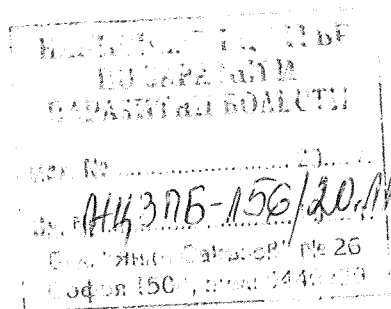




До председателя на научното жури,
определено със заповед № 276 от 06.10.2025 г.
на Директора на НЦЗПБ

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд
на доц. **ИВАЙЛО АЛЕКСИЕВ ИВАНОВ**, д-р
на тема **«АНТИРЕТРОВИРУСНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И МОЛЕКУЛЯРНА
ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА HIV-1 В БЪЛГАРИЯ: ИНТЕГРИРАН АНАЛИЗ НА
ГЕНЕТИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ, ФИЛОДИНАМИКАТА И ДЕМОГРАФСКИТЕ
КОРЕЛАЦИИ»**

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

Рецензент: проф. д-р **НЕЛИ СТОЯНОВА КОРСУН**, д-мн

Биография

Ивайло Алексиев Иванов е възпитаник на Биологическия факултет в Софийския университет „Св. Климент Охридски“, където се дипломира като магистър през 1994 г. От 2003 г. работи в НПРЛ по HIV в НЦЗПБ. Придобива специалност „Клинична вирусология“ през 2008 г. От 06.2008 до 09.2011 г. е докторант в НЦЗПБ, където в 2011 г. защитава дисертация на тема „Молекулярно-вирусологично характеризиране на епидемията от HIV-1 в България чрез секвениране и филогенетичен анализ“ и придобива ОНС „Доктор по вирусология“. През 2014 г. е избран за „Доцент“; от 2016 г. е завеждащ НРПЛ по HIV, а от 2024 г. е завеждащ отдел Вирусология при НЦЗПБ. Преминал е 6 специализации по молекулярно-биологични методи и биоинформатика във водещи научни центрове в Атина, Гърция (2006 г.), Кайро, Египет (2009 г.), CDC Atlanta, САЩ (2013 г.), Рим, Италия (2014 г.), Люксембург (2016 г.) и Гейнсвил, САЩ (2016 г.). Специализацията в Университета на Флорида в Гейнсвил е с продължителност 5 месеца и е на базата на спечелена стипендия „Фулбрайт“ за преподаване и изследвания.

Актуалност на темата на дисертационния труд

Пандемията от HIV/СПИН е една от най-разрушителните глобални здравни кризи през последните десетилетия. Според данни на UNAIDS от старта на епидемията през 1981 г. повече от 91,4 милиона души са се инфектирали с HIV, а приблизително 44,1 милиона са починали вследствие на СПИН-свързани заболявания. На фона на липсваща ваксинапрофилактика, единственото средство, пречатстващо прогресирането на

заболяването и редуциращо трансмисията на вируса, е комбинираната антиретровирусна терапия (АРТ). Благодарение на нейното широко използване е редуцирана заболяемостта и смъртността от СПИН, а продължителността на живот на болните - значително удължена. Своевременното назначаване на препарати, потискащи репликацията на HIV, в комплекс с профилактика и лечение на опортюнистичните инфекции, позволява да се възстанови имунната система, да се спре прогресирането на болестта, да се съхрани трудоспособността и да се подобри качеството на живот на инфектираните с HIV.

