



## **РЕЦЕНЗИЯ**

### **ЗА ТИХОМИР ИЛИЕВ ВЪЧЕВ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД НА ТЕМА „АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИЯ ПРОФИЛ НА НЕКОДИРАЩИ МИРНК ГЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ШИЗОФРЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ШИРОКОМАЩАБЕН МИРНК МАЙКРОАРЕЙ АНАЛИЗ И ВИСОКО СПЕЦИФИЧЕН КОЛИЧЕСТВЕН RT-PCR**

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”.**

Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, шифър 4.3.Професионално направление: „Биологически науки” Докторска програма: Генетика. Изготвил реценцията Проф. Ваня Недкова ,дм МУ – Плевен, Катедра Педиатрия.

Тихомир Илиев Въчев е роден на 9.01.1981г. През 2005 година завършва бакалавър на специалност „Биология”, „ПУ- Паисий Хилендарски”, Пловдив.

През 2008г завършва магистратура „Молекулярна биология и биотехнологии” на ПУ-Паисий Хилендарски”.

От 2013г е докторант по Медицинска генетика, МУ- Пловдив.

Научните интереси на Тихомир Въчев са свързани с епигенетика на психичните разстройства, аутизъм и шизофрения; молекулярни аспекти на психичните заболявания.

Изследванията на Въчев са извършени в Катедрата по Педиатрия и Медицинска Генетика ,Медицински университет –Пловдив и в LC Sciences (USA) за микро РНК експресионният анализ.

Представеният дисертационен труд обхваща 215 стандартни страници, съдържа 38 фигури и 13 таблици. Литературната справка е изготвена върху 299 източника.

Шизофренията е тежко мултифакторно психиатрично заболяване с висока популационна честота, протичащо хронично и е свързано със засягане на почти всички висши корови функции: социални, поведенчески, когнитивни, емоционални.

Причините за поява на шизофрения са все още неясни, но се знае че са резултат на генетична предиспозиция и фактори на средата. Основна роля в етиологията играят грешки в развитието на нервната система и нарушения в метаболитна на някои невромедиатори или инфекциозни агенти. Диагнозата шизофрения се поставя въз основа на клинично интервю, но не се провежда етиологично насочено лечение и това е причината за високия интерес към заболяването в научната сфера.

Съвремените постижения на геномиката насочват вниманието върху редица кандидат хромозочни региони и кандидат гени за предразположение към шизофрения, но все още данните са противоречиви. Подобни изследвания са провеждани при сравнително малък брой психиатрични заболявания.

В България не се провеждани експресионни изследвания на миРНК молекули в областта на молекулярната психиатрия.

Ето защо поставената цел на изследването : ЕКСПРЕСИОННИЯ ПРОФИЛ НА НЕКОДИРАЩИ МИРНК ГЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ШИЗОФРЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ШИРОКОМАЩАБЕН МИРНК МАЙКРОАРЕЙ АНАЛИЗ е актуална и се провежда за първи път у нас.

Авторът на дисертационния труд си поставя 6 задачи:

1. Изолиране на тотална РНК от периферна кръв и изготвяне на сборни РНК проби на пациенти с шизофрения и контролна група – здрави индивиди;
2. Анализ на миРНК експресионен профил в периферна кръв на пациенти с диагноза шизофрения и контролна група.
3. Провеждане на миРНК специфичен количествен RT-PCR експресионен анализ на кандидат миРНК молекули.

4. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните миРНК биомаркери при шизофрения.
5. Провеждане на предикторен биоинформатичен анализ за идентифициране на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули.
6. Картиране на миРНК молекули показали диференциална експресия от майкроарей данни в генома.

Дизайнът на проучването и информираното съгласие са одобрени от Комисия от научна етика при МУ-Пловдив.

Изследваните пациенти са с поставена консенсусна диагноза шизофрения, съгласно международна система за диагностика. Задължителни китерии за включване в извадката е бил участниците да не са приемали лечение в рамките на 1 месец.

Изследвани са 33 болни с шизофрения на средна възраст 45.6 години и 25 здрави контроли на същата възраст.

Изследвания включват:

- екстракция на тотална РНК от периферна кръв,
- хоризонтална агарозна гел-електрофореза на РНК,
- количествен анализ на изолираната РНК,
- изготвяне на сборни РНК проби и преципитация на РНК,
- паралелен експресионен анализ на миРНК,
- предикторен биоинформатичен анализ за търсене на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните ми-РНК молекули,
- анализ на праймерни двойки,
- провеждане на обратна транскрипция на ми-РНК молекули,
- синтез на копи-ДНК вериги,
- преамплификация на получените копи,
- количествен PCR-анализ, провеждане на обратна транскрипция на протеин-кодиращи гени.

Резултати: При проведения майкроарей експресионен анализ са идентифицирани 25 диференциално експресирани миРНК молекули, 14 от които са

с повишена и 11 с понижена експресия при пациенти с шизофрения. Описаните експресионни промени могат да се приемат за потенциални биомаркерни молекули при шизофрения.

