

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ



МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ И МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА
РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р МИРОСЛАВА БОШЕВА, ДМ

ТИХОМИР ИЛИЕВ ВЪЧЕВ

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

АВТОРЕФЕРАТ

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”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Доц. Д-р Вили Стоянова, дм

ПЛОВДИВ 2016

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

Докторантът е зачислен за редовна докторантура към Катедрата по Педиатрия и Медицинска Генетика, Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив със Заповед № Р-792 /25.03.2013 г.

Дисертационният труд обхваща 215 стандартни страници, от които основен текст 183 страници. Литературната справка обхваща 299 източника. Дисертацията съдържа 38 фигури и 13 таблици.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра Педиатрия и Медицинска Генетика, Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив на 30.03.2016 г.

Научно жури в състав:

Председател: Доц. д-р Вили Стоянова, дм
 Членове: Проф. д-р Стоян Ганчев Лалчев, дм
 Доц. д-р Нася Борисова Томлекова
 Проф. д-р Ваня Недкова – Коларова, дм
 Доц. д-р Мариан Драганов
 Резервни членове: Проф. д-р Мирослава Бошева, дм
 Доц. д-р Мария Симеонова

Автор: Тихомир Илиев Въчев

Заглавие: Анализ на експресионния профил на некодиращи мирнк гени при пациенти с шизофрения посредством широкомащабен мирнк майкроарей анализ и високо специфичен количествен RT-PCR

Област на висше образование: 7. “Здравеопазване и спорт”

Професионално направление: 7.1. “Медицина”

Докторска програма: “Генетика”

Издавам своята благодарност: на научния си ръководител доц. д-р В. Стоянова за пълното доверие и подкрепа при реализирането на настоящия дисертационен труд, на д-р Н. Попов, дм за помощта при набирането на биологичен материал от пациенти с диагноза шизфрения и здрави контролни лица, на проф. д-р М. Бошева за доверието, на семейството ми за пълната им подкрепа.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2016 г. от ч. на заседание на Научното жури във II аудитория на Аудиторния комплекс на Медицински университет – Пловдив. Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на Медицински университет – Пловдив и са публикувани на интернет страницата на университета.

I. Съдържание

I. Съдържание.....	3
II. Въведение.....	6
III. Цел и задачи.....	8
IV. Материали и Методи.....	9
IV. 1. Участници в проучването	9
IV. 2. Вземане на венозна кръв	10
IV. 3. Засекретяване на пробите	10
IV. 4. Екстракция на тотална РНК от периферна кръв с помоща <i>RAХgene Blood miRNA Kit</i>	11
IV. 5. Хоризонтална агарозна гел-електрофореза на РНК.....	11
IV. 6. Количествен анализ на изолираната РНК.....	11
IV. 7. Изготвяне на сборни РНК проби (пулове) и преципитация на РНК.....	12
IV. 8. Паралелен експресионен анализ на миРНК посредством майкроарей анализ (LC Sciences).....	13
IV. 9. Предикторен биоинформатичен анализ за търсене на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули.....	14
IV. 10. <i>In silico</i> дизайн и анализ на праймерни двойки.....	15
IV. 11. Провеждане на обратна транскрипция на миРНК молекули.....	15
IV. 12. Синтез на копи-ДНК вериги.....	16
IV. 13. Преамплификация на получените миРНК специфични копии ДНК молекули.....	16
IV. 14. Количествен PCR анализ (Quantitative Reverse Transcription Real- Time PCR) на миРНК молекули.....	17
IV. 15. Провеждане на qRT-PCR (Fermentas SYBR Green PCR Kit/Thermo).....	17

IV. 16. Провеждане на обратна транскрипция на протеин-кодиращи гени.....	18
IV. 17. Провеждане на qRT-PCR (Fermentas SYBR Green PCR Kit (Thermo)).....	19
V. Резултати.....	21
V. 1. Екстракция на тотална РНК от венозна кръв.....	21
V. 2. Спектрофотометрично определяне на концентрацията на РНК.....	22
V. 3. Сборни РНК проби (пулове) и преципитация на РНК.....	22
V. 4. Извършване на qPCR – базирана контролна детекция за отхвърляне на налична ДНК в изолираните проби от тотална РНК.....	23
V. 5. Анализ на миРНК експресионният профил в периферна кръв чрез миРНК микрочип анализ (LC Sciences).....	25
V. 6. Количествен PCR анализ (<i>Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR</i>) на експресия на миРНК транскрипти при пациенти с шизофрения в сравнение с контролна група.....	34
V. 7. Анализ на кривите на денатурация (<i>Melting curve analysis</i>).....	35
V. 8. Анализ на ROC (receiver operating characteristic) кривите за определяне на диагностична точност на изследваните миРНК биомаркери при шизофрения.....	42
V. 9. Изследване на асоциирани с пола вариации в миРНК експресията при шизофрения.....	46
V. 10. Биоинформатичен анализ за идентифициране на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули.....	50
V. 11. Картиране на миРНК молекули показали диференциална експресия от микрочип данни (LC Sciences) в генома с помощта на UCSC Genome Browser.....	50
VI. Дискусия.....	55
VI. 1. МиРНК молекули с промяна в експресията при шизофрения.....	57

VI. 2.Бъдещи изследвания.....	61
VII. Заключение.....	62
VIII. Изводи.....	63
IX. Приноси.....	64

II. Въведение

Съгласно теорията за РНК света, появата на РНК молекула, едновременно способна на съхранение на информация и регулаторна роля, се явява крайъгълен камък в еволюцията на живота. В съвременната молекулярна генетика, РНК е в основата на процеси като пренос на генетичната информация и регулация на генната експресия. Със скромни размер от (20–24 нт.) и опростена структура, миРНК молекулите представляват ярък пример за функционална гъвкавост в света на РНК. През последните години анализът на миРНК молекули намира все по-широко приложение в медицинските изследвания, както за идентифициране на нови прогностични биомаркери при различни заболявания, така и при търсене на нови терапевтични подходи. Първоначално голяма част от проучванията, с обект на изследване миРНК молекули, са фокусирани върху изследвания при различни онкологични заболявания. В последните години обаче стана ясно, че подходите свързани с изучаването на миРНК молекули са много подходящи при изследване на етиологията и патогенезата на мултифакторните заболявания, към които спадат и психиатричните разстройства като шизофрения.

Шизофренията е тежко мултифакторно психиатрично заболяване с висока популационна честота от приблизително 1%, което често протича хронично и е свързано със засягане на почти всички висши корови функции: социални, поведенчески, когнитивни, емоционални. Много от класическите симптоми са застъпени и при други психиатрични разстройства, което затруднява точното диагностициране.

Причините за проявата на шизофрения все още остават неясни, макар да се знае, че е резултат от сложно взаимодействие между генетична предиспозиция (със засягане на редица гени, всеки от които сам по себе си има слаб ефект) и фактори на средата. Предполага се, че основна роля в етиологията играят грешки в развитието на нервната система и нарушения в метаболизма на някои невромедиатори или инфекциозни агенти. За момента диагнозата шизофрения се поставя на базата на клинично интервю и оценка на пациента, като не съществува етиологично насочено лечение, което е една от причините за високия интерес към заболяването в научната сфера.

