

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Райко Димитров Пешев, д.н., рък. секция „Епизоотология и инфекциозни болести по животните“ в НДНИВМИ гр. София по обявения конкурс за доцент по професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност Вирусология (Молекулярна вирусология), обявен в ДВ, бр. 65 от 28.07.2023 г. за нуждите на Биологически факултет към СУ „Св. Кл. Охридски“

Във връзка с обявения конкурс от Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ Професионално направление 4.3 Биологични науки, Научна специалност Вирусология (Молекулярна вирусология), обявен в ДВ, бр. 65 от 28.07.2023 г. за заемане на академична длъжност „Доцент“ са подадени документите от единствен кандидат гл.ас.д-р. Калина Август Шишкова. Представени са необходимите за конкурса документи: автобиография, диплома за завършено висше образование, диплома за ОНС доктор, уверение за заеманите академични длъжности асистент, ст. асистент и главен асистент, списък на научните публикации, списък на научните публикации за участие в конкурса за доцент, списък на научните приноси, минимални изисквани точки по групи показатели, забелязани цитати, резюме на статиите, представени за участие в конкурса за доцент.

Автобиографични данни: гл.ас.д-р. Калина Шишкова е родена на 10.10.1970 г. в гр. София. Средното си образование завършва през 1988 г. в 29 ЕСПУ „Г. Бакалов“, гр. София, от 1992 г. до 1997 г. завършва магистратура с отличен успех в Биологически факултет (БФ), на Софийския университет “Св. Климент Охридски”, специалност “Молекулярна биология”. През 2014 г. защитава успешно дисертация за получаване на ОНС– Доктор, а темата на дисертационния и труд е „Разпространение и генетично разнообразие на *Togque tepo* вирусите (сем. *Anelloviridae*) в България“. От 1997 г. до 2002 г. е специалист вирусолог в Институт по микробиология, БАН, от 2002 г. до 2004 г. е хоноруван асистент в БФ на Софийски университет, от 2004 до 2010 г. е асистент в БФ, от 2010 до 2011 г. старши асистент, а от 2011 г. – до сега е главен асистент в лаборатория „Вирусология“ на БФ към СУ. Или вече 25 години кандидатката се занимава с вирусологични проучвания.

Научно-публикационна дейност

Представен е списък с общ брой научни статии 33, от които първите три са свързани с дисертационния труд, като № 2 е автореферат на дисертационния труд. Тези статии вече са използвани за придобиване на ОНС „Доктор“ и те няма да бъдат рецензирани. Във връзка с обявеният конкурс за доцент са представени 21 броя публикации, които са отпечатани в списания с импакт фактор и с рецензенти. Резултатите в представените статии имат научно-фундаментален и приложен характер.

В научно съобщение № 1 са отразени резултатите от синтезата на нови амиди на хидроксиканелената киселина на тиазол съдържащ TFA. Проучена е антиоксидантната и антивирусната активност на тези амиди срещу репликацията на грипен вирус H_3N_2 и човешки херпес вирус 1 и 2 (HHV 1 и HHV 2). Установено е, че съединения 2a-c не са ефективни срещу инфлуенца А вирус. Всички от тестваните амиди не показват антивирусен ефект срещу HSV 1 и 2 в сравнение с натурални и ненатурални С протектирани аминокиселини.

В научно съобщение № 2 е изследвана антивирусната активност на нативни молекули от хемоцианин на мекотели *Rapana venosa hemocyanin* (RVH 2). Чрез MALDI TOF-MS е установена хетерогенна смес от гликани. Изследвани са нативни молекули,

както и гликозилирани и негликозилирани единици и е установено, че само гликозилираната единица има антивирусна активност.

В научно съобщение № 3 са отразени данните от синтезирането на нови естери на ацикловир с пептидомиметици и *in vitro* е оценена антивирусната активност срещу HSV 1 и 2. Авторите правят извод, че псевдомиметиците, усилват антивирусната активност на ацикловира.

В научно съобщение № 4 от диви и *in vitro* получени растения *Lamium album* и *Leonorus cardiaca* са добити хлороформени, метанолови, етаноливи и водни екстракти и е установено значителното блокиране на репликацията на HSV 1 и 2 в МДБК клетки. Установено е, че най-силно антивирусна действие имат хлороформените екстракти. Другите екстракти имат подобни или по-слаби ефекти срещу вирусите.

