

**НА ВНИМАНИЕТО НА ЧЛЕНОВЕТЕ
НА НАУЧНОТО ЖУРИ КЪМ БФ,
СУ „СВ.КЛ.ОХРИДСКИ“, ОПРЕДЕЛЕНО
СЪС ЗАПОВЕД РД 38-599/25.11.2014 Г.
НА РЕКТОРА НА СУ „СВ.КЛ.ОХРИДСКИ“
ПРОФ. ДИН ИВАН ИЛЧЕВ**

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационния труд на главен асистент **Калина Август Шишкова**, докторант на свободна подготовка, Лаб. Вирусология, БФ, СУ „Св. Кл. Охридски“

Заглавие: **Разпространение и генетично разнообразие на Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България** с научен ръководител проф. д-мн Златко Кълвачев

От проф. д-мн Радка Аргирова – вирусолог, Токуда Болница, София

Представеният ми за рецензиране труд е написан на 94 стандартни страници и има възприетата за дисертация структура – Въведение – 2 стр., Обзор на литературата – 23 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 13 стр., Резултати – 22 стр., Обсъждане – 3 стр., Изводи – 2 стр., Литература – 14 стр., Списък на публикациите на кандидата и научни приноси – 2 стр., останалите страници се заемат от съдържание, съкращения, лицева и др.

Дисертационният труд третира сравнително нова за света, а за България напълно непозната група вируси, обединени в сем. Anelloviridae. Само по себе си това е огромно предизвикателство, което обогатява българската вирусология, патология и молекулярна биология, стремейки се да настигне други страни, които изследват това вирусно семейство вече 15 – 20 години.

Авторката подробно разглежда историята на изолирането, видовете, ДНК-структурата и взаимоотношенията между трите вида вируси от семейството – TTV, TTMV и TTMDV.

Актуалност. Това са малки вируси, с циркулярна ДНК, без категорични доказателства за пряка връзка между тях и определени клинични прояви. Фактите за връзка с определена патология все още са противоречиви - публикациите ги свързват или отричат връзка с чернодробни, кръвни, неопластични, респираторни и др. заболявания. Не се изследват масово в клиничната практика – засега няма надеждни серологични или други бързи методи, публикуваните изследвания използват PCR системи, но както става ясно и от дисертационния труд, все още като че ли не е постигнат консенсус относно генната област, чиято таргетна ДНК да бъде обект на PCR. В това отношение усилията на Калина Шишкова са навременни и актуални. С това определям дисертационния труд като актуален, факт, който вероятно в близко бъдеще ще бъде по-широко признат, а анеловирусите ще предизвикат заслужен интерес и у нас.

Литературният обзор е обхванал практически цялото съвременно знание за това вирусно семейство, като естествено най-много са тези знания за първите 3 рода (алфа-, бета- и гама-торквириси), чиито представители са човешки и обхващат около 55 вида. Тъй като става дума за сравнително нови и все още слабо изучени вируси, на няколко места в текста се говори за доказани и хипотетични фактори в патогенезата на тази вирусна инфекция. Това показва, че авторката добре знае и съзнателно търси доказателства за функцията и механизма на действие на тези вируси на ниво организъм.

В обзора авторката се спира на редица спорни и ненапълно изяснени моменти, на някои от които обръщам внимание. Твърдението (стр. 8), че : „ *Въпреки настоящите познания относно репликацията на TTV, той не отговаря на всички критерии, по които може да бъде определен като хепатитен вирус*“ най-вероятно се отнася до факта, че основните клетки-мишени на TTV са освен чернодробните клетки, още и клетки от еритроидния ред, респираторния тракт и др.

Възниква и въпрос относно „*хипотезата, че вирусните щамове, които синтезират апоптин-подобен протеин TAIP се нуждаят от трансформирани клетки, за да индуцират апоптоза. Ако тази хипотеза се потвърди, това означава, че някои генотипове на TTV предпочитано се разпространяват в туморни клетки и ги унищожават, както това се случва с човешки парвовирус Н например (Raykov et al., 2008).*“ Има ли някакви конкретни доказателства за онколитично действие на тези вируси?

Обзорът е добре написан, използвани са публикации предимно от последните 5 -10 години, добра основа е за надграждане на нови знания.

Материал и методи е много добре написан раздел, ясен, възпроизводим, показва цялото богатство и възможности на използваните методи. Разделът вдъхва надеждност по отношение на получените резултати.

