

СТАНОВИЩЕ

от Проф. Д.м.н. РАДКА МЛАДЕНОВА АРГИРОВА, придобито звание в Националния Център по заразни и паразитни Болести, София, по специалност „вирусология“, в момента на работа в Аджъбадем Сити Клиник Токуда Болница, Клинична Лаборатория – звено „Имунология и молекулярно-биологична диагностика“, София

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика

професионално направление 4.3 Биологически науки

докторска програма Молекулярна биология към Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“

Автор: МИЛЕНА МАЗАЛОВСКА

Тема: „Разработване на мултифункционални ваксини – транзитна експресия на имуногенни белтъци в тютюн“

Научен ръководител: Гл. ас. д-р Гергана Захманова и проф. Д.б.н. Иван Никифоров Минков

1.Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № Р33-1358 от 07.04. 2017 на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Разработване на мултифункционални ваксини – транзитна експресия на имуногенни белтъци в тютюн“ за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма Молекулярна биология . Автор на дисертационния труд е МИЛЕНА МАЗАЛОВСКА – редовна докторантка към катедра . „Физиология на растенията и молекулярна биология“ на ПУ „Паисий Хилендарски, Пловдив. с научен ръководител гл.ас. д-р Гергана Захманова и Проф. Д.б.н. Иван Никифоров Минков от ПУ „Паисий Хилендарски“ Пловдив.

Представеният от Милена Мазаловска комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи: Молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд; Автобиография в европейски формат; Нотариално заверено копие от диплома за висше образование (ОКС ‘магистър’), Заповеди за записване в докторантура, прекъсване и продължаване на обучението; Заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан изпит по специалността с успех отличен (6.00); Протоколи от катедрени съвети, свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд; Дисертационен труд; Автореферат; Списък на научните публикации по темата на

дисертацията; Копия на научните публикации; Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи; Справка за спазване на специфичните изисквания на Биологическия факултет. Докторантката е приложила 2 публикации, 1 резюме и 7 участия в български и международни научни прояви. Едната публикация е с IF=1,870, в нея докторантката е първи автор.

Бележки и коментар по документите: Не е представен списък на забелязаните цитирания. Не е представен пълния текст на двете публикации.

Дисертантката е завършила висшето си образование в ПУ“Паисий Хилендарск“ в Пловдив през 2009 г. като бакалавър по молекулярна биология, а в 2011 г е защитила магистратура по молекулярна биотехнология. Следват 1 едномесечна специализация в Италия и 3 тримесечни в Англия – всички по експресия на белтъци на HEV в различни растения. Специализациите са осъществени със стипендии предоставени от British Scholarship Trust и FEBS. Няколкомесечната специализация в САЩ със стипендия Fulbright в Arizona State University – Биодизайн Институт, Темпе, както и всички споменати дотук стипендии на Мазаловска са свързани с темата на дисертационния и труд, т.е. с получаване на биофармацевтични продукти в растения.

1. Актуалност на тематиката.

Актуалността на избраната тема е извън съмнение – първо по отношение на подхода – търсене на експресия на белтък/ци в растения

и второ - по отношение на обекта. Както е известно, HEV не е екзотична инфекция за Европа и България /виж П.Теохаров, А.Кеворкян, Вирусни хепатити, 2015, София/ , поради което е хиподиагностицирана. Протича тежко /дори фатално/ при имунокомпрометирани пациенти и бременни, за което все по-често се налага да се мисли. С въвеждането на терапията на HCV-инфекцията, диференциалната диагноза с HEV стана ежедневие и тази инфекция вече е често срещана. Доказано е превалирането на генотип 3 на HEV у нас. Счита се за смелост избора на темата, още повече, че в света днес има само две ефективни ваксини, като само едната от тях е лицензирана за употреба в Китай. Особено активно се работи по темата в Индия. Ian Frazer открива вирусоподобните частици (VLPs) през 1991г. и днес те са в основата напр. на глобално използваната ваксина срещу човешкия папиломен вирус /HPV/. Напомням също, че по време на епидемията от Ебола през 2014 г. бе получен т.нар. Zmapp - експериментален коктейл от 3 моноклонални антитела, отгледани в специално модифицирани тютюневи листа и този коктейл е довел до пълно оздравяване на маймуни, експериментално заразени с вируса. Всичко това говори за висока степен на актуалност и дори необходимост на този труд.

2.Познаване на проблема

Литературният обзор на дисертационния труд ясно показва отлично познаване на проблема, както и творческа оценка на наличните към момента литературни данни. Като пример мога да посоча, че авторката много точно си дава сметка за „нишите“ по отношение на жизнения цикъл на HEV. Особено добре обаче това се вижда в приложените дискусии към всяка отделна глава-задача, където Мазаловска търси обяснения за някои „неуспешни“ опити или по-скоро опити с неочакван резултат–

напр. ролята и мястото на гликозилирането на конструктори с различни дължини, ролята на шаперони от класовете HSP70/HSP90 за предотвратяване на клетъчната апоптоза и др.