Съвременните постижения в областта на геномиката фокусират внимание върху редица кандидат хромозомни региони и кандидат гени за

предразположеност към шизофрения, но все още данните остават противоречиви. МиРНК експресионните проучвания в областта на невробиологията и молекулярната психиатрия са в начален стадий и до момента в света са проведени сравнително малък брой такива при основни психиатрични заболявания. В България все още не са провеждани експресионни изследвания на миРНК молекули в областта на молекулярната психиатрия, което аргументира и провеждането на подобен род изследвания и у нас.

III. Цел и задачи:

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

За постигането на така дефинираната цел бяха поставени следните задачи:

1. Изолиране на тотална РНК от периферна кръв и изготвяне на сборни РНК проби (пулове) на пациенти с диагноза шизофрения и контролна група от здрави индивиди.

2. Анализ на миРНК експресионният профил в периферна кръв на пациенти с диагноза шизофрения и контролна група лица, чрез миРНК микрочип анализ (*LC Sciences*).

3. Провеждане на миРНК специфичен количествен RT-PCR експресионен анализ на кандидат миРНК молекули.

4. Анализ на ROC (*receiver operating characteristic*) 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 микрочип данни (*LC Sciences*) в генома с помощта на UCSC Genome Browser

IV. Материали и Методи

IV. 1. Участници в проучването

Дизайнът на на настоящото проучване и формата за информирано съгласие бяха одобрени от комисията по научна етика към Медицинския университет Пловдив. Писмено информирано съгласие беше получено от 33 пациенти, в Държавната психиатрия болница Пазарджик, и 25 здрави доброволци. Проведено беше Mini-International Neuropsychiatric Interview и рутинен психиатричен преглед при който бяха получена анамнестични данни за заболяването. Интервюто беше извършено от сертифициран психиатър, за оценка на диагнозата параноидна шизофрения на базата на критериите заложи в Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth text revised edition (DSM IV TR) (Диагностичен и статистически наръчник на психичните разстройства - четвърто преработено издание) и с цел изключване на каквито и да е други психични разстройства при контролите. Всички пациенти, включени в изследването Поставена е консенсусна диагноза - шизофрения съгласно международната система за диагностика DSM-IV (American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, 4thed.).

Задължителни критерии за включване в извадката бяха участниците да не са приемали никаква терапия (дори и психотропна) в рамките на 1 месец преди вземане на кръвни проби. Лицата с други хронични медицински и настоящи остри соматични/неврологични заболявания, злоупотреба с алкохол или наркотична зависимост също бяха изключени от извадките. Основната част от пациентите за настоящето проучване е набрана в рамките на проект “Анализ на експресионния профил на небелтък кодиращи – мРНК гени при шизофрения” на Катедрата Педиатрия и Медицинска генетика, Медицински университет – Пловдив Договор № НО-4/2011 г.

Таблица 1. Основни демографски показатели на изследваните пациенти и лица от контролната група.

<u>Групи</u>	<u>Брой</u>	<u>Средна възраст в години</u>	<u>Стандартно отклонение (SD)</u>	<u>Стандартна грешка (SE) Средна</u>
<u>Пациенти</u>	33	45.62	12.565	2.333
<u>Контролна група</u>	25	46.38	12.673	2.587

Групата анализирани индивиди включени в насоящата експериментална работа обхваща 33 пациента с диагноза шизофрения и група от 25 здрави лица-контроли. Средната възраст на изследваните пациентите е 45,6 год. (SD = 12.565). В контролната група средната възраст е 46,3 год. (SD = 12.673).

Всички участници, включени в настоящото изследване са от български произход. Пациентите с диагноза шизофрения включени в настоящото изследване са пациенти на ДПБ - Пазарджик. Пациентите са набирани от лекуващите ги лекари на базата на цялата достъпна информация за пациента, включително епикризи, картони на пациента.

IV. 2. Вземане на венозна кръв

При вземането на венозна кръв от пациентите включени в настоящото проучване се използва тънка игла – венкат, „бътерфлайка“ и PAXgene RNA Tube моновета.

IV. 3. Засекретяване на пробите

След вземането на кръвта пробите бяха засекретявани съответно с изискванията на стандартите на етичната комисия, като пробите получаваха съответно буквен код на пациента и пореден номер. Достъп до информацията имаха единствено лицата включени в провеждането на проучването, а конфиденциалността бе спазена според изискванията на ИС и етичните норми.

IV. 4. Екстракция на тотална РНК от периферна кръв с помощта на *PAXgene Blood miRNA Kit*

Екстракцията на тотална РНК от периферна кръв беше проведена с помощта на *PAXgene Blood miRNA Kit*. Технологията на *PAXgene Blood miRNA Kit* представлява добре утвърдена методика за пречистване (екстракция) на тотална РНК от венозна кръв, предварително изолирана в *PAX gene RNA Blood* моновета. Тази технология съчетава селективните свързващи свойства на силициевите мембрани със скоростта на *Micro Spin* технологията. Специализираната буферна система с високо солево съдържание позволява свързването на до 100 µg тотална РНК с размер по голям от 200 базови двойки към силициевата мембрана, като едновременно с това запазва и нискомолекулната фракция. Процедурата на екстракция предвижда обогатяване с информационни РНК молекули и нискомолекулна РНК фракция, подходяща за провеждане на миРНК експресионни изследвания.

IV. 5. Хоризонтална агарозна гел-електрофореза на РНК

Качествена оценка за наличието и степента на деградацията на РНК е направена с помощта на хоризонтална агарозна гел-електрофореза в 1% агарозен гел с етидиев бромид. Визуализацията на РНК беше проведена върху еднопроцентна агарозна TBE гел - електрофореза с използването на 0,5X TBE буферна разделяща система (50mM трис, 50mM борна киселина, 1mM ЕДТА, рН 8.3) при напрежение 4,5 V/cm² и визуализиращ агент етидиев бромид. За преценка на интегритета и размерите на анализираниите НК беше използван ДНК маркер: *O'GeneRuler* (Fermentas), визуализирани посредством фотодокументираща система с фиксирана дължина на вълната 312 nm.

IV. 6. Количествен анализ на изолираната РНК

Спектрофотометричното определяне на концентрацията на изолираната РНК беше проведено с помощта на *Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System* (BioTec), като за целта бяха използвани 2 µl обем от всяка проба. Измерването беше извършено при дължина на вълната 260 nm. Измереното съотношение

A260/A280 показва, че всички изолирани образци са с качество, подходящо за провеждане на майкроарей анализ (в диапазона 1,93-2,10).

IV. 7. Изготвяне на сборни РНК проби (пулове) и преципитация на РНК

След измерване концентрациите на всички проби беше изчислено необходимото количество обем от всяка проба за получаването на сборна РНК проба (пул) включваща всички проби от извадката с шизофрено болни и съответно сборна РНК проба (пул) от всички проби от контролната група.