В научно съобщение № 5 Чрез екстракция на Soxhlet от *in vitro* и *in vivo* добити растения от сем. *Lamium album* са получени хлороформени екстракти, които са тествани за антивирусна активност в МДБК клетки срещу HSV 1 и HSV 2. Установено е, че екстракти получени от диви растения имат по-силен инхибиращ и вирусоциден ефект.

Научно съобщение № 6 представлява ревю на лечебните растения в България. В статията се описва фитохимичния състав и неговото влияние върху специфичните етапи на репликацията на вируса. Обсъден е ефекта на 9 вида растения върху жизнения цикъл на вирусите.

От растението *Nepeta nuda* са получени 4 извлека чрез екстракция с хлороформ и метанол, които са изследвани за цитотоксичност върху клетъчни култури МДБК и е определена активността на екстрактите срещу HSV 1 и 2. Установено е, че метаноловия екстракт е най-активен срещу вирусите. Доказано е че 4 те екстракти инактивират извънклетъчните форми на HSV 2. От нативно растение най-силен ефект има хлороформния екстракт, който предизвиква 99% инактивация и слабо повлиява навлизането на вируса в клетките (научно съобщение № 7).

В научно съобщение № 8 са отразени данните от получаването на хлороформени и метанолови екстракти от растението *Teuricum chamaedris* чрез екстракция по Соклет и метанолови екстракти чрез термостат. Екстрактите са тествани за антивирусна активност срещу HSV 2 в клетки МДБК и е установено, че метаноловия термостатен екстракт има по-слаб антивирусен ефект. Два от изследваните екстракти инхибират репликацията на HSV 2. Установено е, че екстрактите инактивират извънклетъчния вирус, адсорбцията и пенетрацията. За първи път е доказана анти HSV 2 активност на сурови екстракти от *Teuricum chamaedris*.

В научна статия № 9 е отразена антивирусната активност на воден екстракт получен от *in vivo* култивирано растение *Nepeta nuda*, като е определена максималната нетоксична концентрация и е установено, че екстрактът значително подтиска репликацията на HSV 2. Установено е, че инфекциозното вирусно потомство се инхибира до 98%.

Статия № 10 отразява резултатите от изследването на воден и хлороформен екстракт от растението *Artemisia chamaemelifolia* vill (*Asteracea*) по отношение на репликацията на два щам херпесвирус чувствителен – VA и резистентен към ацикловир – DD. Установен е дозо зависим ефект. В максимална нетоксична концентрация водният екстракт проявява слаба вирусоцидна активност. Хлороформният Соклет екстракт не повлиява репликацията на двата щам и инфекциозността на извънклетъчните вириони.

В съобщение № 11 е отразено въздействието на воден екстракт на растението *Nepeta nuda* върху репликацията на човешки алфа херпесвирус 1, чувствителен и резистентен към действието на ацикловир и е установено мощната антихерпесвирусна активност срещу двата вида. Установено е, че действието на екстракта не се дължи на инактивирането на извънклетъчните вириони, а е по-скоро резултат от блокиране на

адсорбцията, но не и на пенетрацията. Установено е, че водният екстракт продължава да проявява антивирусна активност, дори когато се добавя 10 h след инфектирането. Авторите считат, че екстрактът действа както на ранните, така и на късните етапи на репликацията на АХВ 1.

В съобщение № 12 са отразени данните от изследванията на естери на анти херпесвирусни средства – генцикловир и пенцикловир с жлъчни киселини и аминокиселинни естери на ацикловир. Оценена е тяхната *in vitro* аминокиселинна активност срещу HHV 1 и HHV 2. Антивирусните анализи демонстрират, че модифицираните аналози на АСV и РСV са по-малко активни в сравнение с генеричните вещества срещу HSV 1 и HSV 2.

В съобщение № 13 са дадени данни от изследванията на Torgo teno virus членове на сем. *Alenoviridae*. Установено е, че генетичните последователности са свързани и попадат в един клъстер, част от последователностите могат да бъдат разглеждани като отделен клъстер, или да са начало на нов клон в рамките на този клъстер, заедно с референтните последователности, групирани в генотип 1.

В статия № 14 са отразени резултатите от въздействието на физични фактори върху репликацията на извънклетъчните вириони на ВХС 1 на третирани с повърхностно вълнова газоразрядна плазма хранителна среда и дестилирана вода и е установено намаляване на титъра на вируса в сравнение с контролата.

В съобщение № 15 е изследвана хемолимфа от *Rapana Venosa*, *Erifia verucosa* и слюз от *Helix aspersa* спрямо чувствителни към ацикловир щамове HHV 1 и HHV 2. И шесте екстракта не показват антихерпесвирусна активност. Фракциите от хемолимфа от *Rapana Venosa* и *Erifia verucosa* показват най-висока активност - 99% инактивиране на инфекциозността, като ефекта върху HSV 1 е по-изразен.