Огромният мащаб на пандемията от HIV/СПИН, голямото разнообразие от генетични форми на вируса, циркулиращи по света, силно изменчивата природа на вируса, водеща до сравнително бързо формиране на резистентност към използваните антивирусни препарати налагат провеждане на многостранно проучване на антиретровирусната резистентност в страната с характеризирани на генетичните и епидемиологични механизми, оказващи въздействие при формирането ѝ както на индивидуално, така и на популационно ниво. Нуждата от по-добро разбиране на състоянието на антиретровирусна резистентност, както и на молекулярната епидемиология на HIV инфекцията в страната определя безспорната актуалност и значимост 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 (ЗРАСПБ)*. Той е с обем от 310 стр. Съдържа: заглавна страница; съдържание (2 стр.); списък с често използвани съкращения (1 стр.); списък на приложени таблици (1 стр.); списък на приложени фигури (1 стр.); въведение (3 стр.); литературен обзор (87 стр.); цел и задачи (2 стр.); материали и методи (63 стр.); резултати (92 стр.); дискусия (28 стр.); изводи (4 стр.); приноси (3 стр.); библиография (15 стр., включваща 332 литературни източника и 10 он-лайн ресурси и база данни); приложения (5 стр.), включващи списък на публикациите, свързани с дисертацията, специализации и обучения в чужбина, международно сътрудничество, награди, членство в научни организации и благодарности. Съотношението между отделните раздели на дисертационния труд отговаря на приетите изисквания. Изложението е онагледено от 43 таблици и 58 фигури.

Преглед и оценка на дисертационния труд

Във *въведението* на дисертационния си труд доц. Алексиев описва историята на откриването на HIV, мащабите на разразилата се пандемия от HIV/СПИН, класификацията на HIV-1 на групи, субтипове, циркулиращи и уникални рекомбинатни форми и тяхното разпространение по света. Разкрива риска от формиране на лекарствена резистентност и обуславя необходимостта от провеждане на интегриран анализ на резистентни мутации, субтипово разнообразие, филогенетични връзки и демографски корелации с цел оптимизиране на терапията и разработването на национални стратегии за превенция на антиретровирусната резистентност.

Литературният обзор е подробен, добре структуриран, отлично написан, богато илюстриран и увлекателен при четене. Разгледана е историята на откриване на човешките ретровируси, тяхната биология и подробна класификация. Много подробно е описана 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 антиретровирусните медикаменти, историята на тяхното откриване и съвременното състояние на АРТ. Обект на дисертацията на 3 класа антивирусни препарати – NIRT, NNIRT и PI, които са описани подробно с механизмите на тяхното действие. Централна част на обзора, свързана с темата на дисертацията, е посветена на антиретровирусната резистентност – модели на резистентност (трансмисионна, придобита и първична), механизми на формиране на резистентност и методи на изследвания за резистентност. Подробно са описани често срещани резистентни мутации при всеки един от 3-те анализирани класа антиретровирусни препарати, механизмите на тяхното формиране и въздействието им върху чувствителността на препаратите. Характеризирани са резистентните мутации при различните модели на резистентност и влиянието на субтипа на HIV-1 върху лекарствената резистентност.

Следващият важен раздел на обзора разглежда генетичното разнообразие на HIV-1, като включва няколко подробно описани подраздели: Произход и номенклатура на HIV; Класификация и номенклатура на HIV-1; Глобално и регионално разпространение на генетичните варианти на HIV-1; Клинично и епидемиологично значение на генетичното разнообразие; Предизвикателства пред разработването на ваксини; Еволюционна динамика и бъдещи перспективи. В края на обзора са разгледани методите за субтипироване и филогенетичен анализ. Подробно са описани 4 интернет базирани инструмента за субтипироване, принципите и етапите на мануален филогенетичен анализ, както и методите за анализ на филогенетични клъстери. Този подраздел демонстрира отличното познаване на съвременните методи в молекулярната биология, които са използвани от дисертанта в неговите изследвания и анализи.

Обзорът е компетентно написан и свидетелствува за отличната литературна осведоменост на дисертанта, умението му да систематизира, обобщава и интерпретира съществуващата, включително най-новата научна информация по проблема.