Общите РНК пулове бяха приготвени като еднакво количество РНК от всеки един пациент се поставя в една обща епруветка (пул от шизофрено болни). По същия начин РНК от всяка една контролна РНК проба се поставя в друга епруветка (пул от контролна груп). При приготвянето на РНК пуловете от значение е точното определяне на концентрацията на РНК във всички проби, които вземат участие в пула. Първоначално РНК образците се разреждат до концентрация 100 ng/ μ l. След което се смесват равни количества РНК от предварително разредените до концентрация 100 ng/ μ l РНК образци. Смесването на пробите беше извършено върху сух лед, за да бъде минимизирана възможността за деградация на РНК. За успешното транспортиране и съхранение на изолираната РНК пробите бяха подложени на преципитация както следва: Добавяне на 3 обема абсолютен етанол; Добавяне на 1/10 обем 3M NaOAc, pH 5.2.

След създаването на двете комплексни РНК проби, образците бяха транспортирани до централата на LC Science, Huston, USA в термостабилни опаковки на сух лед (- 78°C) за поддържане на минимална температура, съгласно изискванията на лабораторията за качествено провеждане на миРНК майкроарей анализ. Използването на сервиз за извършването на ширококомашабния миРНК експресионен анализ от LC Science беше наложено поради липсата на майкроарейсистема достъпна за провеждането на анализа в България.

IV. 8. Паралелен експресионен анализ на миРНК посредством майкроарей анализ (LC Sciences)

Изследването на експресионният профил на миРНК молекули беше проведено с помощта на миРНК майкроарей базиран анализ, позволяващ паралелната детекция на 1898 зрели миРНК молекули. За извършването на анализа беше използвана миРНК платформа (LC Sciences) базирана на иновативната *μParaflo* майкроарей технология с уникален дизайн на проби, позволяващи висока чувствителност и специфична детекция на малки РНК молекули в изследваните проби. Прилагането на микрочип-базираното идентифициране на миРНК експресията предлага възможност за изследване на миРНК молекули с промяна в експресията при различни експериментални условия. Изборът на подходяща майкроарей технология в настоящата експериментална работа беше продиктуван от добрата възпроизводимост на получените резултатите, предлагана от *μParaflo* платформата на LC Sciences, както и чувствителността и пълното геномното покритие (miRBase v.18.0) на предложеният анализ. Необходимото количество тотална РНК за провеждането на майкроарей анализа беше изолирано с помощта на RAXgene Blood miRNA Kit (PreAnalytiX), където 5 μg тотална РНК беше подложена на фракциониране по размер с помощта на YM-100 Microcon филтър, където изолираната малка РНК фракция (< 300 nt) е удължена към своя 3' край с помощта на Поли (А) полимераза. Хибридизацията е проведена за едно денонощие върху *μParaflo* биочипа. Всяка проба на чипа се състои от химично модифицирани нуклеотиди, комплементарни на таргетната миРНК секвенция (miRBase v.18.0, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) и спейсърен сегмент от полиетиленгликол за удължаване на сегмента от субстрата. Пробите за детекция са получени посредством *in situ* синтез чрез PGR (photogenerated reagent) базирана химична реакция. Хибридизационната температура на топене е балансирана посредством химични модификации на пробите за детекция. Хибридизацията е проведена в 6 X SSPE буфер (0.90 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 6 mM EDTA, pH 6.8), съдържащ 25% формаид при 34 °C. Постхибридизационната детекция е извършена с флуоресцентно маркиране, използвайки tag-специфичен Cy5 маркер. Хибридизационното изображение е получено с устройство за лазерно сканиране (GenePix 4000B) и дигитализирано с помощта на Array-Pro софтуер за анализ на изображенията (Media Cybernetics). Данните бяха анализирани първоначално

чрез отстраняване на фоновият сигнал, оценяване значимостта на сигнала и последваща нормализация на сигнала, използвайки LOWESS филтър (Locally-weighted Regression). За по-висока точност на изследването е извършено двукратно техническо повторение, където стойностите на двата отделни сигнала са използвани за последващите статистически анализи.

IV. 9. Предикторен биоинформатичен анализ за търсене на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули

Биоинформатичният анализ за търсене на таргетни гени се извърши чрез web-базираната бази данни miRWalk, съдържащи всички възможни таргетни секвенции на белтък-кодиращите гени.

<http://www.mirwalk.com> базата данни позволява да покажем валидираните вече таргетни гени на диференциално експресираните миРНК молекули.

Таблица 2. Праймерни двойки използвани за провеждане на количествен миРНК експресионен анализ (qRT-PCR).

МиРНК	Праймерна секвенция (5'- 3')
miR-421 SL	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCGCCCAA
miR-421 For	ACACTCCAGCTGGGATCAACAGACATTAATT
miR-192-5p SL	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGCTGTCA
miR-192-5p For	ACACTCCAGCTGGGCTGACSTATGAATTG
miR-222-3p SL	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCCAGTA
miR-222-3p For	ACACTCCAGCTGGGAGCTACATCTGGCTA
miR-106a-5p SL	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACCTGC
miR-106a-5p For	ACACTCCAGCTGGGAAAAGTGCTTACAGTGC
miR-192-5p SL	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGCTGTCA
miR-192-5p For	ACACTCCAGCTGGGCTGACSTATGAATTG
miR-320b SL	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTTGCCCTC
miR-320b For	ACACTCCAGCTGGGAAAAGCTGGGTTGAGA

miR-320a SL	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCGCCCTC
miR-320a For	ACACTCCAGCTGGGAAAAGCTGGGTTTCAGA
miR-320c SL	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCCTCTC
miR-320c For	ACACTCCAGCTGGGAAAAGCAGGGTTGA
miR-320d SL	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCCTCTCA
miR-320d For	ACACTCCAGCTGGGAAAAGCTGGGTTG
B Actin For	AGTGTGACGTGGACATCCGCA
B Actin Rev	GCCAGGGCAGTGATCTCCTTCT
Universal Reverse	GTCGGCAATTCAGTTGAG

IV. 10. *In silico* дизайн и анализ на праймерни двойки

Дизайна на праймерите за PCR е един от най-важните фактори, чрез който може да се получи амплификация на даден ген и да се избегне образуването на праймерни димери. В настоящата работа беше използван специфичен софтуер за дизайн на праймери, като PrimerExpress® или Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). Тяхната пригодност беше оценена по два критерия: специфичност на биоинформатично предсказания продукт и температура на денатурация на праймерите. Праймерите, които не отговаряха на поставените критерии, не бяха синтезирани.

Дизайнът на праймери за миРНК експресионен анализ е усъществен чрез използването на консенусна секвенция на праймера за копиране на миРНК молекулите (SL миРНК праймер), където последните 8 нуклеотида на праймера комплементират със 3' края на всяка една целева миРНК секвенция

IV. 11. Провеждане на обратна транскрипция на миРНК молекули

Изпълнението на тази задача се налага от невъзможността РНК да бъде амплифицирана директно с метода на полимеразната верижна реакция. Затова е необходимо да се синтезира копи-ДНК от РНК чрез обратна транскрипция.

Използваният кит е Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit на “Thermo scientific”.

