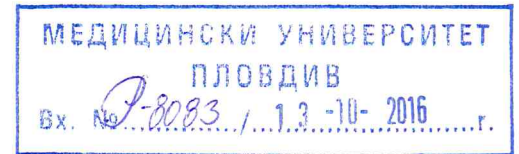


## РЕЦЕНЗИЯ



на дисертационния труд на Тихомир Илиев Въчев от Катедрата по педиатрия и  
медицинска генетика на МУ-Пловдив на тема:

**“АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИЯ ПРОФИЛ НА НЕКОДИРАЩИ  
МИКРО РНК ГЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ШИЗОФРЕНИЯ  
ПОСРЕДСТВОМ ШИРОКОМАЩАБЕН МИКРО РНК МАЙКРОАРЕЙ  
АНАЛИЗ И ВИСОКО СПЕЦИФИЧЕН КОЛИЧЕСТВЕН RT-PCR”**

от проф. д-р Стоян Ганчев Лалчев, дм от Катедрата по медицинска генетика,  
МУ-София

Темата на докторската работа е определено актуална, като се има предвид, че шизофренията е тежко мултифакторно заболяване с полигенна предиспозиция, висока популационна честота- 1% и многобройните проучвания до сега не дават дефинитивен отговор относно механизмите на генетичната предиспозиция. Това е свързано с комплексния характер на заболяването, като нозологична единица и трудностите в клиничното диагностициране.

В постгеномната ера активно се търсят кандидат гените, формиращи генетичната предиспозиция към шизофрения. Предполага се, че основна роля в етиологията ѝ играят нарушения в развитието на нервната система още в ембрионалния период, нарушения в метаболизма на някои невромедиатори, участие на инфекциозни фактори и др. В последните години в арсенала на изследователските подходи се включиха и епигенетичните проучвания, като мост за изясняване ролята на външните фактори върху генната експресия. Макар и в начална фаза тези изследвания дават обещаващи резултати за разбиране патогенезата на комплексните, мултифакторни заболявания.

Епигенетичните проучвания основно са насочени към изследване на метилационния профил на ДНК, модификациите на хистоновите белтъци и ролята на микро-РНК-те, като модификатори на генната активност. Към последния епигенетичен механизъм е насочен настоящия труд, който е първи за страната по отношение на шизофренията и това определя несъмнената

оригиналност на разработката. Дисертационния труд може да даде данни полезни за дигностиката, а в бъдеще и за възможна прицелна терапия при заболяването.

### **Структура и оформление на дисертационния труд**

Дисертацията е оформена съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и е с общ обем 215 страници, с добро пропорционално разпределение на основните раздели: литературен обзор-57 стр., материал и методи - 28 стр., резултати - 49 стр., обсъждане-38 стр., заключение и изводи. Библиографията включва 299 литературни източника на английски. Анализираните проблеми, както и резултатите от собствените проучвания са много добре онагледени с 13 таблици и 38 фигури.

### **Литературен обзор**

Разработен е при използване на литературни източници от последните 5-10 години. Той е съвременен по съдържание, компетентно и целенасочено визиран към проучвания проблем. Накратко е представена характеристиката, епидемиологията на заболяването и ролята на външни фактори, които биха могли да участват в патогенезата.

Съществена част от обзора е посветена на обсъжданите патогенетични хипотези за възникването на шизофренията: а.) свързани с нарушения в невротрансмисията (глутаматергичната, допаминергичната и ГАМК-ергичната хипотези) б.) аномалии в развитието на ц.н.с. в ембрионалния период; в.) участието на имунологични фактори и др.

Генетичната предиспозиция и методичните подходи за разкриването на последната са представени стегнато и компетентно. Разисква се същността, предимствата и ограниченията на анализа на скаченост, като основен подход за позиционно картиране на хромозомни райони, обхващащи голям брой гени, сред които да се идентифицират конкретни кандидат-гени, както и последващи асоциативни изследвания с полиморфни ДНК маркери. Дискутирани са разрешаващите възможности на цялостно-геномните асоциативни проучвания.

