

## СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Нели Стоянова Корсун, д.м.н. -

Отдел Вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести,  
член на научно жури по защита на докторска дисертация,  
определено със заповед РД 38-599/25.11.2014 г.  
на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски”

относно дисертационен труд на тема:

**„Разпространение и генетично разнообразие на  
Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България“**,

представен за присъждане на образователната и научна степен „доктор“  
по професионално направление 4.3. Биологически науки (Вирусология)

от **Калина Август Шишкова** – свободен докторант  
към Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски”  
с научен ръководител проф. д-р **Златко Кълвачев, д.м.н.**

Дисертационният труд на Калина Шишкова е посветен на разработване на диагностична система за доказване и генотипова идентификация на Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae), с помощта на която се проучва тяхното разпространение и генетично разнообразие в България.

Анеловирусните инфекции представляват една нова, недостатъчно добре изследвана област от инфекциозната патология. Човешките анеловируси Torque Teno Virus (TTV), Torque Teno Mini Virus (TTMV) и Torque Teno Midi Virus (TTMDV) са открити сравнително наскоро – през 1997, 2000 и 2007 г., съответно. Вирусите притежават редица уникални характеристики: разпространени са повсеместно (над 90% от лицата на възраст над 1 год. са инфектирани); вирусна ДНК се доказва в кръвната плазма и други телесни течности и тъкани на почти всички индивиди независимо от възрастта и здравния статус; инфекцията се придобива още в първите дни на живота и персистира пожизнено с постоянна виремия и активна вирусна репликация; установява се висока честота на ко-инфекции с два или три анеловируса; липсват убедителни данни за техния етиологичен и патогенетичен потенциал. Повсеместното разпространение на анеловирусите затруднява доказването на връзката им с определени клинични прояви. Предполага се участието на тези вируси в патогенезата на различни заболявания – чернодробни, респираторни, онкологични, хематологични, бъбречни, автоимунни и др., но причинно-следствената връзка засега не е категорично доказана. Липсата на подходящи *in vitro* модели за репликация и намножаване на анеловирусите, тяхната изключителната генетична хетерогенност, затрудняваща разработването на универсални PCR системи за доказването им, са основни причини за множеството неизяснени аспекти, касаещи епидемиологията, патогенезата и клиничния спектър на инфекциите. Налице са редица проблеми,

свързани с класифицирането на анеловирусите, с методите на техния скрининг, генетично характеризирани и генотипова идентификация. В България тези вируси не са проучвани и в този смисъл актуалността и практическата приложимост на настоящата дисертация са безспорни.

Дисертационният труд е структуриран съгласно изискванията на „Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България“. Той е в обем 87 стр. и съдържа заглавна страница; съдържание; въведение (2 стр.); обзор на литературата (28 стр.); цел и задачи (1 стр.); материали и методи (13 стр.); резултати (22 стр.); обсъждане (3 стр.); изводи (2 стр.); литература (126 литературни източника); списък на публикациите и научните съобщения, свързани с дисертационния труд (1 стр.); научни приноси (1 стр.). Изложението е онагледено от 15 таблици и 16 фигури.

Литературният обзор е изчерпателен, информативен, интересно написан. Разгледани са подробно историята на откриването на анеловирусите, разпространението им в човешката популация, патогенезата и клиничните прояви на инфекциите, имунният отговор, класификацията, структурата и репликацията на вирусите. Особено внимание е отделено на възможната етиологична или патогенетична роля на анеловирусите при редица заболявания – чернодробни, респираторни, хематологични, онкологични. Използвани са основните налични литературни източници в световната научна литература. От обзора проличава задълбочената теоретична подготовка на дисертантката, уменията ѝ да систематизира, обобщава и интерпретира литературните данни.