За провеждането на реакциите беше използван PCR – апарат 2720 на Applied Biosystems. В ензимната смес (Maxima Enzyme Mix) е включена подобрена обратна транскриптаза (Maxima Reverse Transcriptase), получена след *in vitro* оптимизиране на ензима M-MuLV RT. Модифицираният ензим притежава висока термостабилност и повичена скорост на синтез на копи-ДНК в сравнение с дивия тип M-MuLV RT. В ензимната смес се съдържа още рекомбинантен инхибитор RiboLock™ RNase inhibitor, който ефективно защитава РНК от разграждане от РНК-азите А, В и С, при температура до 55 °С. Oligo(dT)₁₈ праймерите се свързват към поли(А)-опашката на 3' края на информационните РНК. Случайните хексамерни праймери се свързват неспецифично към РНК и служат за синтез на копи-ДНК от всички РНК молекули.

IV. 12. Синтез на копи-ДНК вериги

Реакционните смеси, необходими за реакциите на синтез на копи-ДНК, могат да бъдат приготвени чрез смесване на агентите поотделно за всяка РНК или в обща смес (master mix), съдържаща всички компоненти за реакцията на обратна транскрипция освен РНК матриците.

IV. 13. Преамплификация на получените миРНК специфични копи ДНК молекули

Преамплификацията е често необходима стъпка за генериране на достатъчен брой копия на целеви ДНК молекули които са необходими за прецизна последваща амплификация. Това е особено важно условие за постигане на точни резултати при измерването на началното количество ДНК чрез последващ количествен Real-Time PCR анализ. Преамплификация на копи ДНК молекули специфични за анализирания миРНКи беше проведена с помоща на reqGOLDTaq DNA Polymerase.

IV. 15. Количествен PCR анализ (Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR) на миРНК молекули

IV. 15. I. Провеждане на qRT-PCR (Fermentas SYBR Green PCR Kit/Thermo)

1. Пробите се размразяват, след което се разбъркват внимателно след което се центрофугират за кратко.
2. Компоненти на реакционната смес:

12,5 µl	SYBR Green/ROX qPCR Mix (2x)
0,5 µl	МикроРНК специфичен Прав праймер 10 µM (Forward Primer)
0,5 µl	МикроРНК специфичен универсален Обратен праймер 10 µM (Reverse Primer)
6,5 µl	Вода, свободна от нуклеази, до краен обем 20 µl

Таблица 3. Необходими изходни количества за провеждане на една реакция

3. Сместта се разбърква добре на вортекс след което се центрофугира за кратко.
4. От сместта се добавят по 20 микролитра във всяко кладенче на плаката, където предварително са поставени по 5 микролитра 100X разредена реакционна смес от всички проби за анализ.
5. Добавят се по 5 микролитра матрична копи ДНК от съответната изследвана проба.
6. Компонентите се смесват внимателно с вариопипета като се избягва получаването на мехурчета.
7. Апаратът за RT-PCR се програмира според показаната схема. Плаката се поставя и се дава начало на реакцията. **PCR реакционни условия за SYBR Green (Fermentas)**

Активиране		50° C	2 мин.
Първична денатурация		95° C	10 мин.
40 цикъла	Денатурация	95° C	15 сек.
	Анилинг	60° C	30 сек.
	Елонгация	60° C	30 сек.
Финална елонгация		60° C	2 мин.

IV. 16. Провеждане на обратна транскрипция на протеин-кодиращи гени

Поради невъзможността РНК да бъде директно използвана за амплификация с полимеразна верижна реакция, за PCR анализа е необходимо да се синтезира копи-ДНК от РНК чрез обратна транскрипция. Използван е кит Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit на „Thermo scientific“. За провеждането на реакциите беше използван PCR-апарат 2720 на Applied Biosystems.

Ензимната смес (Maxima Enzyme Mix) съдържа подобрена обратна транскриптаза (Maxima Reverse Transcriptase), получена след *in vitro* подобряване и оптимизация на ензима M-MuLV RT. Ензимът притежава висока термостабилност и повишена скорост на синтез на копи-ДНК в сравнение с дивия тип M-MuLV RT. Обратната транскриптаза Maxima RT показва 50-кратно повишена процесивност и е значително по-устойчива на инхибитори на реакцията като гуанидин и формамид в сравнение с дивия тип ензими. Maxima RT притежава РНК- и ДНК- зависима полимеразна активност, а също и РНК-азна Н активност. Ензимът се характеризира с висока чувствителност и ефективност – осъществява пълен синтез на копи-ДНК за 15 – 30 минути. Ензимната смес освен обратна транскриптаза съдържа и рекомбинантен инхибитор RiboLock™ RNase inhibitor, който ефективно защитава РНК от разграждане от РНК-азите А, В и С, при температури до 55°С.

Oligo(dT)18 праймерите се свързват към поли (А)-опашката на 3' края на информационните РНК.

Необходими изходни количества за провеждане на една реакция.**Реакционен състав:**

4 µl	5 X Реакционна смес за обратна транскрипция (Thermo)
2 µl	Ензим (Maxima Enzyme Mix)
- µl	Тотална РНК (1 pg – 5 µg)
- µl	Вода, свободна от нуклеази до краен обем 20 µl

20 µl **Краен обем**

- 2 Реакционните компоненти се смесват внимателно след което се центрофугират за кратко.
- 3 Инкубиране за 10 минути при 25°C, след което 30 минути при 50°C.
4. Реакцията се прекратява чрез загряване до 85°C за 5 минути.

IV. 18. Провеждане на qRT-PCR (Fermentas SYBR Green PCR Kit (Thermo))

1. Пробите се размразяват, след което се разбъркват внимателно след което се центрофугират за кратко.
2. **Компоненти на реакционната смес:**

12,5 µl	SYBR Green/ROX qPCR Mix (2x)
0,5 µl	Ген специфичен Прав праймер 10 µM (Forward Primer)
0,5 µl	Ген специфичен Обратен праймер 10 µM (Reverse Primer)
6,5 µl	Вода, свободна от нуклеази, до краен обем 20 µl

Таблица 4. Необходими изходни количества за провеждане на една реакция

3. Сместта се разбърква добре на вортекс след което се центрофугира за кратко.
4. От сместта се добавят по 20 μl във всяко кладенче на плаката, където предварително са поставени по 5 μl 100 X разредена реакционна смес от всички проби за анализ.
5. Добавят се по 5 μl матрична копи ДНК от съответната изследвана проба.
6. Компонентите се смесват внимателно с вариопипета като се избягва получаването на мехурчета.
7. Апаратът за RT-PCR се програмира според показаната схема. Плаката се поставя и се дава начало на реакцията.

