



**СТАНОВИЩЕ**

от доктор **Нася Борисова Томлекова** – доцент в Институт по зеленчукови култури  
„Марица”, Пловдив

(акад. дл., име, презиме, фамилия, н.ст. – научна организация)

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен '**доктор**'  
професионално направление „Природни науки, математика и информатика”, Шифър 4.3.,  
професионално направление „Биологически науки”  
докторска програма „Генетика“

**Автор:** Тихомир Илиев Въчев – докторант

**Форма на докторантурата:** редовна форма на обучение

**Катедра:** „Педиатрия и медицинска генетика”

**Тема:** „Анализ на експресионния профил на некодиращи микро-РНК гени при пациенти с шизофрения посредством широкомащабен микро-РНК майкроарей анализ и високоспецифичен количествен RT-PCR”

**Научен ръководител:** Доц. д-р Вили Стоянова, дм от Медицински университет, гр. Пловдив

### **1. Общо представяне на процедурата и докторанта**

Представеният комплект материали е в съответствие с Чл.115 (1) от Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в МУ – Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 06.11.2014 г.

Докторантът е приложил 5 публикации.

Тихомир Въчев е завършил висше образование със степен „Магистър биолог”, специализация и докторантура по „Молекулярна биология” към Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. От март 2013 год. е зачислен в редовна докторантура в катедрата „Педиатрия и медицинска генетика” към Медицински университет, гр. Пловдив. Като докторант той извършва изследователска дейност в колаборация с LC Sciences (USA). Владее свободно английски език.

### **2. Актуалност на тематиката**

Шизофренията е мултифакторно заболяване с висока популационна честота и засяга социални, поведенчески, когнитивни и емоционални функции на пациентите. Продължителността на живот на болните, по-често от мъжки пол, е значително по-кратка. Използваните класически симптоми за диагностицирането се наблюдават и при различни други психиатрични разстройства. Микро-РНК молекулите са в основата на процеси като регулация на генната експресия. През последните години анализът на миРНК молекули намира приложение в медицинските изследвания на шизофренията за идентифициране на нови прогностични биомаркери, при изследване на етиологията и при търсене на нови терапевтични подходи. Разработването на лесно приложими тестови процедури, при които може да анализират специфични микро-РНК молекули, служи за диагностични и прогностични цели. Изследванията, насочени към валидирането на микро-РНК биомаркери, се налагат като необходимост. В България все още не са провеждани генетични експресионни анализи на миРНК молекули, което мотивира представеното изследване за приложението им в областта на молекулярната психиатрия.

### **3. Познаване на проблема**

Идеята за провеждане на изследването е изградена много стройно и добре обоснована с изчерпателен литературен преглед. Литературната справка е богата, онагледена, подходящо и целенасочено проведена. Състои се от впечатляващ брой - 299 литературни източника, от които 298 са на латиница. Половината от цитиранията са от последните десет години.

Посочени са генетичната предразположеност към шизофрения - засягането на редица гени, вкл. анализът за скаченост и факторите на средата. Особено внимание заслужават правилно формулирани понятия, като това за епигенетиката, добре описани са наследствените модификации, вкл. ДНК метилирането, хистоновите модификации и микро-РНК молекулите и ролята им в регулацията на генната експресия, както и връзката им с шизофренията. Направен е преглед на вече идентифицираните микро-РНК при шизофрения, ролята им за диагностиката ѝ, както и при други невродегенеративни заболявания. Описани са използваните като контрола за нормализация при микро-РНК експресионни експерименти рибозомна РНК (рРНК), малката ядрена РНК U6 (U6 snRNA), малките ядръцеви РНК молекули (snoRNAs), синтетични варианти на микро РНК молекули (spike-in контрола) - екзогенна, от други организми.

Ясно подчертани са тенденциите на бъдещите изследвания във всеки раздел на прегледа на литературата.

Представената информация в този раздел ми дава основание да считам, че докторантът е много добре осведомен относно основните постижения, свързани с проблемите, над които работи в дисертационния си труд.

### **4. Методика на изследването**

Впечатляващо е високото методично ниво. В дисертационния труд правилно е избран методичният подход за профилиране на микро-РНК експресията в периферна кръв при пациенти с диагноза шизофрения, в сравнение с контрола – без заболяването. Широкомасштабните транскрипционни анализи на миРНК молекули се използват за оценяване на относителните нива на целеви микро-РНК молекули като биомаркери, в сравнение с един или повече стабилно експресирани ендогенни контролни гени. С последните се нормализират разликите при експерименталната ефективност между различните анализирани проби.