4. Методика на изследването

Използваната методика е напълно адекватна на целта и задачите в дисертационния труд. Приложените методи са съвременни и надеждни, но дисертантката не е описала редица важни подробности – напр. откъде са взети използваните в блотовете антители/ няколкото моноклонални антители. В раздела „Материали и методи“ би трябвало да се опишат по кои автори са основните извършвани методи, напр. това не е детайлно направено за получаването на конструкторите в *A. tumefaciens*.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Преди всичко не е убедително заглавието на дисертационния труд, тъй като „Разработване на мултифункционални ваксини“ няма. Дисертационният труд е изцяло посветен на експресията и продукцията на антигенни/имуногенни белтъци и вирусоподобни частици на хепатит Е вируса (HEV) чрез използването на транзитна експресионна система, базирана на мозаичния вирус по дребния боб *Vigna unguiculata* (CPMV) в растения – тютюн. Трудът не е построен съвсем стандартно. Имам предвид главно разделите относно собствените резултати. Оправдавам напълно дискусиите след всяка глава-задача, тъй като целите и резултатите в отделните глави са различни. Тъй като не мога да се спра на всички приноси подробно, ще оценя само някои от тях.

На първо място е важният теоретичен принос относно възможността за формиране на VLPs в тютюн, използвайки различни конструктори и сравнителен подход. Тя сама посочва, че много малко се знае по този въпрос по отношение на малките вируси без обвивка, затова е странно, че това не е посочено като теоретичен принос. VLPs формират само конструктори HEV 110-610; HEV 110-610 M2e и химерните конструктори HBcAgHEV.

По отношение на приноса за определянето на антители към HEV за целите на диагностиката. Използването на химерните конструктори като антигени /във вирусо-подобните частици/е показало много ниска ефективност на разпознаване на серумните анти-HEV IgG и IgM антители. Тогава като антиген се изпитва рекомбинантен растително-продуцираният HEV ORF2 антиген на генотип 3, като е показано отработването на in-house ELISA с използването на човешки серуми и такива от прасета. Чувствителността на теста е все още ниска при висока специфичност. Антигенът/ните за тази ELISA са специално пречистени и „снабдени“ с хистидинови тагове в N- или C-краищата на рекомбинантния антиген. Използването на подобен подход вероятно може още повече да подобри чувствителността на реакцията. Това е сериозен научен, научно-приложен и технологичен принос.

Силно впечатление правят експериментите по създаване и успешно експресиране на химерни гени, базирани на капсидния белтък на хепатит Е с M2 пептида от грипния вирус тип А по птиците, както и химерни гени, базирани на капсидния белтък на хепатит В, съдържащ неутрализиращия регион на хепатит Е. Тези експерименти експлоатират известния факт, че имуногенността на малки белтъци може да се повиши значително чрез „представянето“ им върху различни вирусни носители. Като такива в случая са използвани капсида на HBV и ORF2 капсида на HEV. И двата са високо имуногенни, както и способни да се самосглобяват в икосаедрални VLPs. Направен е опит HBV VLPs и HEV VLPs да се използват като носители на консервативния в щамовете на тип А M2 протеин на

грипен птичи вирус и като такъв - обещаващ кандидат за „универсална“ антигрипна ваксина. М2 протеинът е слабо имуногенен и трябва да се прикрепя към „носител“, за да се превърне в ефективен имуноген. За целта се създават С-модифициран HBV и N- и С-модифициран HEV ORF2 капсидни протеини. Тези експерименти за първи път демонстрират формиране на химерни VLPs при експресията им в растения. Те са израз на смело творческо мислене и иновативно приложение на биотехнологията.

Имам и някои критични бележки – например за някои фигури не са посочени източниците им /Фиг. 1,5,24 и др./, на стр. 102 се казва „няколко изследвания“, без да са цитирани, не са посочени и източниците на финансиране на този толкова скъп научен труд, има и някои терминологични неточности. Тези бележки не намаляват научната стойност на дисертационния труд и аз напълно одобрявам формулираните от автора приноси. Същевременно, тези приноси биха имали още по-висока стойност, ако бяха публикувани *in extensu* в подходящи научни списания.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Начинът, по който е написан и подреден този труд, както и изрядната илюстративност на получените резултати не оставят в мене съмнения относно личния принос и участие на докторантката. Това ми убеждение се засилва и от 7-те ѝ участия с устни и постерни презентации по темата, както и от одобренията и подкрепата на чуждестранните спонсори и участието ѝ /както и на колектива на Катедрата/ в редица Проекти, финансирани от МОН и от 7-ма Рамкова Програма.

7. Автореферат

Авторефератът отразява точно и пълно експерименталните резултати в дисертацията, както и направените изводи и приноси.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Най-ценното на този дисертационен труд е, че той е прекрасна основа за бъдещи изследвания и за творчество в областта на генетиката и биотехнологията. Пожелавам успех и заслужено кариерно развитие на автора и колектива в перспективното направление, което са подели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Милена Мазаловска съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологическия Факултета, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Милена Мазаловска притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност молекулярна биология и биотехнология, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’ на Милена Мазаловска в област на висше образование: 4.Природни науки,

математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма Молекулярна биология.

София, 29.05. 2017 г.

Изготвил становището:
/Проф. Д.м.н. Радка Мл. Аргирова/

АДРЕС:

ДОЦ. МАРИАНА ГОЗМАНОВА

УЛ. „ЦАР АСЕН“ 24

ПЛОВДИВ 4000

GSM: 0897 85 46 26

ИЗПРАЩА:

ПРОФ. ДМН РАДКА АРГИРОВА

ТОКУДА БОЛНИЦА – КЛИН. ЛАБ.

БУЛ. „Н.Й.ВАПЦАРОВ“ 51 Б

СОФИЯ 1407

GSM: 0884 99 32 95

