на разразилата се пандемия от HIV/СПИН, генетичното разнообразие на вируса-причинител и пътищата на неговата трансмисия. Обосновава необходимостта от провеждане на клъстерен анализ с цел проследяване разпространението на HIV и анализиране на връзките между различните трансмисионни групи.

Литературният обзор е подробен, добре структуриран, съдържащ актуална информация относно класификацията, състава и структурата на ретровирусите и в частност на лентивирусите. Много подробно е разгледана структурата на HIV-1, неговият геном, вирусните протеини (структурни, регулаторни и допълнителни) и етапите от вирусния репликативен цикъл. Важна част на обзора е разделът, посветен на диагностиката на HIV инфекцията и вирусологичния мониторинг. Описани са различните серологични (скринингови – бързи, ELISA и потвърдителни) и молекулярни методи на диагностика. Дисертантката показва отлични познания по най-съвременните методи в молекулярната вирусология (методи на определяне на вирусния товар, секвениране, филогенетичен анализ). Представени са данни за произхода и еволюцията на HIV-1/ HIV-2 и за номенклатурата на HIV-1, както и характеристики на отделните групи, субтипове, суб-субтипове и CRF и тяхното разпространение по света. Разгледана е връзката между субтипа на HIV-1 и типа на трансмисия, което е пряко свързано с темата на дисертацията.

Обзорът е компетентно написан и свидетелствува за отличната литературна осведоменост на дисертантката, умението ѝ да систематизира, обобщава и интерпретира

съществуващата научна информация по проблема. В обзора Л.Григорова следва подхода да се цитират най-ранните изследвания в дадено направление, с което се обясняват по-старите литературни източници, включени в този раздел.

Собствените проучвания на Л. Григорова започват с глава 2. **Цел и задачи.** Целта на дисертационния труд е да се анализират трансмисионните филогенетични клъстери на различните HIV-1 субтипове, въведени и разпространени в България, чрез секвениране и филогенетичен анализ на фрагмент от *pol* гена на HIV-1.

Точно и ясно са формулирани 5 задачи, които включват основните направления в изследователския процес.

Материалите и методите, използвани за постигане на целта и задачите в проучването, са описани изключително подробно и ясно. Изследвани са плазмени проби от пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV в периода от 1986 г. до 2020 г. Проведен е широк набор от серологични и молекулярно-биологични изследвания по време на диагностичния процес и вирусологичния мониторинг на пациентите с HIV. Демографските и епидемиологичните данни за пациентите са получени от анкетите, които пациентите попълват по време на процеса на диагностициране. В тези въпросници пациентите се самоопределят за принадлежност към уязвими групи и рискови практики. Анализирани са общо 1466 секвенции с дължина 1,2 kb от фрагмент на *pol* гена на HIV-1, който кодира протеазата и обратната транскриптаза - основните целеви ензими за три основни класа антиретровирусни препарати: нуклеозидни и нуклеотидни инхибитори на обратната транскриптаза и протеазни инхибитори.

Отлично впечатление прави подробното описание на използвания метод на секвениране и софтуерните програми, което говори, че дисертантката е добре запозната с тях и ги използва в своите изследвания. Тя проследява последователно всички етапи в процеса на секвениране на HIV-1 с помощта на кита Viroseq. За генотипиране на HIV-1 използва специален софтуер (ViroSeq® HIV-1 Genotyping System), гарантиращ прецизност и надеждност на получените резултати. Провежда филогенетичен анализ, субтипироване и идентифициране на рекомбинатни форми на вирусните геноми с помощта на широк набор от интернет базирани инструменти. За проследяване на трансмисионни клъстери използва програмата MicrobeTrace, която комбинира генетични и епидемиологични данни и показва по какъв начин HIV-1 инфекцията се е разпространила сред различни уязвими групи от населението. Дисертантката не само описва последователно всяка стъпка от протокола на използваните методи, но обяснява и смисъла на даденото действие. Необичайно големият обем на този раздел от дисертацията се обяснява и с широкия набор от използвани биоинформационни програми, чийто компетентно описание може да служи като ценно ръководство за други изследователи в тази област.

Разделът „**Резултати**“ включва 3 големи направления в изследванията. Първата група изследвания обхваща 663 пациента, диагностицирани с HIV-1 субтип В през периода 1986 -2018 г. Извършено е разпределение на пациентите по пол, възраст, страна на произход и

страна на инфектиране, регион на живееене и трансмисионна група. Сред инфектираните със субтип В на HIV-1 Л.Григорова установява преобладаване на групата мъже, които правят секс с мъже (МСМ), следвана от групата хетеросексуални лица (ХЕТ). Дисертантката представя важна информация за разпространението на HIV-1 субтип В в България през годините. Използваната програма MicrobeTrace представя нагледна визуализация на трансмисионните клъстери чрез свързване на възли с линии, като всеки възел представлява отделна пациентска секвенция. Идентифицирани са 52 трансмисионни клъстери, от които 24 клъстера са съставени от 3 или повече последователности, 28 клъстера, включващи двойки секвенции, както и 233 единични секвенции. Дисертантката представя подробно описание на идентифицираните клъстери, като посочва кои трансмисионни групи влизат в дадения клъстер, посоката на предаване на инфекцията между тях, страната на произход и мястото на инфектиране при заразените. В 3-те големи клъстера, съдържащи съответно 56, 59 и 91 секвенции, основната трансмисионна група е МСМ.