Резултати е най-важният раздел в дисертационния труд. В 16 фигури и 15 таблици са показани получените резултати при изследване на 535 кръвни проби от клинично здрави лица и болни с различна патология. Специално отбелязвам, че всички тези 535 проби са изпълнени всяка с 3 праймерни системи. Прави впечатление умело подбраната патология – сред изследваните лица има представители на групи, за които има литературни данни за открити TTV (кръводарители, пациенти с HBV-инфекция, трансплантирани, болни с респираторни инфекции), както и такива, за които в литературата няма данни за открити TTV (болни с мозъчни тумори). Този подход дава възможност за сравнение с другите автори, но и предлага надеждност при получаване на нови данни и интерпретацията на резултатите. Последното е особено важно, защото при всички изследвания са използвани три праймерни системи, а ДНК е екстрахирана от 10 представителни проби с 4 възможни метода, за да се избере най-подходящият. Заслужават внимание и използваните системи за контрол на амплификацията, както и експерименталното оптимизиране на отделните етапи на използваните PCR. Всичко това е извършено и звучи като поднесено ръководство как трябва да се пристъпва към молекулярно-биологично изследване на непознат вирусен обект, за който в литературата няма постигнат консенсус. Всички данни в този раздел са първи за България, а някои от тях – и първи в световната литература (напр. установяването на анеловируси при мозъчни тумори). Резултатите, показани в този раздел, „плачат“ за продължаване на изследванията – напр. в оперативен материал от мозъчни тумори, за да се определи там евентуална локализация на анеловируси, същото се отнася и за хронични вирусни инфекции (за подобни изследвания в дисертацията се съобщава, но малко) и др. Тук трябва да се признае изключителният принос на научния ръководител, който именно в това отношение има много богат опит. Резултатите от секвенирането също са напълно оригинални и продължаването на изследванията в тази област са необходими и обещаващи.

Обсъждането обаче би спечелило от повече сравнителен анализ и търсене на обяснения на някои находки, разбира се, доколкото това е възможно в такова пионерско проучване. Например, какво е възможното обяснение за разликата между

двете секвенции BG6B21P и BG1G751 особено по отношение на референтните изолати? Предвижда ли се допълнително секвенционен анализ на TTV от други лица с HBsAg носителство ? Достоверните статистически различия между изследваните групи клинично здрави индивиди и пациенти с различни заболявания по дела на положителните TTV проби ($p = 0.003$) не доказват ли, че TTV има определено отношение (а може би и роля?) към патологията? Може ли да се говори за носителство на вируса в клинично здрави лица?

По отношение на чувствителността на отделните праймерни системи възниква въпросът откриват ли тези двойки праймери вирус у едни и същи индивиди, има ли открити вируси напр. с праймерна система 1 и/или 3, които да не са открити със система 2? Интересно би било тълкуването при какъвто и да е резултат.

Изводи. Те добре отразяват резултатите от проведената работа. Възможно е някои да се обединят (напр. N9 и N10). В извод N1 може да се прибавят конкретни цифрови данни, което ще го направи по-убедителен и познавателен, но това е въпрос на виждането на автора.

Публикации. По темата на дисертацията са представени 2 журнални статии – едната на английски език в списание с импакт фактор. Другата статия има характер на преглед на литературата по дадената тема. Авторката има и 3 участия в научни прояви – 2 в международни и 1 – в национален форум по вирусология. Считам, че има още резултати, които са в процес на публикуване, но и с тези публикации трудът е дисертабилен. Съгласна съм с посочените от авторката научни приноси, сред които единият има и важно практическо значение. Запозната съм с препоръките за критериите при придобиване на научната степен „доктор“ в СУ „Св. Кл. Охридски“ за направление „Биологически науки“ и биотехнологии и считам, че кандидатката ги покрива.

АВТОРЕФЕРАТЪТ съответства на дисертационния труд, в него са отразени главните резултати от този труд, изводите и личните приноси на дисертантката.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Извършена е огромна пионерска работа по изучаване на TTV вирусите – разпространение, характеристика, генотипове сред българската популация. Работата е прецизно изработена (в случая контролите имат особено значение) и поднесена, онагледена с 16 фигури и 15 таблици, с използване на 162 литературни източника. В много отношения тя служи като пример за подход към молекулярно-биологична характеристика на непознат вирусен агент. Трябва да се отбележи, че дисертационният труд е извършен изцяло в България, което само по себе си е гордост за научното звено, научния ръководител и дисертанта.

Като имам предвид казаното дотук, а и дългогодишното ми познанство с авторката и увереността, че тя е изпълнила лично представените изследвания, предлагам на уважаемото жури към БФ да присъди на Калина Шишкова научната степен „доктор“ след обсъждане на резултатите от дисертационния ѝ труд, озаглавен **Разпространение и генетично разнообразие на Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България** .

София, 29.11.2014 г.

Рецензент:

/Проф. дмн Радка Аргирова/