В научно съобщение №16 са отразени данните от изследванията на растението *Nepeta nuda* и е установено, че диворастящото растение съдържа различно количество фенолни съединения, които са по-високи при дивите в сравнение с култивираните растения и проявяват по-висока антиоксидантна и анти херпесвирусна активност.

В научно съобщение №17 е установено, че състава на почвата е един от най-важните фактори за количеството на активните молекули за антивирусната активност на екстрактите. Установено е, че най-активен е хлороформния сокслетов екстракт от *Teuricum chamaedris* от района на с. Добромирци. Той инактивира екстрацелуларните вириони на HHV 2 до 99.5%, а метаноловия термостатен екстракт е с 99.9%. Авторите считат, че почвата може да влияе върху антивирусната активност на растението.

В статия № 18 са отразени данните от изследванията на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии. Не е установена пряка вирусоцидна активност при тестваните супернатанти, но 5 от щамовете имат ефект върху инхибирането на вирусната репликация. Два от щамовете имат силна активност срещу HHV 2.

В съобщение № 19 са дадени изследванията върху екстракти от *Astragalus glycyphillos*, като е добит сух екстракт. Установена е между 60-70% защита срещу двата щам на HSV при добавяне едновременно и 1 h след заразяването на МДБК клетки.

В научно съобщение № 20 е установена статистически значима връзка между наличието на бактерии, причиняващи пародонтит и високорискови човешки папилома вируси. Доказано е, че най-често срещания човешки папиломен вирус (HPV), който дава положителен резултат за бактерии е HPV 58.

В научно съобщение № 21 е изследван човешки коронавирус 229Е за оценка на някои аналози на инхибиторите на йонните канали и амантадин и римантадин. Производните на амантадина показват малко по-слаб инхибиторен ефект. Производните 4 R на римантадин имат същия ефект като контролата и инхибират вирусната репликация с 37%. Другите 2 производни на римантадина са с по-ниска активност. Две от

съединенията 2А и 4А показват обещаващ афинитет на свързване към SARS Cov 2 RNA полимеразен сайт и SARS Cov 2 NSP 3.

Ако мога да обобща резултатите от представените научни съобщения на кандидатка по важните приноси в областта на експерименталната и медицинската вирусология могат да бъдат разпределени тематично в няколко по-важни направления, а именно:

- I. Проучване на природни продукти за антивирусна активност
 - II. Изследване на нови синтетични съединения за наличие на противовирусен ефект
 - III. Медицинска вирусология
 - IV. Изследване антихерпесното действие на физични фактори.
- I. Проучване на природни продукти за антивирусна активност

Изследване на природни продукти за антивирусна активност са представени в научни съобщения (№4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 19). Те отразяват основната научна дейност на кандидатката и са приоритетни за научно-изследователската работа на лаборатория „Вирусология“ на Биологически факултет. Действието на природните продукти е проучено на модел ВХС 1 и ВХС 2. В последните години се селектирираха и появиха доста резистентни към антивирусни средства херпес вирусни щамове, което е и причината за проучване на нови природни продукти за доказване на антивирусна активност. Приносите са свързани с изследване на антихерпесната активност на екстракти, изолирани от *in vitro* отглеждани растения. Затова и почти ½ от работите на кандидатката са с такава насоченост, като са проучени голям брой екстракти, техните фракции и активните вещества, изолирани от растенията. Чрез проведените изследвания са изяснени вероятните механизми на антивирусното въздействие и са установени потенциалните възможности за разработване на противохерпесни препарати за приложение в хуманната медицина.

Най-важните приноси са свързани със скрининга на природни продукти за антивирусна активност: Доказване на инхибиторният и инактивиращ ефект спрямо щамове на двата типа ВХС, включително и ацикловир резистентния щам DD на HSV2. Получени са хлороформени, метанолови, водни и етанолови екстракти, по различни методики от нативни, лабораторно култивирани и реинтродуцирани екземпляри от растения от сем. *Lamiaceae* - *Lamium album* L и *Leonurus cardiaca* L. Доказано е силно изразено противохерпесно действие на метаноловия и на водния екстракти.

Тъй като лечебните растения са богати на вторични метаболити, допринасящи за техния адаптивен имунен отговор, е изследвана метаболитната активност на *N. nuda*, действаща при променливи среди. Чрез сравнителен анализ на диво отглеждани и *in vitro* култивирани растения е оценена промяната във фенолните и иридоидните съединения и свързаните с тях имунни въздействия, и е установено, че дивите растения притежават по-силно въздействие върху имунната система в сравнение с култивираните.