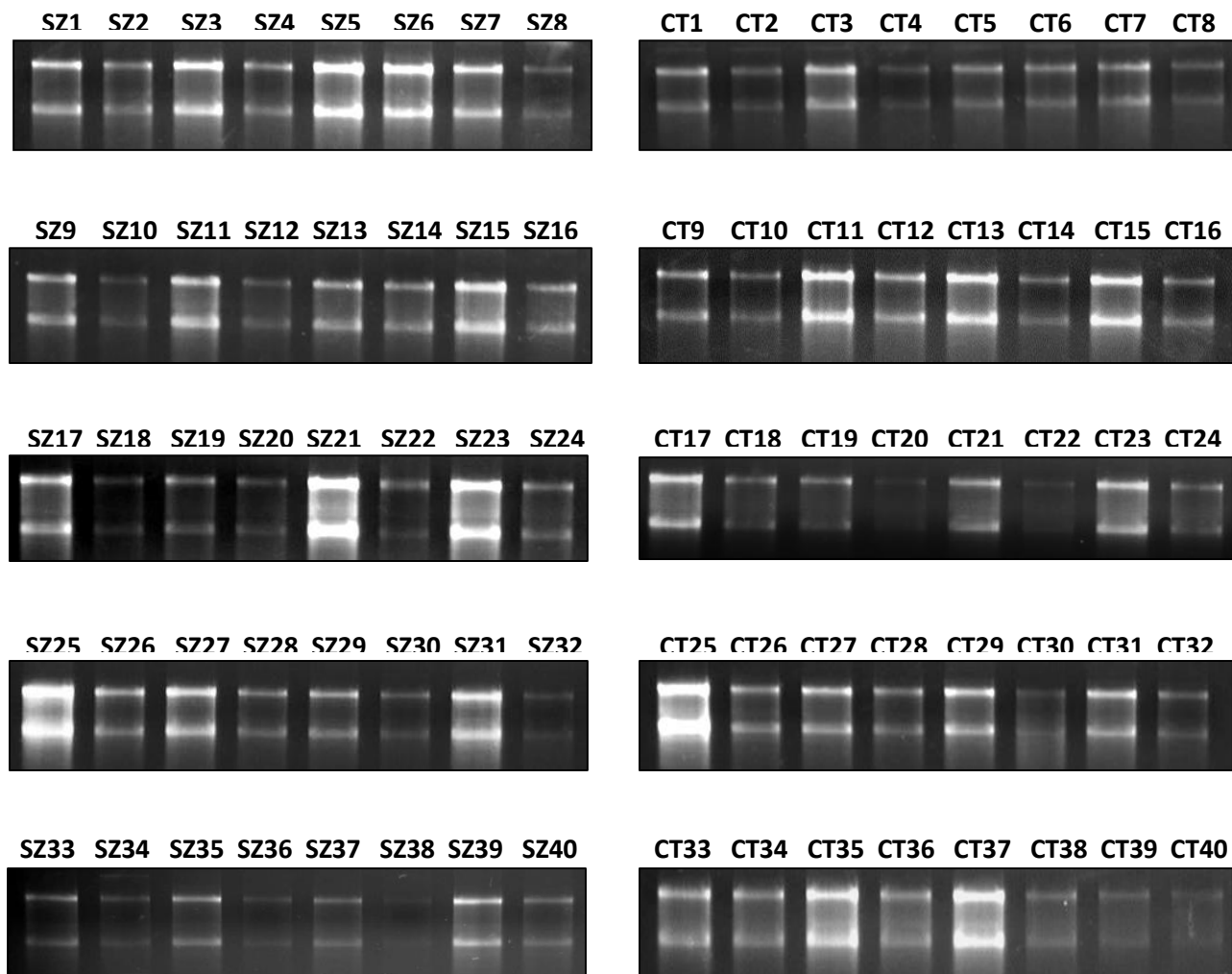
PCR реакционни условия за SYBR Green (Fermentas)

Активиране		50° C	2 мин.
Първична денатурация		95° C	10 мин.
40 цикъла	Денатурация	95° C	15 сек.
	Анилинг	60° C	30 сек.
	Елонгация	60° C	30 сек.
Финална елонгация		60° C	2 мин.

V. Резултати

V. 1. Екстракция на тотална РНК от венозна кръв

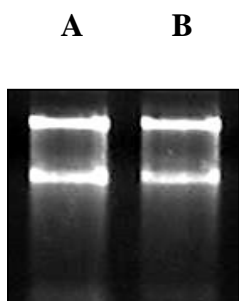
След събирането на венозна кръв в RAXgene RNA Tube и изолирането на тотална РНК, за да бъде оценен интегритета на получените проби, 2 μ l от тях бе електрофоретично анализирана. Агарозна гел-електрофореза на изолираните образци от тотална РНК на пациенти с шизофрения (SZ) и контролна група (CT) е представена на (Фигура 1).



Фигура 1. Агарозна гел-електрофореза на РНК

V. 2. Спектрофотометрично определяне на концентрацията на РНК

Два микролитра от пробите бяха използвани за провеждане на количествен спектрофотометричен анализ. Концентрацията на РНК образците от пациенти с шизофрения варира от 38,4 ng/ μ l до 231,8 ng/ μ l във първо елюиране (в 40 μ l), средно 43,5 ng/ μ l и от 6,7 ng/ μ l до 94,3 ng/ μ l във второто елюиране (в 40 μ l) средно 33,5 ng/ μ l. Концентрациите на пробите от контролните лица варира от 72,1 ng/ μ l до 243,4 ng/ μ l в първо елюиране (в 40 μ l), средно – 83,6 ng/ μ l и от 4,6 ng/ μ l до 84,3 ng/ μ l във второто елюиране (в 40 μ l), средно 31,98 ng/ μ l. Общите данни за изолираната тотална РНК показаха, че е с добро качество и количество за провеждане на заложените в настоящата работа задачи.



Фигура 2. Агарозна гел-електрофореза на създаденият комплексен пул от тотална РНК на изследваните групи (А)шизофрения и (В)контролна група).