Анализите са изведени с подходящо избрани мощни съвременни методи: широкомасштабен миРНК майкроарей анализ и високо специфичен количествен RT-PCR анализ. Количественото определяне на специфични микро-РНК молекули при различни условия е необходимо, за да се минимализират възможните вариации в процеса на пречистване на микро-РНК от пробите, както и да се гарантира запазването на специфичния експресионен профил към момента на пробовземането до момента на извършване на анализа. На нивото, на което се намират изследванията понастоящем, най-застъпената стратегия за валидиране на данни, получени от експресионен микрочипов анализ, е провеждането на qRT-PCR анализ, лесно приложим в клинични условия. С високата си чувствителност и специфичност той гарантира достоверността на получените резултати. Докторантът познава най-съвременните методи в допълнение към наличните аналитични инструменти за идентифициране и количествен анализ на микро-РНК профилиране – микро-РНК микрочиповият, количественият RT-PCR анализ и масовото паралелно секвениране на микро-РНК молекули (Deep Sequencing of small RNAs), техниките за секвениране от следващо поколение (Next-Generation Sequencing - NGS), като droplet digital PCR (ddPCR). Усвоени и успешно приложени от докторанта са описаните правилно и подробно молекулярни и биоинформатични методи.

Обстойната информация в тази глава би могла да послужи за решаване на други научни проблеми и клинични случаи.

## **5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

Дисертацията е правилно структурирана по раздели. В нея се цели анализирането на микро-РНК молекулите за установяване на характерен експресионен профил при шизофрения, който да послужи за въвеждане на молекулярното диагностициране. Поставената цел на работата е разгърната в шест добре формулирани задачи. Подробно описан е протоколът за прилагане на методите за молекулярно характеризирание. Изследванията са провеждани по много логичен начин. Резултатите са дискутирани във връзка с постиженията на други автори по проблема и умело са интерпретирани. Получената информация от резултатите е онагледена с 38 фигури и 13 таблици. Правилно са формулирани научните изводи. Те съответстват както на поставените цели, така и на представените резултати и дискусия. Приносите от дисертацията са правилно изведени, но са отбелязани доста скромно. В действителност, дисертационният труд има много по-мощен ефект. Основно, той допринася с добре организиран аналитичен подход с подходящи методи, благодарение на който са получени съответните резултати.

Представеното проучване на диференциално експресирани миРНК молекули при пациенти с диагноза шизофрения е първото по рода си проучване в България на пълния транскрипционен профил на миРНК гени от лесно достъпен материал, периферна кръв.

Досега диагностиката при шизофренията се е извършвала според наблюдаваните клинични признаци и симптоми. Развитието на диагностични подходи, основаващи се на молекулярното профилиране, може да послужи за уточняване на клиничната диагноза, ускоряване на диагностицирането, квалифицирана психиатрична оценка и предприемането на ранни интервенции. Микро-РНК молекулите с биологичните си характеристики са потенциални биомаркери, които могат да бъдат използвани като диагностични индикатори. Приложението на проведените изследвания в клиничната практика е бъдеща перспектива, тъй като увеличава капацитета на терапевтичните процедури и са значително по-ефективни, в сравнение с традиционните.

Потвърдено е участието на миРНК молекулите в редица основни пътища, свързани с развитието и диференциацията на нервната система, респективно с шизофренията.

Идентифицирани са миРНК молекули, които могат да се използват като биомаркерни молекули, както и белтък-кодиращи гени, прицелни за диференциално експресионните миРНК молекули. Картирана е локализацията на диференциално експресирани миРНК молекули в генома, а за някои от тях е показана сходна промяна в експресията, съвместно регулиране, поради ко-локализацията им в генома.

Установени са 25 диференциално експресирани миРНК молекули при болни от шизофрения. Допуска се участието на миРНК-106a-5p, миРНК-222-3p, миРНК-320a и DICER1 гена, отговорен за биогенезата на миРНК в патогенезата на шизофрения. Чрез нарушаването на микро-РНК функцията е възможно да се предаде негативно въздействие върху множество целеви гени.