Собствените проучвания на доц. Алексиев започват с глава 2. **Цел и задачи.** Целта на дисертационния труд е провеждане на комплексен анализ на молекулярната епидемиология и антиретровирусната резистентност на HIV-1 в България чрез интегриран подход, включващ генотипизиране, филогенетичен анализ, характеризиране на резистентни мутации, изследване на трансмисионни мрежи и филодинамично моделиране, с цел оптимизиране на терапевтичните стратегии и усъвършенстване на политиките в областта на общественото здраве.

Точно и ясно са формулирани 21 задачи, разделени в пет групи, 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. В началото на раздела е дадена обща характеристика на изследваната кохорта лица, инфектирани с HIV-1 в България от 1986 г. до края на 2023 г. с разделянето им според пол и начин на заразяване. Обект на изследвания в дисертационния труд са плазмени проби на 1654 пациента с HIV-1 инфекция, в които е секвениран фрагмент от *pol* гена на вируса с дължина 1,2 kb. 970 от анализираните секвенции са публикувани в GenBank, което показва тяхното високо качество.

Подробно са описани използваните 2 платформи за секвениране: *TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit* (Siemens) и *ViroSeq™ HIV-1 genotyping system v2.0* (Abbott) с последователно представяне на етапите от изпълнение на методите. Резистентни мутации са идентифицирани чрез сравняване на получените секвенции с референтната HXB2 секвенция на HIV-1. Използвана е програмата Stanford HIVDB за фенотипен анализ на резистентността, при която за всяка резистентна мутация се въвеждат наказателни точки спрямо даден медикамент, базирани на експериментални данни и клинични проучвания. Чрез сумиране на точките за всяка отделна резистентна мутация се прави обща оценка за резистентността към даден медикамент. В рамките на тази програма се въвеждат пет различни нива на лекарствена резистентност: потенциално ниска, ниска, средна и висока. Представена е класификация на резистентните мутации, разделени на полиморфни, неполиморфни (резистентни) мутации и мутации, свързани с фенотипните характеристики и групиране на мутациите по класове медикаменти.

Друга основна група използвани методи са методите на субтипичане на HIV-1. Описани са подробно няколко интернет-базирани инструменти като COMET, REGA, HMM-based jпHMM, RIP и BLAST Search, както и използваните мануални методи за филогенетичен анализ. Важно достижение в използваната методология е Байесова филогенетика и калибриране на молекулярния часовник за датиране на еволюционни събития.

Използването на програмите *BEAST*, *ClusterPicker* и *MicrobeTrace* за идентификация и визуализиране на сложните мрежи от връзки между различни демографски и рискови групи представлява друго модерно методологично постижение. Тези три метода в съвкупност формират интегриран подход за изследване на молекулярно-епидемиологичните характеристики на HIV-1 инфекцията в България.

Отлично впечатление в раздела *Материали и методи* прави използването на най-съвременни молекулярно-биологични методи и биоинформационни програми, тяхното подробно и компетентно описание.

В началото на раздел „*Резултати*“ доц. Алексиев прави подробен и задълбочен анализ на изследваната кохорта пациенти с разделянето им по пол, възраст, страна на произход и страна на инфектиране, регион на живееене и трансмисионна група.

Първото важно направление в проведените изследвания е анализът на резистентните мутации. Дисертантът представя обобщена извадка на броя проби с доказани резистентни мутации при различни категории пациенти според техния пол, трансмисионна група, страна на произход, вероятна страна на инфектиране, регион на живееене, бременност, наличие на СПИ, секс срещу заплащане и лица, лишени от свобода. Установява статистически значими разлики в броя проби с резистентни мутации при някои категории пациенти. По-висок брой намира в групата на МСМ, както и при лицата, употребяващи интравенозни наркотици и обобщава, че към тези групи трябва да се насочат усилията за превенция и контрол на разпространението на резистентни щамове.