Подобни по характер проучвания са извършени при втората група пациенти, 270 на брой, инфектирани с циркулираща рекомбинантна форма CRF01_AE на HIV-1 през периода 1995-2019 г. В тази група преобладават пациентите, употребяващи интравенозни наркотици (УИН), следвани от ХЕТ. Идентифициран е голям клъстер от 154 секвенции, включващ главно групата УИН, други по-малки клъстери с по 7, 5 и 2 секвенции, както и 98 единични секвенции.

Третата група изследвания включва 1053 наивни пациенти, диагностицирани през периода 2012-2020 г. Като наивни са определени пациентите без предходно лечение с антиретровирусни препарати. Л. Григорова представя подробно демографските и епидемиологичните данни на инфектираните пациенти и ги анализира по пол, възраст, регион в страната, страна на инфектиране и трансмисионна група. В тази група отново преобладават МСМ, следвани от ХЕТ. Извършеното субтипироване на секвенциите идентифицира голямо разнообразие от генетични групи с преобладаване на субтип В, следван от CRF01_AE, F1 и CRF02_AG. Л.Григорова анализира разпределението на трансмисионните категории в отделните HIV-1 субтипове и рекомбинантни форми. Наблюдава промени в съотношението между трансмисионните групи по години (от 2012 до 2020 г.). Извършва изключително сложен филогенетичен анализ, включващ 1053 секвенции. За по-голяма прегледност тя представя и 2 отделни филогенетични дървета, включващи секвенции на HIV-1 субтип В (595 секвенции) и HIV-1 не-В субтипове (458 секвенции). С помощта на програмата Cluster Picker идентифицира множество клъстери в рамките на отделните субтипове и рекомбинантни форми. Представя характеристика на пациентите, включени в отделните клъстери, по пол, възраст, регион в страната и страна на инфектиране, трансмисионна група, наличие на съпътстващи сексуално предавани инфекции и др.

Резултатите от проведените изследвания са обобщени и анализирани подробно в раздел „Дискусия“. В този раздел дисертантката представя общ поглед върху демографските и епидемиологичните характеристики на изследваните пациенти, като обобщава получените

данни по отношение на възраст, пол, регион на страната, трансмисионна категория, субтип на вирусите, включени в отделните клъстери. Особено внимание отделя на възможните пътища за разпространение на вируса между отделните уязвими популации. Подчертано е значението на филогенетичния и трансмисионния анализ на HIV-1 в България за разбиране динамиката и сложността на епидемичния процес и за разработване на превантивни мерки, насочени към рисковите групи и пътищата на предаване на вируса.

В края на дисертацията са представени 6 **извода**, които са добре формулирани, съответстват на поставените задачи и отразяват резултатите от проучванията.

Приемам представените 8 **приноса** от дисертантката: 6 с оригинален характер и 2 с приложен.

Литературната справка съдържа 198 литературни източника, от които 2 на български език, останалите на английски език. Общо 30 (15%) източника са от последните 10 години (2014-2024 г.).

Оценка на автореферата

Авторефератът е с обем 82 стр. Съдържанието му представя в систематизиран вид основните резултати от дисертационния труд.

Публикационна активност

Във връзка с темата на дисертацията Л. Григорова има отпечатани 2 научни статии в издания с Q1 и 1 статия в списание без SJR. Така тя събира 50 точки и значително надхвърля изисканите 30 точки в група показатели Г от Минималните национални изисквания, посочени в Правилника за прилагане на ЗРАСРБ - Раздел II. Условия и ред за придобиване на образователната и научна степен "доктор" (изм. и доп, ДВ, бр. 15 от 19.02.2019; Област 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки). Има участия в 2 научни форума, проведени в чужбина и в 18 национални научни прояви.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Любомира Григорова е актуален, изпълнен отлично на високо методично ниво и написан на много добър научен език. В своето проучване тя представя много ценен преглед на епидемията от HIV в страната през голям период от време, като съчетава молекулярно-генетичните характеристики на доказаните вируси с демографските и епидемиологични данни на инфектираните лица. Голяма заслуга на дисертантката и на нейния научен ръководител е използването на най-съвременните молекулярно-генетични и биоинформационни инструменти за характеризиране на HIV, причинител на тази важна за индивидуалното и общественото здраве инфекция. Дисертационният труд отговаря на задължителните и специфични условия и наукометрични критерии в ЗРАСРБ (изм. и доп. ДВ, бр.15 от 19 февруари 2019 г.) и на Правилника за прилагането му. Давам положителна

оценка и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Любомира Свиленова Григорова образователната и научна степен „Доктор” в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. Биологически науки; научна специалност Вирусология.

.....

/проф. д-р Н.Корсун, дмн/