Целта и 4-те задачи са формулирани точно и ясно, използваните съвременни молекулярно-генетични техники позволяват тяхното постигане. Подробно са описани използваните методи за екстракция на вирусна ДНК, като е извършена количествена и качествена оценка на екстрахираните ДНК. С цел подобряване чувствителността и специфичността на молекулярната детекция на TTV е използван nested PCR с три праймерни системи, комплементарни към различни участъци на вирусния геном. Секвенциите на праймерите са заимствани от реномиран литературен източник (The Lancet). Вариантите на PCR са описани подробно и прецизно, което говори за добро владение на методологията.

В раздела „Резултати“ са представени резултатите от изследване на 535 кръвни проби от 270 здрави индивиди (кръводарители) и от пациенти с различни заболявания с цел доказване наличие на анеловирусна ДНК. Преди да пристъпи към изследване на кръвните проби дисертантката оптимизира своите диагностични методи – сравнява различните техники за екстракция на вирусна ДНК, като подбира най-оптималната по отношение добив на ДНК ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) и чистота на екстрахирана ДНК (екстинкция  $A_{260/280}$ ); анализира чувствителността и специфичността на избраните праймери;

експериментално определя оптималната температура за хибридизация на праймерите. Следващите експерименти са насочени към определяне наличието на анеловирусна ДНК в кръвни проби от клинично здрави донори; от пациенти с респираторни заболявания; вирусен хепатит В; заболявания с неизяснена етиология (неясно фебрилно състояние, синдром на хроничната умора и др.); първични мозъчни тумори; бъбречни трансплантации. При всички групи изследвани лица е доказано наличие на анеловирусна ДНК, като най-висок процент положителни резултати е получен с използване на праймерните двойки, изхождащи от консервативен участък на нетранслиращия регион UTR, а най-нисък процент – с праймерните двойки, комплементарни на кодиращия регион ORF1 поради неговата висока вариабилност. PCR системата с най-висок процент положителни резултати се препоръчва от дисертантката за провеждане на широкомащабни скринингови проучвания.

С цел генотипиране са секвенирани 7 доказани TTV – от 5 здрави донора, от пациент с хепатит и от пациент с неясно фебрилно състояние. Анализирани са генетичните взаимоотношения на българските секвенции с 15 референтни секвенции, подбрани от геномната банка. Установено е, че 4 български секвенции от здрави донори се групират в отделен клон в рамките на генотип 1. Изолатът от пациент с неясно фебрилно принадлежи към генотип 2. Резултатите от секвенционния анализ потвърждават приложимостта му за генотипова идентификация на доказаните TTV.

Експериментите са проведени много прецизно, резултатите от тях са изложени ясно, в логическа последователност, като са онагледени богато с таблици и фигури. При обсъждането на резултатите се правят логически разсъждения. В този раздел би могло да има по-широко съпоставяне на собствените резултати с данните на изследователи от други страни. Изводите са добре формулирани и логически издържани.

Напълно съм съгласна с формулираните приноси. Дисертантката е постигнала значими резултати с важна научноприложна стойност. Проучването е първото по рода си в България и резултатите от него имат безспорно оригинален за страната характер.

Авторефератът в обем 45 стр. съответства на изискванията и отразява точно съдържанието и приносите на дисертацията.

Във връзка с дисертацията има отпечатани две научни публикации, от които едната е на английски език с импакт фактор 0,198. Има участия с научни съобщения в два международни и един национален научен форум.

**В заключение:** дисертационният труд на Калина Шишкова представлява една завършена, изпълнена на високо методично ниво разработка със значими научноприложни приноси в областта на анеловирусните инфекции. Кандидатката притежава задълбочени теоретични знания, умения да изпълнява съвременни молекулярно-

биологични техники, както и способност за самостоятелни научни изследвания и анализи. Считам, че дисертационният труд съответства напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и на Правилника за приложението му.

Давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на уважаемите членове на научното жури да дадат вота си за това, на Калина Шишкова да бъде присъдена образователната и научната степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки (Вирусология).

02.12.2014 г.

Член на научното жури: .....  
/проф. д-р Нели Корсун, д.м.н./