Подробно представя всички идентифицирани резистентни мутации към всеки един от 3-те класа антиретровирусни препарати – техният брой (%) и участие в комбинации от мутации. Анализира нивото на резистентност (потенциално ниска, ниска, средна и висока) към отделните препарати като оценява фенотипното отражение на ефекта от резистентните мутации по точковата система. Представя подробно честотата на резистентни мутации към различните класове медикаменти (Главни PI, Допълнителни PI, NRTI и NNRTI) при различните категории от изследваната популация, като при всички сравнения прилага статистически обработка на резултатите.

Второто важно направление в проведените изследвания включва субтипизиране и филогенетичен анализ на доказаните HIV-1 при 1654 инфектирани лица. Установява голямо генетично разнообразие с доказани 26 различни субтипове, CRF и URF, сред които доминира субтип В, последван по честота от CRF01_AE и CRF02_AG. Анализира броя и дела на резистентни мутации при отделните субтипове, CRF и URF. Представя разпределение на всички доказани субтипове, CRF и URF при различните категории пациенти, разделени според пол, трансмисионни групи, място на инфектиране и регион в страната.

Друг фокус в проведените изследвания са трансмисионните кълъстери. Филогенетичният анализ на субтип В идентифицира 127 трансмисионни кълъстера, съдържащи 298 секвенции. Дисертантът представя подробна характеристика на резистентните мутации спрямо всеки един от 3-те класа антиретровирусни медикаменти (Главни PI, Допълнителни PI, NRTI и NNRTI), идентифицирани в отделните кълъстери. Подобни анализи са проведени по отношение на други субтипове (F1, A1, A6 и C) и рекомбинантните форми (CRF01_AE, CRF02_AG и URF).

В отделен раздел е анализирана честотата на антиретровирусна резистентност, субтипово разнообразие и географско разпределение на HIV-1 при ИБН. За изясняване на

произхода и еволюционната динамика на основните HIV-1 субтипове при ИВН в България, доц. Алексиев извършва анализ чрез Байесов молекулярен часовник. Приложените филогенетични дървета показват най-скорошния общ предшественик и географското разпространение на CRF01_AE и CRF02_AG. Подобен анализ е извършен и по отношение на субтип В при ХЕТ пациенти.

Проведен е подробен анализ на резистентни мутации при субепидемията от субтип В. Първоначално е представена обобщена характеристика на HIV-1 субтип В инфекциите в България, произходът на субтип В инфекциите, след което е анализирано разпространението на идентифицираните 70 резистентни мутации. Подобни по характер анализи са проведени по отношение на суб-епидемията от CRF01_AE и субтип С. Приложените филогенетични дървета илюстрират мястото на българските секвенции сред глобалните такива. Интерес представляват фигурите, демонстриращи тенденциите в разпространението на субтип С и заключението, че най-скорошният общ предшественик на този субтип е от 1954 г.

В края на раздел *Резултати* е анализирана трансмисионната резистентност в България през периода 2012-2020 г. на базата на изследвани 1053 клинични проби от наивни за антиретровирусна терапия лица с HIV-1. Установени са мутации, свързани с ТЛР, при 60 (5,7%) от инфектираните лица. Представена е честотата на всички идентифицирани резистентни мутации, както и нивото на резистентност (потенциално ниска, ниска, средна и висока) за отделните лекарствени препарати. Чрез програмата MicrobeTrace са характеризирани трансмисионните клъстери при отделните субтипове и рекомбинантни форми, както и идентифицираните резистентни мутации в отделните клъстери.

Разделът „*Резултати*“ обхваща многобройни изследвания и анализи, които в съвкупност създават една многостранна картина на епидемията от HIV-1 в България с фокус върху антиретровирусната резистентност, генетичното разнообразие и филодинамиката на вируса както и върху трансмисионните клъстери.