Авторът установява статистически значима разлика в експресията на три миРНК гена, миРНК- 106 а-5р, миРНК- 222- 3р, миРНК-320а и гена участващ в биогенезата на миРНК молекули. От проведените биоинформатични анализи са идентифицирани таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресираните ми РНК молекули, участващи в ключови сигнални пътища и имащи роля в патофизиологията на шизофренията.

Специфичния модел на експресия на диференциално експресираните миРНК молекули може да се дължи на съвместно регулиране поради тяхната колокализация в генома.

Проведените експресионни изследвания на анализираните ми РНК молекули дават основание да се предположи участието на миРНК, миРНК- 106 а-5р, миРНК- 222- 3р, миРНК-320а и Dicer1 гена в патогенезата на шизофренията.

Настоящото проучване е първо по рода си в България за пълния транскрипционен профил на миРНК гените от периферна кръв на болните с шизофрения.

Получените резултати показват, че идентифицираните миРНК молекули могат да се разглеждат като биомаркерни молекули при шизофрения. Получените резултати доказват участието на миРНК молекули в развитието на шизофренията. Съществуват специфични нарушения в генната експресия при пациенти с шизофрения. Авторът картира локализацията на диференциално експресираните миРНК молекули в генома, а някои изследвания показват и локоспецифична диференциална експресия, което може да бъде насока за бъдещи изследвания. Настоящото изследване е в начален етап, но авторът предвижда задълбочени проучвания на потенциални кандидат биомаркерни молекули в по-големи групи от пациенти с диагноза шизофрения.

Едно от големите предизвикателства в изследването на миРНК експресията при невро-психиатричните заболявания е събирането на проби от първичната прицелна тъкан – мозък. Поради невъзможност да се извършват изследвания на мозък, се провеждат ретроспективни проучвания с постмортен мозъчни проби. Подобен

подход би позволил идентифицирането на етиопатогенетичните фактори на заболяването.

В представения дисертационен труд експериментално е изследван общия експресионен профил на миРНК молекули в периферна кръв от пациенти с шизофрения. Установена е промяна в експресията на голям брой миРНК молекули. Използвания подход позволява да се направи първа стъпка в разбирането на ролята на миРНК молекулите и свързаните с тях биологични процеси в етиопатогенезата на шизофренията.

Изследването на експресионния профил на всички известни миРНК гени показва 25 диференциално експресирани миРНК молекули, със статистическа разлика спрямо контролната група

От получените резултати са изведени 6 извода, които точно отразяват данните от експерименталното изследване.

#### **Приноси:**

##### **Приноси с научен характер:**

- Установени са кандидат ми РНК молекули с диференциална експресия показващи асоциация с шизофрения.
- Предложен нов епигенетичен механизъм с участието на специфични миРНК молекули в патогенезата на шизофренията.
- Установени са асоциирани с пола разлики в миРНК експресионните профили между пациенти с шизофрения и контролната група лица и между пациентите с шизофрения.
- Установена е връзка между експресията на миРНК молекулите, показали диференциална експресия и геномна локализация.
- Идентифицирани са таргент белтък кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули.
- За първи път в България е изследван експресионния профил на ми РНК молекули в периферната кръв при пациенти с шизофрения.

##### **Приноси от приложен характер:**

- Идентифицирани са кандидат миРНК молекули с потенциални характеристики на биомаркери при шизофрения.

- Разширена е РНК и ДНК банката от пациенти с шизофрения, предоставящи възможност за по мащабни бълещи проучвания.

**Практически приноси:**

- Идентифицирането на миРНК молекулите, като биомаркерни молекули при шизофрения, би позволило поставяне на точна диагноза при трудни пациенти.
- Получените резултати са с принос към изясняване на етиопатогенезата на шизофренията.

Авторът на дисертацията е направил три научни публикации и две участия на научни форуми по темите на дисертационния труд.

В представеното CV, Тихомир Въчев впечатлява с големия брой участия с научни съобщения – публикации в европейски и български списания, общо 23 на брой и 11 постерни сесии в чужбина.

Авторът е участвал и в 5 национални и международни научни проекти свързани с молекулярните аспекти на психичните заболявания.

В заключение: Представеният дисертационен труд на тема: „АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИЯ ПРОФИЛ НА НЕКОДИРАЩИ МИРНК ГЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ШИЗОФРЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ШИРОКОМАЩАБЕН МИРНК МАЙКРОАРЕЙ АНАЛИЗ И ВИСОКО СПЕЦИФИЧЕН КОЛИЧЕСТВЕН RT-PCR” отговаря на изискванията за дисертационен труд, за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”, Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, шифър 4.3. Професионално направление: „Биологически науки” Докторска програма: Генетика

Препоръчвам на научното жури да гласува положително за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” на Тихомир Илиев Въчев

10.10.2016г.

Проф.В.Недкова, дм 