Компетентно е разгледана накратко и ролята на единичните нуклеотидни полиморфизми (SNPs) и вариациите в броя на копията (CNVs), които биха могли да повлияят биогенезата и функцията на микро-РНК молекулите.

Основна част от обзора е посветена на епигенетичната хипотеза и участието на различни епигенетични механизми в регулацията на генната

активност – модификация на хистоновите белтъци и метилирането, микро-РНК регулация. Детайлно са разгледани проблемите с микро-РНК медираната епигенетична модификация на генната активност. Представена е основна информация за общата характеристика на микро-РНК молекулите, взаимодействието им с иРНК, както и механизмите за микро-РНК медираната репресия или активация на транслационните механизми. Обсъден е и модел за микро-РНК дисрегулация при шизофренията и възможностите за използване на експресионния профил на тези молекули, като подходящи диагностични биомаркери. Подобни възможности са реализирани при някои форми на рак, сърдечно-съдови заболявания или репродуктивни неблагоприятия, като прееклампсия, както и идентифицираната микро-РНК146, включената в диагностичния панел за болестта на Алцхаймер.

Литературният обзор е центриран към планираните проучвания и като цяло показва много добро познаване на проблема, аналитично мислене и способност за обобщаване от страна на докторанта.

#### **Цел и задачи на дисертацията**

Целта на настоящата работа е изследване на експресионния профил на некодиращи микро-РНК гени при пациенти с шизофрения посредством широкомащабен микро-РНК майкроарей анализ и високо специфичен количествен RT-PCR анализ.

За постигане на поставената цел логично са формулирани и изведени конкретни задачи.

#### **Материал и методи**

Разработката се базира на представителна за този тип проучвания група български пациенти с шизофрения – общо 33 от двата пола. Паралелно е използвана контролна група от 25 лица. Клиничната диагноза на пациентите е осъществена от опитни психиатри, съгласно критериите на МКБ-10.

За изпълнение на поставените задачи са приложени редица съвременни молекулярно-генетични методи - изготвяне на сборни РНК проби (пулове), преципитация на РНК, паралелен експресионен анализ на микро-РНКи посредством майкроарей анализ позволяващ едновременна детекция на 1898 зрели микро-РНК молекули. Използвана е микрочипова микро-РНК платформа(LC Sciences) с висока чувствителност и специфична детекция на

малки РНК молекули. На втори етап на разработката е приложен относителен количествен RT-PCR експресионен анализ на микро-РНК молекули, като се съпоставя експресията им с тази на референтен ген за *B actin* с постоянна експресия.

Съвременен, мащабен биоинформационен анализ за търсене на таргетни гени на дисрегулираните микро-РНК е реализиран при използване на web-базираната бази данни miRWalk, съдържащи всички възможни таргетни секвенции на белтък-кодиращите гени.

Приложените методи са подходящо онагледени и много добре описани, което позволява използването им за получаване на възпроизводими резултати.

Проучването е добре планирано и реализирано, като алгоритъмът включва няколко стъпки – анализ на експресионния профил на малки РНК молекули (микро-РНК майкроарей анализ (LC Sciences); идентифициране на диференциално експресирани микро-РНК молекули; провеждане на индивидуален експресионен микро-РНК анализ в групите пациенти и контроли; провеждане на предикторен биоинформативен анализ за търсене на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресираните микро-РНК молекули;

### **Резултати и обсъждане**

При проведеният високо-резолютивен микро-РНК експресионен анализ с използване на разширена микрочипова платформа, носеща 1898 уникални микро-РНК последователности са разкрити 25 диференциално експресирани микро-РНК молекули. От тях 14 са с повишена експресия спрямо контролната група, а 11 с понижена. Тази находка показва съществена дисрегулация в генома на пациентите с шизофрения и потвърждава данните на чужди автори от подобни проучвания.