Резултатите от проведените изследвания са обобщени и анализирани подробно в раздел „*Дискусия*“. В този раздел дисертантът пр едставя общ поглед върху демографските и епидемиологичните характеристики на изследваната популация, като обобщава получените данни по отношение на възрастовата структура и половото разпределение, регион на страната, трансмисионни категории и рисково поведение, международни връзки и миграционни фактори, специални популации и уязвими групи, социални детерминантни и неравенства. Обобщени са получените данни за антиретровирусната резистентност – общи тенденции в резистентността, трансмисионна лекарствена резистентност, мутационни профили и клинично значение, субтип-специфична резистентност, резистентност в трансмисионните клъстери, въздействия на резистентността върху терапията. Авторът интерпретира получените данни за нивото на резистентност и препоръчва специфични диагностични и терапевтични подходи при отделните класове препарати.

Анализирано е изключителното високото генетично разнообразие на HIV-1 в България, което значително надвишава наблюдаваното в повечето европейски страни. Представена е динамиката в разпространението на отделните субтипове (B, C, F1, A1 и A6) и рекомбинантни форми (CRF01_AE, CRF02_AG и URF) в България в контекста на начало на въвеждане в страната, епидемиологични връзки с др. страни, засегнати трансмисионни групи, идентифицирани резистентни мутации.

На базата на филодинамичен анализ е даден общ поглед на епидемията от HIV-1 в страната: експоненциален подем преди 1990 г., плато в периода 1990-1996 г., и нов кратък експоненциален растеж около 2000 г., последван от стабилизиране. Анализът на трансмисионни мрежи и клъстери показва, че освен големи клъстери са идентифицирани множество клъстери включващи малък брой секвенции (2-3 секвенции). Географският анализ разкрива неравномерно разпределение на различните субтипове в страната, което има значение при планирането на превантивните програми и разпределението на ресурсите.

Авторът формулира ценни препоръки към клиницистите - провеждане на тест за резистентност преди инициране на антиретровирусна терапия, периодично тестване на вирусния товар и своевременно преминаване към алтернативни режими при признаци на терапевтичен неуспех. Той подчертава необходимостта от персонализиран терапевтичен подход, базиран на вирусния субтип, знание на трансмисионната група и история на предходно лечение.

Разглежда значението на данните от генотипизирането и антиретровирусната резистентност в системата за надзор и общественото здравеопазване от гледна точка проследяване на тенденциите, навременно идентифициране на възникващи резистентни клъстери и за планиране на интервенции на популационно ниво.

В края на раздела „Дискусия“ дисертантът коментира от една страна ограниченията на своето проучване, от друга – неговото значение за общественото здравеопазване. Този подход демонстрира способност за критична оценка, която би позволила преодоляване на посочените ограничения и увеличаване на ползите за обществото в бъдещите проучвания.

В края на дисертацията доц. Алексиев представя 21 **извода**, групирани в 5 направления, които са отлично формулирани и съответстват на поставените задачи. Дисертантът не само извежда изводи от получените резултати, но също посочва значението на тези резултати и предлага препоръки за бъдещи действия.

Приемам представените от доц. Алексиев 11 **приноса** с научно-оригинален характер и 8 приноса с научно-приложен характер. Сред множеството постижения на дисертанта бих открила въведените методи за филодинамичен анализ и датиране на еволюционни събития чрез молекулярен часовник, които са извършени за първи път в страната.

Библиографията съдържа 342 литературни източника, от които 336 на английски език и 6 на български език. В библиографската справка са включени 4 книги и монографии на английски език и 10 он-лайн ресурси и база данни.

Оценка на автореферата

Авторефератът е с обем 125 стр. Съдържанието му представя в систематизиран вид основните резултати от дисертационния труд.

