

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен ”Доктор”
по професионално направление 4.3. Биологични науки (Вирусология)

Тема: „Разпространение и генетично разнообразие на Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България”

Автор: гл. ас. Калина Август Шишкова (Научен ръководител – Професор, д-р Златко Кълвачев, д.м.н.), докторант на самостоятелна подготовка в Лаборатория „Вирусология” при БФ, СУ „Климент Охридски”

Рецензент: Доц. д-р Евелина Шикова-Лекова - Отдел „Вирусология“, НЦЗПБ (Заповед № РД38-599/25.11.2014 на Ректора на СУ „Климент Охридски” проф.дин Иван Илчев)

Актуалност и значимост на дисертационната тема. Въпреки съществуващия в световен мащаб значителен изследователски интерес към Torque teno (ТТ) вирусите, все още не са изяснени редица въпроси, свързани с биологичната им характеристика, епидемиологията, както и с ролята на тези вируси като човешки патогени. Предполага се, че те са свързани с патогенезата на различни заболявания – чернодробни, респираторни, хематологични, онкологични и др. Установено е, че ТТ вирусите инфектират голяма част от човешката популация като заразяването се осъществява в детска възраст с последваща доживотна виремия с активна вирусна репликация. Вирусна ДНК е открита в различни органи и телесни течности, но начинът на заразяване все още не е окончателно установен. Проблемите, свързани с изясняване на различни аспекти от ТТ вирусните инфекции, в т.ч. и значението им за човешката патология са в голямата си част методологични, произтичащи от особеностите на тези вируси – висока степен на генетична вариабилност, в повечето случаи става въпрос за ко-инфекция на множество генотипове на един или няколко анеловируса и др. Понастоящем най-ефективните методи за детекция на ТТ вирусите са PCR методите. Но данните от различни изследвания за разпространението на ТТ вирусите се различават значително, което вероятно е главно резултат от различия в чувствителността на използваната PCR система, амплифицираща различни участъци от вирусния геном. Ето защо усилията са насочени към търсене на молекулярно-

диагностични системи за детекция и количествено определяне на пълния спектър от ТТ вирусни генотипове и групи в човешката популация.

До момента липсват данни за разпространението на ТТ вирусите сред населението в България – както при клинично здрави индивиди така и при пациенти с различни заболявания. Усилията на дисертантката са насочени към запълване на тази празнина. Всичко това ми дава основание да определя тематиката на предоставения ми за рецензиране дисертационен труд като актуална и значима.

Структура, цел и специфични задачи на дисертацията. Дисертационният труд е представен на 94 страници и включва 16 фигури и 15 таблици. Структуриран е в 10 раздела, като основните от тях следват общоприетата схема - обзор на литературата (28 стр.), цели и задачи (1 стр.), материали и методи (13 стр.), резултати (22 стр.), обсъждане (3 стр.), изводи (2 стр.), библиография (14 стр.).

Заглавието на дисертацията ясно дефинира основната цел и периметъра на проведените изследвания. Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани ясно и точно като специфичните задачи съответстват на поставената цел.

Литературна осведоменост. Литературният обзор е структуриран в 7 раздела и представлява компетентен преглед на съществуващата литература за анеловирусите. Осветлява постигнатото до днес в изучаване разпространението на тези вируси, патогенезата и клиничните прояви, имунобиологията, класификацията, вирусологичната характеристика, репликация и др. Особено внимание е отделено на организацията на вирусния геном, с описание на неговите консервативни и вариабилни региони, което е важно за планираните от докторантката изследвания. Отбелязани са и основните методологични трудности при изследването на ТТ вирусните инфекции. Описани са използваните понастоящем оптимални методологични подходи за откриване и характеризиране на тези вируси.

Представената информация в литературния обзор е добре илюстрирана с 4 фигури, а класификацията и разпространението на вирусите обобщени в 1 таблица. Библиографията включва 126 източника, голяма част от които са публикувани в последните 10 години. Всички заглавия са на английски език.

Обзорът е изчерпателен, написан в добър стил и показва, че гл. ас. Шишкова е добре запозната със състоянието на проблемите, по които работи и компетентно борави с наличната научна литература.

Методология. В изследването са включени общо 535 кръвни проби от клинично здрави и от пациенти с различни заболявания - вирусен хепатит В, респираторни заболявания, с първичен мозъчен тумор, пациенти с неизяснена патология и бъбречно трансплантирани пациенти. Повечето от тези групи са били вече обект на изследване в други страни, което дава възможност за сравняване и анализ на получените резултати. Докторантката е използвала съвременни молекулярни методи, съобразени с изпълнението на поставените цел и задачи. Те включват различни техники за екстрахиране на ДНК от кръвни проби, едностъпков и nested PCR, гел-електрофореза, секвениране. Тя успешно прилага и методи на биоинформатиката за определяне специфичността на използваните от нея праймерни системи (заимствани от публикации в специализирани издания), както и за филогенетичен анализ. Използваните методи са описани ясно и подробно до степен, позволяваща възпроизводимост на резултатите и оставят впечатление за много добра професионална подготовка на докторантката.