Потвърдена е диференциална експресия на редица изследвани миРНК молекули.

Идентифицирани са нови миРНК молекули с промяна в експресията. За използване като нови неинвазивни биомаркери за диагностика при шизофрения се препоръчват миРНК-132, миРНК-134, миРНК-1271, миРНК-664\*, миРНК-200c и миРНК-432.

Оригиналноста на дисертацията произтича от факта, че в нея за първи път в България се провеждат системни изследвания върху експресионния профил на микро-РНК молекули в периферна кръв при пациенти с шизофрения.

Ценен е и проведеният биоинформатичен анализ за идентифициране на валидираните целеви гени на дисрегулираните микро-РНК молекули.

Проведено е картиране на микро-РНК молекули, показали диференциална експресия от данните, получени с микроарей анализа. Изследван е общият експресионен профил на микро РНК молекули в периферна кръв от пациенти с шизофрения. Установена е промяна в експресията на голям брой микро-РНК молекули, а също и асоциирани с пола разлики. В представеното изследване количественият микро-РНК-специфичен qRT-PCR анализ е насочен към идентифициране и валидиране на неинвазивни биомаркери при шизофрения. За първи път са получени експериментални доказателства от анализ на периферна кръв, в които микро-РНК-320а показва нарушена експресия при пациенти с шизофрения, който вероятно рефлектира върху транскрипция/транслация на редица прицелни протеин-кодиращи гени.

Дисертацията е разработена на много високо ниво, а получените резултати могат да бъдат използвани в епигенетиката и молекулярната психиатрия за решаването на проблеми от практическа значимост. Подходящо е разширяване на извадката на пациенти, за да се премине към използването като биомаркери на идентифицираните надеждни кандидати - миРНК-137, миРНК-132/212, и представители на миРНК-15 семейството и DICER1 гена.

Научната стойност на дисертационния труд е и в това, че той насочва вниманието към продължаване на разработването на проблема за миРНК експресията и връзката им с психичните разстройства, локализацията им в отделните неврони, етапа и степента, в които те допринасят за развитието на заболяването. Микро-РНК експресията в мозъчна тъкан при клинично здрави индивиди ще допринесе за изясняване на биологичните процеси, в които те вземат участие.

## **6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта**

Тихомир Въчев представя три публикации в съавторство в реферирано списание International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS), индексирано по Коперникус. В списъка от публикации са включени и два доклада, представени на международни научни форуми в периода на подготовка преди и в началото на редовната докторантура. Представените публикации по темата потвърждават високото научно ниво на дисертацията. В тях се анализира критично и задълбочено информацията. Резултатите се пречупват през тяхното практическо приложение в аналитичната работа и тяхната по-далечна перспектива. Забелязани са също и цитирания на публикациите.

Наред с достойнствата на дисертационния труд бих искала да подчертая и някои лични качества на докторанта, пряко свързани с научната му работа. От контактите си с него бих могла да характеризирам Тихомир Въчев като амбициозен млад учен, което той доказва с разработения дисертационен труд. В работата си той се отличава с прецизност и трудолюбие и с толерантност към колегите. Желан и търсен партньор е в научни екипи, способен за самостоятелни научни изследвания. С разработването на настоящата дисертация той прави важна стъпка в израстването си като учен.

## **7. Автореферат**

Авторефератът съответства на представените в дисертацията резултати и изводи. Оформиен е съгласно изискванията.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В дисертационния труд целите и задачите са изпълнени. Постигнатите научни и научно-приложни резултати представляват оригинален и значим принос в науката и отговарят

на всички изисквани критерии според Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСБ и съответния Правилник на МУ. Представените материали и резултати в дисертацията напълно съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд доказва, че докторантът Тихомир Вълчев притежава знания, експериментален опит и професионални качества за целенасочено и самостоятелно провеждане на научни изследвания на високо теоретично ниво. Напълно подкрепям кандидатурата на Тихомир Вълчев да получи научната и образователна докторска степен в посочената област.

Въз основа на гореизложеното, като член на научното жури давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор” на Тихомир Илиев Вълчев за защита в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и биоинформатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Генетика“.

28.09. 2016 г.

гр. Пловдив

**Изготвил становището:**



/доц. д-р Нася Томлева/