Публикационна активност

Във връзка с темата на дисертацията доц. Алексиев представя 8 научни статии, от които 7 са в издания с Q1 и 1 е в издание с Q2 (общо 195 точки от показател Г7), както и една монография, която не е представена като основен хабилизационен труд (30 точки от показател Г5). Общият импакт фактор на публикациите е 29.971. В 6 (75%) от публикациите доц. Алексиев е първи автор, което говори за водещата му роля в значителна част от научните изследвания. Представените 8 публикации имат 54 цитирания в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus) (108 точки от показател Д11). Цитиранията в световните бази данни показват значимостта на разработваните от дисертанта научни теми и признанието на международната академична общност. Н-индексът на доц. Алексиев без автоцитирания е 12.

От изложените по-долу таблици става ясно, че представените от доц. Алексиев доказателства по отделните групи показатели от *Правилника за прилагане на ЗРАСРБ* покриват и надхвърлят минималните национални изисквания за придобиване на научната степен „Доктор на науките“, посочени в този правилник (изм. и доп., ДВ, бр. 15 от 19.02.2019 г.): група А (дисертационен труд – 50 точки), група Б (дисертационен труд – 100 точки), група Г (225 точки при изискани 100 точки) и група Д (108 точки при изискани 100 точки). Доц. Алексиев събира общо **483** точки и надхвърля изискуемия брой от 350 точки.

Съответствие спрямо минималните национални изисквания, съдържащи се в Правилника за прилагане на ЗРАСРБ – Раздел III. Условия и ред за придобиване на научната степен "Доктор на науките" (изм. и доп, ДВ, бр. 15 от 19.02.2019; Област 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки) и в Правилника на НЦЗПБ.

Таблица. Брой точки по показатели

Група от показатели	Показатели	Брой точки по показатели според Правилника за прилагане на ЗРАСРБ	Брой точки на база представени доказателства
А	1. Дисертационен труд за ОНС „Доктор“	50	50
Б	2. Дисертационен труд за присъждане на научна степен "доктор на науките"	100	100
Г	5. Публикувана монография, която не е представена като основен хабилитационен труд	30	30
	7. Научна публикация в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), извън хабил. труд	25 за публ. в Q1 20 за публ. в Q2	175 (7 x 25) 20 (1 x 20)
Д	11. Цитирания в научни издания, монографии, колективни томове и патенти, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus)	2	108 (54 x 2)
	Общ брой точки		483

Таблица 2. Минимални изисквани точки по групи показатели за придобиване на научната степен „Доктор на науките“ и брой точки на база представени доказателства

Група от показатели	Показатели	Изискуем минимален брой точки според Правилника за прилагане на ЗРАСРБ	Брой точки на доц. Ив. Алексиев на база представени доказателства
А	Показател 1	50	50
Б	Показател 2	100	100
В	Показатели 3 и 4	-	-
Г	Сума от точките в показатели от 5 до 10	100	225
Д	Сума от точките в показател 11	100	108
	Общ брой точки	350	483

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на доц. Ивайло Алексиев е актуален, блестящо изпълнен на високо методично ниво, включващ важни за индивидуалното и общественото здраве находки, относно инфекцията с HIV. В своя труд авторът представя обширен и многоаспектен преглед на епидемията от HIV-1 в страната през 35-годишен период от

време, като съчетава данните за антиретровирусна резистентност и молекулярно-генетичните характеристики на доказаните вируси с демографските и епидемиологични корелации в изследваната популация. Получените резултати представляват значителен и оригинален принос в проучванията на HIV инфекцията и нейното лечение.

Дисертационният труд отговаря на задължителните и специфични условия и наукометрични критерии в *Закона за развитие на академичния състав в Република България* (изм. и доп. ДВ. бр.15 от 19 февруари 2019 г.), на *Правилника за прилагането му* и на *Правилника на НЦЗПБ*. Давам положителна оценка и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на доц. Ивайло Алексиев научната степен „Доктор на науките” в област на висшето образование **4. Природни науки, математика и информатика**; професионално направление 4.3. **Биологически науки**; научна специалност **Вирусология**.

11.11.2025 г.

.....

/проф. д-р Н. Корсун, дмн,
член на научното жури/