Добрата литературна осведоменост позволява на докторанта да предложи възможни обяснения на тази находка със събития на молекулно ниво – възможна понижена транскрипционна репресия на първичните микро-РНК транскрипти; промени, засягащи специфични протеини от групата Ago или ензима DICER 1, свързани с узряването на прекурсорните микро-РНК; променен период на полуразпад/полуживот на микро-РНКте;

По-нататъшното разгръщане на проучването включва изследване на относителната количествена експресия на индивидуални микро-РНК молекули чрез Stem-loop qRT-PCR анализ. С него е установена статистически значима

промяна в експресията при 3 от анализираниите микро-РНК молекули - микро-РНК-320а, микро-РНК-106а-5р и микро-РНК-222-3р. От фамилията микро-РНК-320 статистически значимо повишена експресия е получена само за микро-РНК-320а, както и за микро-РНК-222-3р, а понижена експресия е регистрирана за микро-РНК-106а-5р .

Паралелно е проучена експресията на иРНК на *DICER1* при 31 пациента. При тях е установено относително по-ниско ниво на експресия в сравнение с контролите. Това логично дава основание на докторанта да предположи участието на този ген в наблюдаваната дисрегулация на микро-РНК молекули.

Регистрираната статистически значима разлика в експресията на 3 микро-РНК гена – микро-РНК-106а-5р, микро-РНК-222-3р, микро-РНК-320а и гена, участващ в биогенезата на микро-РНК молекули *DICER1* ги определят, като потенциални биомаркери за шизофрения при изследваните пациенти. Наблюдаваните отклонения в микро-РНК профила представляват оригинален принос към проучванията на патогенезата на шизофренията и с основание биха могли да се обсъждат и прилагат, като биомаркери при диагностиката на шизофрения.

От проведени проучвания на етиопатогенезата на шизофренията е добре известно, че съществуват известни различия в епигенетичния метилационен профил свързани с пола на пациентите. В тази връзка докторантът с основание е потърсил асоциация на регистрираните микро-РНК молекули с променена експресия –микро-РНК-106а-5р, микро-РНК-222-3р и микро-РНК-320а) и пола на пациентите чрез непараметричния Kruskal-Wallis тест. Статистически значима разлика в микро-РНК-222-3р експресията е наблюдавана при жените с шизофрения в сравнение със здравите жени-контроли, докато при мъжете такова различие не е регистрирано. Такава значима разлика е наблюдавана и в нивото на експресия на микро-РНК-320а между двата пола при пациентите в сравнение с контролите. Тези данни демонстрират определени разлики в експресионния микро-РНК профил и са с определен приносен характер.

С пряка практическа насоченост е приложения *ROC* (receiver operating characteristic) анализ за оценка на диагностичната чувствителност и специфичност на установените потенциални биомаркери при проведения *qRT-PCR* анализ поотделно и като комбинирани класификатори. Анализът на комбинирани класификатори включващ намерените диференцирано

експресирани молекули, микро-РНК 222-3p, микро-РНК 106-5p и микро-РНК-320a, показва висока диагностична чувствителност- 81,5% и специфичност от 100%. Прилагането на последния комбиниран подход показва по-добра предиктивна характеристика в сравнение с използването на единични маркери и има потенциално клинично-диагностично значение.

Определен интерес и значимост представляват данните за прицелните гени на установените диференциално експресирани микро-РНКи получени чрез прилагане на биоинформационен анализ с web-базираната бази данни miRWalk. Те биха допринесли за разбиране патогенезата на шизофренията, чрез повлияване на сигнални пътища и механизмите на развитие и функциониране на централната нервна система.

В допълнение към резултатите получени от експресионните изследвания е направен опит да се потърси връзка на типа на експресията и хромозомната локализация на гените отговарящи за установените микро-РНКи, показали различия в експресията. Използван е специфичен UC Santa Cruz Genome Browser. Регистрирани са няколко близко разположени, на една и съща хромозома, двойки гени за микро-РНК молекули, показващи сходна промяна в експресията и вероятно реализиращи съвместна регулация на някои процеси. Тази находка макар и предварителна също трябва да се оцени по достойнство, тъй като очертава насоки за бъдещи проучвания.