V. 3. Сборни РНК проби (пулове) и преципитация на РНК

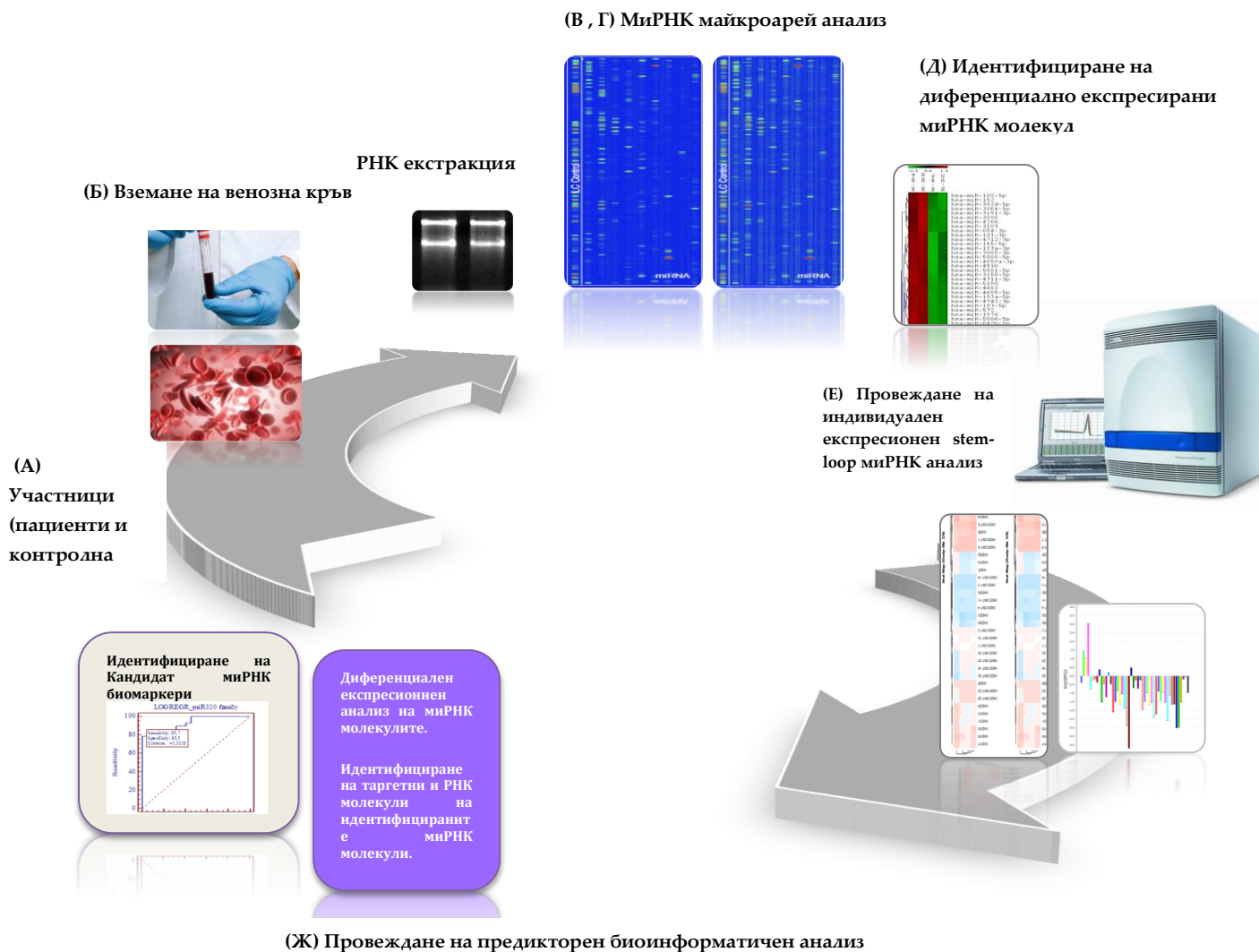
Създаденият пул от тотална РНК показва добър интегритет и количество. Спектрофотометричните измервания на концентрацията на пробите от пациенти с шизофрения и контролната група лица показаха съответно 0,00418 μ g/ μ l и 0,00417 μ g/ μ l, при общо количество от 6 μ g на РНК в комплексните образци. Електрофоретично разделяне на тотална РНК за изследване интегритета на пробите е показано на **Фигура 16**.

V. 4. Извършване на qPCR – базирана контролна детекция за отхвърляне на налична ДНК в изолираните проби от тотална РНК

С цел отстраняване на контаминации от геномна ДНК в пробите от екстрахирана тотална РНК, образците показали наличие на геномна ДНК след проведена PCR контролна детекция бяха третираны с ДНКаза I (Promega), след което отново тествани за присъствието на геномна ДНК.

След проведеното последващо тестване с помощта на qPCR анализ всички РНК проби показаха отсъствие на следи от геномна ДНК и бяха използвани за провеждане на обратна транскрипция за целите на експресионният анализ.

Обща диаграма на провеждане на изследването



Фигура 3. Схематична диаграма на експерименталната постановка на изследването представено в настоящата работа. **А)** Участници (пациенти и контролна група) **Б)** Вземане на венозна кръв **В) Г)** Анализирани на експресионния профил на малки РНК молекули (МикроРНК майкроарей анализ (LC Sciences)) **Д)** Идентифициране на диференциално експресирани миРНК молекули. **Е)** Провеждане на индивидуален експресионен stem-loop миРНК анализ в анализирани групи (пациенти и контролна група). **Ж)** Провеждане на предикторен биоинформатичен анализ за търсене на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули.

V. 5. Анализ на миРНК експресионният профил в периферна кръв чрез миРНК микрочип анализ (LC Sciences)

Проучването на профила от малки РНК молекули (експресионния профил) при шизофрения в периферна кръв показва наличието на специфични промени характерни за болестта което ясно демонстрира възможното използване на периферна кръв за целите на идентифицирането на потенциални биомаркери с прогностични характеристики. Проведеният високопроцесивен миРНК експресионен анализ на 1898 уникални анотирани зрели човешки миРНК последователности (miRBase 18.0), разкри набор от 25 диференциално експресирани миРНК молекули, 14 от които бяха с повишена експресия и 11 с понижена, съответно ($p < 0,05$).

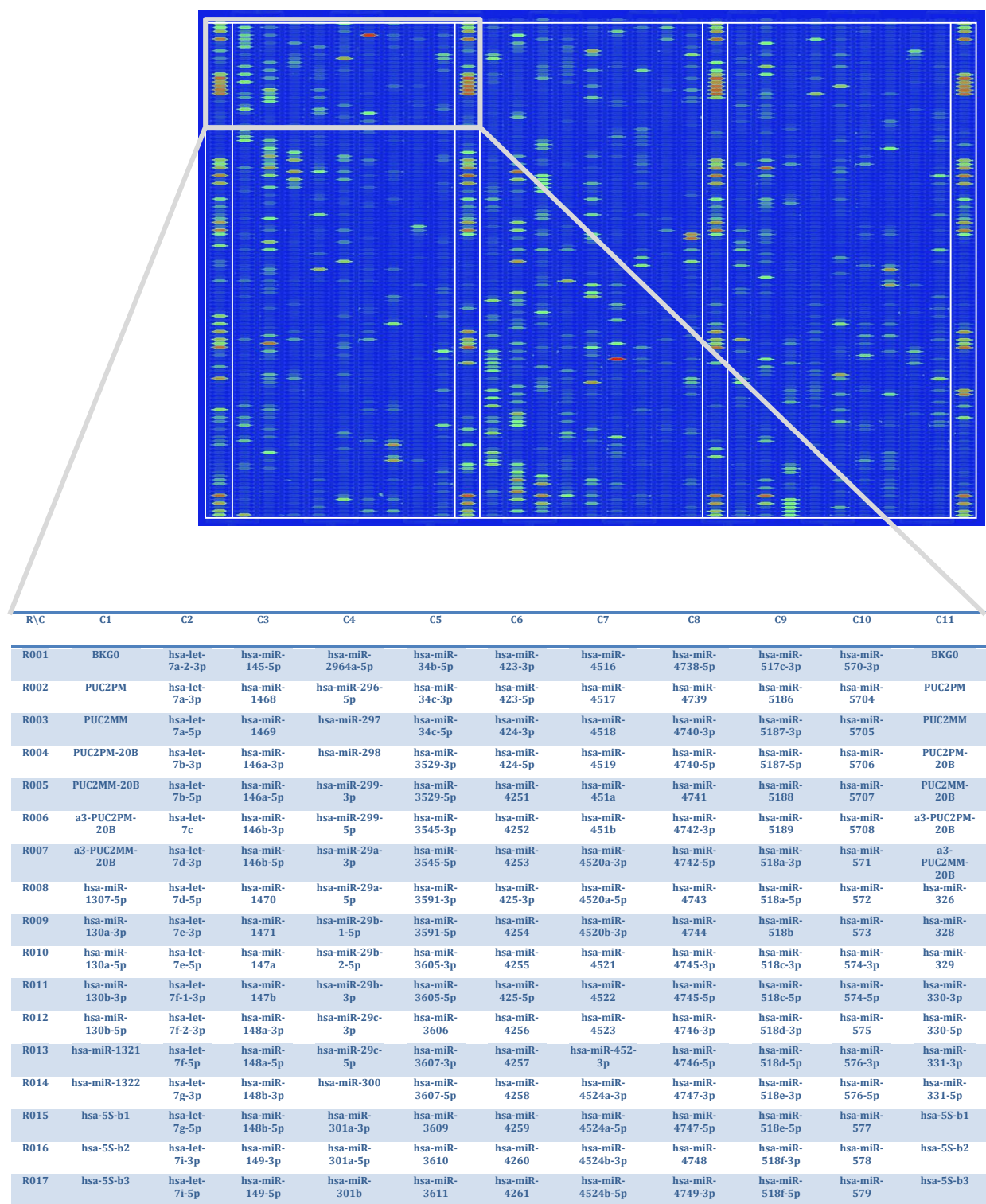
МиРНК молекули със статистически значима промяна с понижена експресия включват: миРНК-183-5p, ($\log_2 - 0,65, p = 0,026$), миРНК-3173-5p, ($\log_2 - 0,85, p = 0,029$), миРНК-125b-5p, ($\log_2 - 0,58, p = 0,033$), миРНК-192-5p, ($\log_2 - 0,47, p = 0,033$), миРНК-1976, ($\log_2 - 0,42, p = 0,033$), миРНК-222-3p, ($\log_2 - 0,29, p = 0,043$), миРНК-4701-3p, ($\log_2 - 0,54, p = 0,044$), миРНК-320a ($\log_2 - 0,39, p = 0,032$), миРНК-320b ($\log_2 - 0,40, p = 0,034$), миРНК-320c ($\log_2 - 0,38, p = 0,0054$), миРНК-320d ($\log_2 - 0,41, p = 0,031$) (Таблица 7 и 9).