В ревью са обобщени изследванията на антивирусната активност на българските лечебни растения от последните тридесет години. Ефектът на различни екстракти, получени от диви и *in vitro* размножени растения, също е изследван. Фитохимичният състав и неговото влияние върху специфични етапи от жизнения цикъл на вирусите са обсъдени в обзорна статия (№ 6) в която са разгледани семейства: *Amaryllidaceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Onagraceae*, *Ranunculaceae*, *Rosaceae*, *Crophulariaceae* и *Rhodophyta*. От тези проучвания се вижда, че България притежава уникални лечебни растения, които имат антибактериални и антивирусни качества.

Съвместно с изследователи от ИОХЦФ и чужбина е установено за първи път антивирусното действие на хемоцианини (както на цели молекули така и структурни и функционални субединици), изолирани от Черноморски рапан (*Rapana hemocyanin*) (№2)

и представители на род *Mollusca*, *Eriphia verrucosa* (hEv), слуз от *Helix aspersa* (Ha) и структурна субединица α -HaH от хемоцианин от *H. aspersa* (sHa) спрямо репликацията на ВХС-1(№15). Изследвани са антивирусните ефекти на нативните молекули на RvH, на *Helix lucorum* хемосуанин (HH), на техните структурни субединици и на гликозилираната функционална единица RvH2-е и негликозилираната единица RvH2 спрямо HSV вирус тип 1. Доказано е антивирусното действие на хемоцианина от черноморски рапани.

От ферментирали продукти на млечнокисели бактерии (№18) са получени вторични метаболити, които са изследвани за антихерпесна активност. Проучени са механизмите на въздействие на пробиотичните щамове и е установено, че те проявяват антивирусните ефекти чрез различни механизми, включително директно взаимодействие с вирусите, производство на антивирусни съединения или модулиране на имунната система. Установено е че два от изследваните пет щамове - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* KZM 2-11-3 и *Lactiplantibacillus plantarum* KC 5-12 имат силна активност срещу HHV-2 със селективен индекс (SI) над 45, което е добра предпоставка за последващи изследвания на кандидатката.

II. Изследване на нови синтетични съединения за наличие на противовирусен ефект

Друго направление, в което кандидатката има приноси е изследването на нови синтетични съединения за наличие на противохерпесен ефект. На основата на познаването на структурата и функциите на прилагани за лечение антивирусни препарати чрез насочен синтез са разработени и приложени нови вещества. Това са амиди на хидроксиканелена киселина на тиазол съдържащ TFA, етилов естер на валин-4-карбоксилна киселина. Те са тествани срещу *in vitro* репликацията на грипен вирус А (H₃N₂) и човешки херпесен вирус 1 и 2. Също така са синтезирани нови естери (№3 и №12) на ацикловир с пептидомиметици и е оценена тяхната антивирусна *in vitro* активност върху репликацията на HSV тип 1 и тип 2. Установено е че пептидомиметиците, съдържащи оксазолови и тиазол-тиазолови компоненти, усилват антивирусната активност. Получени са естери на антихерпесните лекарства ганцикловир и пенцикловир с жлъчни киселини (холева, хенодеоксихолева и дезоксихолева) и аминокиселинни естери на ацикловир, като е определена тяхната *in vitro* антивирусна активност срещу вируси на HSV 1 и е доказано, че модифицираните аналози на ACV и PCV са по-малко активни в сравнение с генеричните вещества срещу HSV-1 и HSV-2. Интересни са изследванията на човешкия коронавирус 229E (HCoV-229E) с някои аналози на инхибиторите на йонните канали амантадин и римантадин и е доказано, че производното вещество А 4 има по-висока антивирусна активност в сравнение с генеричното - амантадин (№21). Молекулните структури на новосинтезираните съединения са изследвани чрез монокристален рентгенов анализ. Проучванията за молекулярен докинг показват, че две от изследваните съединения 2A и 4A имат добър афинитет на свързване към SARS-CoV-2 РНК-зависим РНК полимеразен участък и SARS-CoV-2 Nsp3 участък.