Получените резултати от проучванията са документирани прецизно, с таблици и фигури. Резултатите са обсъдени компетентно и сравнително с известните литературни данни. Представена е детайлна информация за отделните микро-РНК молекули с променен експресионен профил при шизофрения и редица друг онкологични, неврологични и психиатрични заболявания. Особен интерес предизвиква микро-РНК-320a, като потенциален регулатор на експресията на гени, свързани с нервната система. Нарушена експресия на тази микро-РНК е установена при пациенти с мултиплена склероза, миастения гравис и други психиатрични състояния. Това предполага, че микро-РНК-320a е една от критичните регулаторни молекули в развитието на централната нервна система.

Докторантът прави адекватни интерпретации и заключения, което е показател за добри умения за боравене с научните факти.

#### **Изводи**

В заключителната част на дисертационния труд, дисертантът прави кратко обобщение на постигнатите най-значими резултати и възможното им практическо приложение и формулира 6 основни изводи, които приемам, като съответстващи на представените резултати и тяхното значение. Трудът е определено с приносен характер, тъй като за първи път в България се проучват микро-РНК епигенетичния механизъм при болни с шизофрения. Идентифицирани са микро-РНК молекули с качества за потенциални специфични биологични маркери за заболяването.

Формулираните изводи и приноси съответствуват на получените резултати от проучването и са с оригинален характер. Те намират място в 3 публикации на английски, където докторантът е първи автор и 2 съобщения на международни научни форуми.

#### **Автореферат**

Авторефератът отразява основните раздели на собствените разработки. Той е достатъчно информативен и може да се ползва, като източник за запознаване с резултатите от проучването и достойнствата на дисертационния труд.

Дисертацията и автореферата са написани на добър научен български език и показват много добро познаване на разработвания проблем. Забележките ми са свързани с някои технически пропуски: така някои изречения са сравнително по-дълги и трудни за бързо възприемане; по-подходящо е да се използват български изрази и да се избягват такива, като “високопроцесивни технологични платформи”, “телесни флуиди”, “венозната кръв, като телесен флуид” (стр. 63, 64, 66); на стр. 75 има недовършено изречение – “Всички пациенти включени в изследването .....? “; има някои повторени пасажки, като този в края на стр.25 и началото на стр.26 от автореферата;

Освен забелязаните отделни технически пропуски и единични правописни грешки, нямам съществени забележки, които да се отразяват на резултатите и формулираните изводи от проучването.

#### **По-важни приноси на дисертационния труд**

Дисертационният труд има редица оригинални и потвърдителни приноси с теоретично и научно-приложно значение :

- ❖ за първи път у нас е проведен геномен микрочипов анализ на експресионният профил на микро-РНК молекули в периферна кръв при пациенти с шизофрения.
- ❖ предложен е нов епигенетичен механизъм с участието на специфични микро-РНК молекули в патогенезата на шизофренията.
- ❖ при болни с шизофрения са установени кандидат микро-РНК молекули с диференциална експресия и с потенциални характеристики на биомаркери за заболяването.
- ❖ Установени са асоциирани с пола разлики в микро-РНК експресионните профили на пациенти с шизофрения.
- ❖ идентифицирани са прицелни белтък-кодиращи гени на диференциално експресираниите микро-РНК молекули.
- ❖ установена е връзка между експресията на микро-РНК молекулите, показали диференциална експресия и геномната им локализация.
- ❖ разширена е ДНК и РНК банката от пациенти с шизофрения, което предоставя възможност за по-мощни бъдещи проучвания.

### **Заклучение**

Считам, че дисертационният труд на Тихомир Илиев Вълчев напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение. Разработвания проблем е актуален и с подчертана практическа значимост. Използвани са съвременни изследователски методи за епигеномен анализ и са получени резултати с определен приносен характер, намерили място в периодичния медицински печат и докладвани на научни международни форуми. Това ми дава основание да препоръчам на научното жури да предложи Тихомир Илиев Вълчев за присъждане на научната и образователна степен „доктор”.

09. 10.2016 г.

Проф. д-р Стоян Лалчев, д.м.