Тенденция към повишена експресия (up-регулиране) показват миРНК молекулите: миРНК-4311, ($\log_2 0,96, p = 0,014$), миРНК-4668-5p, ($\log_2 0,38, p = 0,022$), миРНК-421, ($\log_2 -0,30, p = 0,022$), миРНК-4498, ($\log_2 - 0,98, p = 0,027$), миРНК-4691-3p, ($\log_2 - 1,50, p = 0,029$), миРНК-3185, ($\log_2 - 1,01, p = 0,035$), миРНК-4728-5p, ($\log_2 - 0,70, p = 0,037$), миРНК-3184-5p, ($\log_2 - 2,54, p = 0,039$), миРНК-4479, ($\log_2 - 0,32, p = 0,041$), миРНК-30b-3p, ($\log_2 - 1,26, p = 0,041$), миРНК-5010-5p, ($\log_2 - 1,45, p = 0,041$), миРНК-492, ($\log_2 - 1,97, p = 0,042$), миРНК-30d-3p, ($\log_2 - 1,13, p = 0,047$) и миРНК-106a-5p, ($\log_2 - 0,31, p = 0,049$) (Таблица 7 и 9). Всички посочени миРНК молекули демонстрират статистически значима промяна в експресията между групата пациенти с шизофрения спрямо контролна група от здрави лица, резултатите от които са показани на Heat map диаграма (Фигура 19). Проучването е категорично доказателство, че периферната кръв е подходяща и лесно достъпна тъкан (материал) за изучаване на промените в експресия на биомаркери при шизофрено болни.

Проучването е категорично доказателство, че периферната кръв е подходяща и лесно достъпна тъкан (материал) за изучаване на променената експресия на биомаркери при шизофрено болни.

На **Фигура 4** е представени изображение получено от визуализация на чипа. От Су5 изображенията могат пряко да се наблюдават миРНК експресионните профили. Изображенията се показват в софтуерно генерирани цветове, с цел да се разшири визуално динамичният обхват. В изображенията, интензитета на сигнала се увеличава от 1 до 65,535 на съответните промени в цвета от синьо до зелено, към жълто, до червено.

Фигура 4. Сканирано микрочипово изображение (Chip: 01_H18_120322-0320-SZ-420 Су5: SZ) Показан е регион от чипа със съответното покритие от миРНК проби (сонди).



Rpter Index	Reporter Name	p-value	Контролна група		Пациенти		Log2 (G2/G1)
			Mean	StDev	Mean	StDev	
593	hsa-miR-320c	5.44E-03	11,298	32	8,661	13	-0.38
912	hsa-miR-4311	1.46E-02	297	6	578	1	0.96
1156	hsa-miR-4668-5p	2.27E-02	412	5	536	3	0.38
843	hsa-miR-421	2.27E-02	492	2	608	6	0.30
266	hsa-miR-183-5p	2.68E-02	1,466	25	935	19	-0.65
1029	hsa-miR-4498	2.78E-02	1,814	12	3,573	148	0.98
550	hsa-miR-3173-5p	2.94E-02	712	20	396	11	-0.85
1188	hsa-miR-4691-3p	2.97E-02	188	12	531	15	1.50
594	hsa-miR-320d	3.14E-02	9,805	179	7,371	59	-0.41
591	hsa-miR-320a	3.26E-02	11,789	111	8,987	155	-0.39
103	hsa-miR-125b-5p	3.35E-02	2,822	55	1,890	43	-0.58
297	hsa-miR-192-5p	3.37E-02	5,263	74	3,790	76	-0.47
314	hsa-miR-1976	3.39E-02	689	13	516	5	-0.42
592	hsa-miR-320b	3.41E-02	11,079	11	8,420	175	-0.40
566	hsa-miR-3185	3.55E-02	1,646	66	3,326	128	1.01
1252	hsa-miR-4728-5p	3.74E-02	915	35	1,491	19	0.70
565	hsa-miR-3184-5p	3.93E-02	93	14	541	23	2.54
1008	hsa-miR-4479	4.14E-02	926	19	1,156	1	0.32
458	hsa-miR-30b-3p	4.18E-02	506	39	1,210	29	1.26
1427	hsa-miR-5010-5p	4.19E-02	199	7	542	47	1.45
1390	hsa-miR-492	4.29E-02	280	20	1,094	118	1.97
377	hsa-miR-222-3p	4.37E-02	3,190	61	2,601	14	-0.29
1205	hsa-miR-4701-3p	4.40E-02	753	24	517	9	-0.54
465	hsa-miR-30e-3p	4.77E-02	660	33	1,450	96	1.13
29	hsa-miR-106a-5p	4.91E-02	8,479	136	10,51	181	0.31

9

Таблица 7. Диференциално експресирани миРНК молекули при шизофрения със сигнал >500.



Фигура 5. Heat map диаграма на диференциално експресирани миРНК молекули в сборни проби от пациенти с шизофрения в сравнение с контролна група от здрави индивиди, установено чрез паралелен майкроарей експресионен анализ на миРНК молекули (LC Sciences).