III. Медицинска вирусология

В направление медицинска вирусология един от най-важните приноси е доказването за първи път в страната на Torque Teno вируси (№13) чрез адаптиране на различни праймерни системи. В проби от кръводарители, пациенти с регистриран вирусен хепатит, първичен мозъчен тумор, респираторни заболявания, бъбречно трансплантирани и пациенти с неизяснена етиология е доказан Torque Teno вирусът. При геномен анализ е установено, че повечето от последователностите на българските изолати са генетично свързани, силно корелират и попадат в един клъстер. Анализът показва, че те са близки родственици и най-вероятно имат общ прародител. Част от

последователностите могат също да бъдат разглеждани, като отделен клъстер, или да са началото на нов клон в рамките на този клъстер, заедно с референтните последователности, групирани по литературни данни в генотип 1. При пациенти с периодонтит (№20), е установена връзка между бактериите, причинители на заболяването и високо-рискови човешки папилома вируси (HPV) и е доказана статистически значима връзка между наличието на бактерии, причиняващи пародонтит, и високорисковите щамове на HPV, като най-често срещаният папиломен генотип е HPV 58.

IV. Изследване антихерпесното действие на физични фактори.

Друго важно направление при проучванията е изследване въздействието на физични фактори върху репликацията и извънклетъчните вириони на ВХС 1. На третирани хранителна среда и дестилирана вода с повърхнинно-вълнова газоразрядна плазма е изследвано антивирусното и вирусоцидното действие и е установено намаляване на титъра на вирусната проба с $1,67 \log_{10}$ в сравнение с контролата. Установено е въздействието на физичните фактори върху ВХС 1.

Изпълнение на минималните национални изисквания

От справката за минималните национални изисквания по показател - 1 А за защитен дисертационен труд кандидатката има 50 точки, по точка Б показател 2– няма точки, по точка В показатели 3 и 4 има общо 100 точки с 2 статии в Q 1 – 50 точки, 1 статия в Q 2 – 20 точки и 2 статии в Q 3 – 30 точки. По показател Г- сума от показатели от 5 до 10, съгласно изискванията на Закона, трябва да има 200 точки, а тя надхвърля този показател и събира 258 точки както следва: от 2 бр. статии в Q 1 има 50 точки, от 5 статии в Q 2 има 100 точки, от 4 статии в Q 3 има 60 точки и от 4 статии в Q 4 има 48 точки. В група от показатели Д сумата от точките по показател 11 трябва да е 50, а тя представя 30 цитирания, които и носят 60 точки, тоест и по този показател надхвърля изискванията. От представените научни съобщения и цитирания се вижда, че кандидатката преизпълнява минималните национални изисквания за доцент.

Допълнителни доказателства за научно-изследователската дейност на докторантката

От справката за участие на докторантката в научни проекти е видно, че е участвала в 20 научно изследователски проекта, като водещ изпълнител. Била е научен ръководител на 9 дипломанти, които са защитили успешно дипломните си работи. Като резултат от проведените изследвания от 2009 г. досега са отпечатани 25 статии в научни списания, 1 статия в поредица и 7 статии в сборници. Кандидатката има 48 участия в международни конференции и симпозиуми с 25 постера, 1 пленарен доклад и 20 секционни доклада. От справката за цитиранията се вижда, че до момента гл.ас.д-р. Шишкова има 137 цитирания на научните си статии, което говори за качеството им и това, че тя е разпознаваема от научната общност. Кандидатката в съавторство с А.Хинков има написано и издадено ръководство за практически занятия по вирусология, по което ръководство се обучават студенти и дипломанти от БФ на СУ. От направената справка от индивидуалните учебни планове се вижда и огромната учебна заетост на кандидатката, като за последните 6 години има 3181.5 часа учебна заетост, от които 1803.9 часа аудиторна заетост.

Заклучение

Представените ми научно - изследователски и приложни достижения от гл.ас. Калина Август Шишкова, и постигнатите резултати в областта на вирусологията ми дават пълно право да заключа, че тя отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за приложението му в БФ на СУ. Кандидатката работи повече от 25 години в областта на вирусологията, като за този период има постигнати значителни научно-изследователски и приложни резултати,

които са представени пред научната общност. Участието и в обучението на студенти по Биология е осезаемо, което се вижда от проведените както аудиторни, така и учебни часове. Наукометричните и показатели са преизпълнени и покриват изискванията за придобиване на академичната длъжност “Доцент“. Ще гласувам положително и ще си позволя да препоръчам на членовете на Научното жури и на членовете на Научния съвет на БФ към СУ гр. София да гласуват положително за присъждане академичната длъжност “Доцент“ на гл.ас. д-р Калина Август Шишкова в професионално направление 4.3 Биологични науки.

8.11.2022 г.
София

Рецензент:
(проф. Райко Пешев, д.н.)