Като забележка може да се посочи липсата в подраздел 4.4.3. (Контролиране на PCR системите) на описание на използваните положителни контроли на PCR системите (представени са само отрицателните и вътрешни контроли). Такова описание докторантката е представила в разясненията към фигура 8, но следва то да намери място и в споменатия по-горе подраздел.

Резултати. Получените резултати стриктно следват специфичните задачи, които си поставя докторантката. Първоначално тя определя най-ефективната техника за екстракция на ДНК от кръвни проби – QIAamp DNA Blood Mini Kit (QUIAGEN), която впоследствие успешно прилага в работата си по изследване на клиничните проби за ТТ вируси.

Част от резултатите са свързани с оптимизирането на PCR системи за детекция и анализ на ТТ вирусите. Това са системи за nested PCR за амплифициране на участъци от вариабилния ORF1 регион на вирусния геном, на консервативен участък в UTR региона и на фрагмент от 5' UTR областта със системата за специфична детекция на TTV (Annelo-TTV PCR). Чрез използването на правилно подбрани хетероложни и хомоложни вирусни геноми докторантката доказва високата специфичност на използваните праймерни

системи. Тя провежда множество експерименти с цел оптимизация на отделните параметри на PCR системите, в резултат на които успява да определи най-ефективните протоколи за амплификация на различни фрагменти от генома на изследваните вируси. По-нататък гл. ас. Шишкова прилага оптимизираните от нея три PCR системи за доказване на специфична вирусна ДНК в клиничните материали като изследва общо 535 кръвни проби от подбраните от нея групи от здрави кръводарители и пациенти с различни заболявания. Очаквано, докторантката установява най-висок процент положителни проби при изследването на всички групи с втората PCR система, насочена към амплификация на консервативен UTR регион от вирусния геном, вариращ от 61.87% (здрави кръводарители) до 66.66% (пациенти с първични мозъчни тумори). Според докторантката тази PCR система е подходяща за мащабни бъдещи скринингови проучвания сред различни групи от българското население. Повече от половината положителни проби при всички изследвани групи, установени с тази PCR система се оказват положителни и при изследване със системата за специфична детекция на TTV.

Особено ценни са резултатите от изследване на генетичното разнообразие на TT вирусите, циркулиращи в България. Четири от българските секвенции от здрави кръводарители попадат в клъстера на генотип 1 като е възможно да дават начало на нов клон в рамките на този клъстер или на самостоятелен нов клъстер. Секвенцията от пациент с неясно фебрилно състояние е от генотип 2. При останалите две български секвенции, BG1G751 и BG6B21P, съответно от пациент с хепатит Б и от здрав кръводарител, не се установява принадлежност към генотип 1, 2 или 3. Тези резултати са добра основа за по-нататъшни изследвания, обхващащи по-голям брой български секвенции.

Резултатите са подкрепени с илюстративен материал (11 фигури) и са обобщени в 12 таблици.

В раздел Обсъждане авторката обобщава и анализира получените резултати и очертава насоки за бъдещи изследвания. Повече усилия, насочени към сравнителен анализ на получените от докторантката резултати (както тези свързани с разпространение на TT вирусите сред българската популация, така и с генетичното им разнообразие) и съществуващите в литературата данни биха подчертали още повече значимостта на това ново за България проучване.

Изводи. Приемам формулировката на изводите от дисертационния труд и смятам, че те отразяват правилно същността на получените резултати.

Съгласна съм със справката за приносите, които авторката е представила. Приемам като приноси с оригинален характер резултатите, свързани с определяне разпространението на човешките анеловируси сред групи от българското население и резултатите от проучването на генетичното разнообразие на ТТ вирусите, циркулиращи в България.

Публикации. Докторантката е представила две публикации във връзка с дисертацията, една от които в списание с импакт фактор (Compt. Rend. l'Acad. Bulg.Sci.). Резултатите от дисертацията са докладвани на 1 национален и 2 международни научни форума.

Авторефератът отразява обективно получените резултати и е изготвен в съответствие с общоприетите изисквания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Дисертационният труд на гл. ас. Калина Шишкова „Разпространение и генетично разнообразие на Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България” е посветен на важен за медицинската наука и практика проблем. Представени са резултати със съществен научно –приложен принос в изследването на тези вирусни инфекции.

Дисертационният труд е изработен на високо методично ниво и характеризира автора си като висококвалифициран изследовател, който има знанията, уменията и компетентностите да решава самостоятелно научни проблеми в областта на вирусологията. Гл. ас. Шишкова изпълнява критериите на Закона за развитието на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски”.

Всичко това ми дава основание да препоръчам на научното жури да присъди на Калина Шишкова образователната и научна степен „Доктор“ в професионалното направление 4.3. Биологични науки (Вирусология).

София, 07.12.2014 г.

Рецензент:

Доц. Д-р Е. Шикова-Лекова