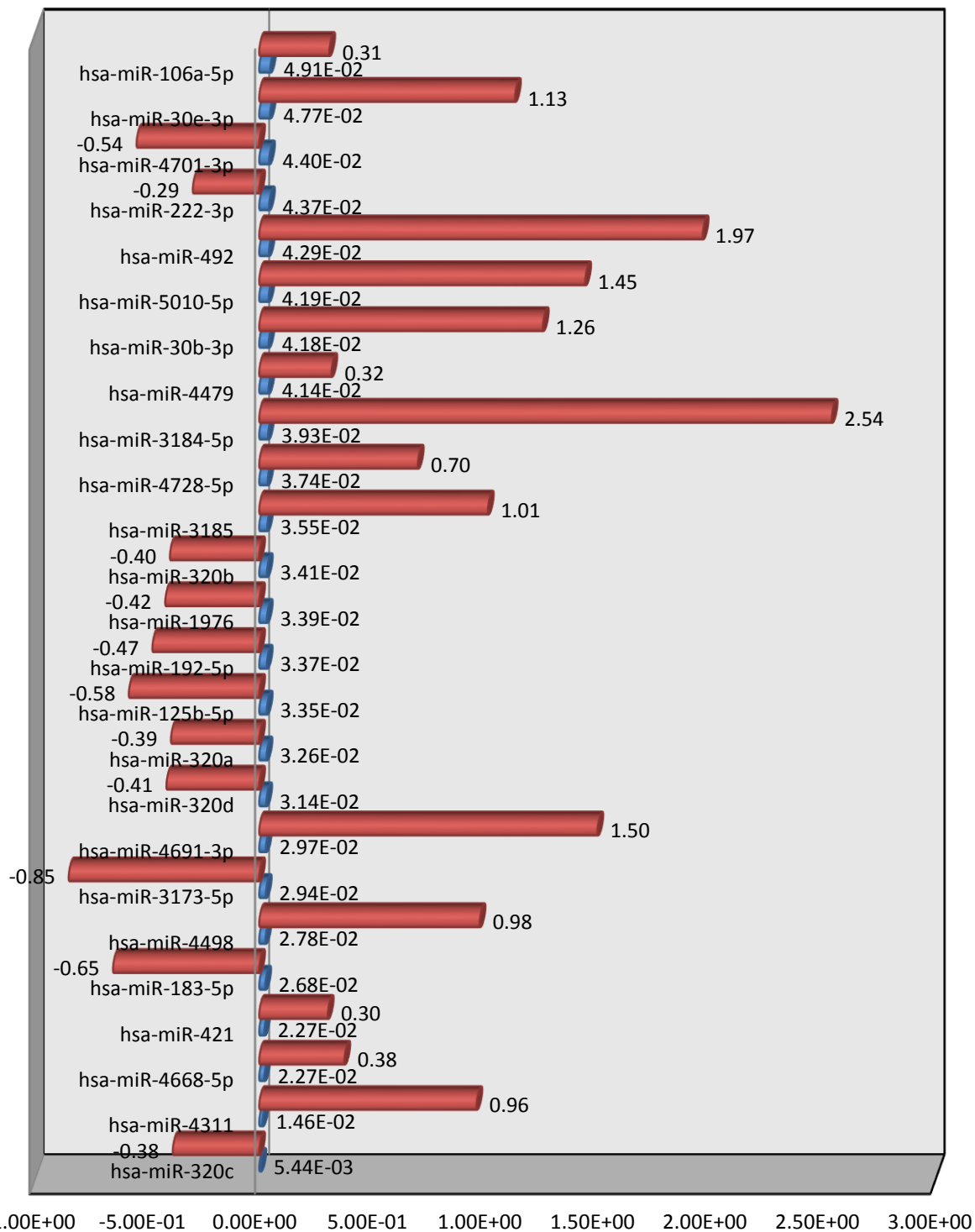


Таблица 8. Промяна в експресията на миРНК молекули със сигнал >500

Rpter Index	Reporter Name	p-value	Mean	StDev	Mean	StDev	Log2 (G2/G1)
349	hsa-miR-2113	2.19E-04	0	0	39	0	11.93
750	hsa-miR-371a-5p	1.29E-03	209	0	136	0	-0.62
122	hsa-miR-1272	7.90E-03	0	0	33	5	11.69
1204	hsa-miR-4700-5p	9.32E-03	202	2	107	1	-0.91
816	hsa-miR-3936	1.42E-02	24	0	63	2	1.39
858	hsa-miR-4258	1.42E-02	238	4	461	7	0.95
1175	hsa-miR-4682	1.59E-02	48	0	28	1	-0.75
1565	hsa-miR-548ap-5p	1.87E-02	14	1	82	5	2.56
1696	hsa-miR-572	1.93E-02	231	1	177	2	-0.39
1731	hsa-miR-601	2.06E-02	413	0	302	4	-0.45
1180	hsa-miR-4685-5p	2.30E-02	180	0	122	2	-0.56
906	hsa-miR-4305	2.31E-02	22	0	47	2	1.07
1069	hsa-miR-4524a-3p	2.59E-02	67	1	126	4	0.92
847	hsa-miR-424-3p	2.66E-02	237	3	306	3	0.37
935	hsa-miR-433	2.67E-02	25	1	63	1	1.35
1667	hsa-miR-5685	2.67E-02	20	1	59	1	1.54
313	hsa-miR-197-5p	2.74E-02	390	8	277	2	-0.49
1627	hsa-miR-558	2.81E-02	54	1	35	0	-0.61
1272	hsa-miR-4742-3p	2.82E-02	337	1	221	6	-0.61
299	hsa-miR-193a-5p	3.15E-02	367	1	248	7	-0.57
1235	hsa-miR-4719	3.55E-02	274	3	146	7	-0.91
1773	hsa-miR-637	3.58E-02	36	1	48	0	0.39
196	hsa-miR-138-1-3p	3.76E-02	90	1	82	0	-0.14
1781	hsa-miR-642b-5p	3.76E-02	51	2	30	1	-0.78
28	hsa-miR-106a-3p	3.79E-02	207	4	352	14	0.77
52	hsa-miR-1204	3.84E-02	36	1	215	32	2.58
1416	hsa-miR-5006-5p	3.89E-02	383	11	259	5	-0.56
918	hsa-miR-431-5p	4.03E-02	23	2	62	1	1.43
1419	hsa-miR-5008-3p	4.37E-02	103	1	54	3	-0.95
1081	hsa-miR-4531	4.45E-02	56	4	23	1	-1.29
485	hsa-miR-3127-5p	4.69E-02	20	1	34	0	0.80
1796	hsa-miR-654-3p	4.76E-02	346	7	289	0	-0.26
1220	hsa-miR-4711-3p	4.85E-02	47	3	17	2	-1.45
1789	hsa-miR-648	4.91E-02	48	1	23	2	-1.05
1292	hsa-miR-4755-5p	4.98E-02	108	0	79	3	-0.45

Таблица 9. Диференциално експресирани миРНК при шизофренна група със сигнал <500.

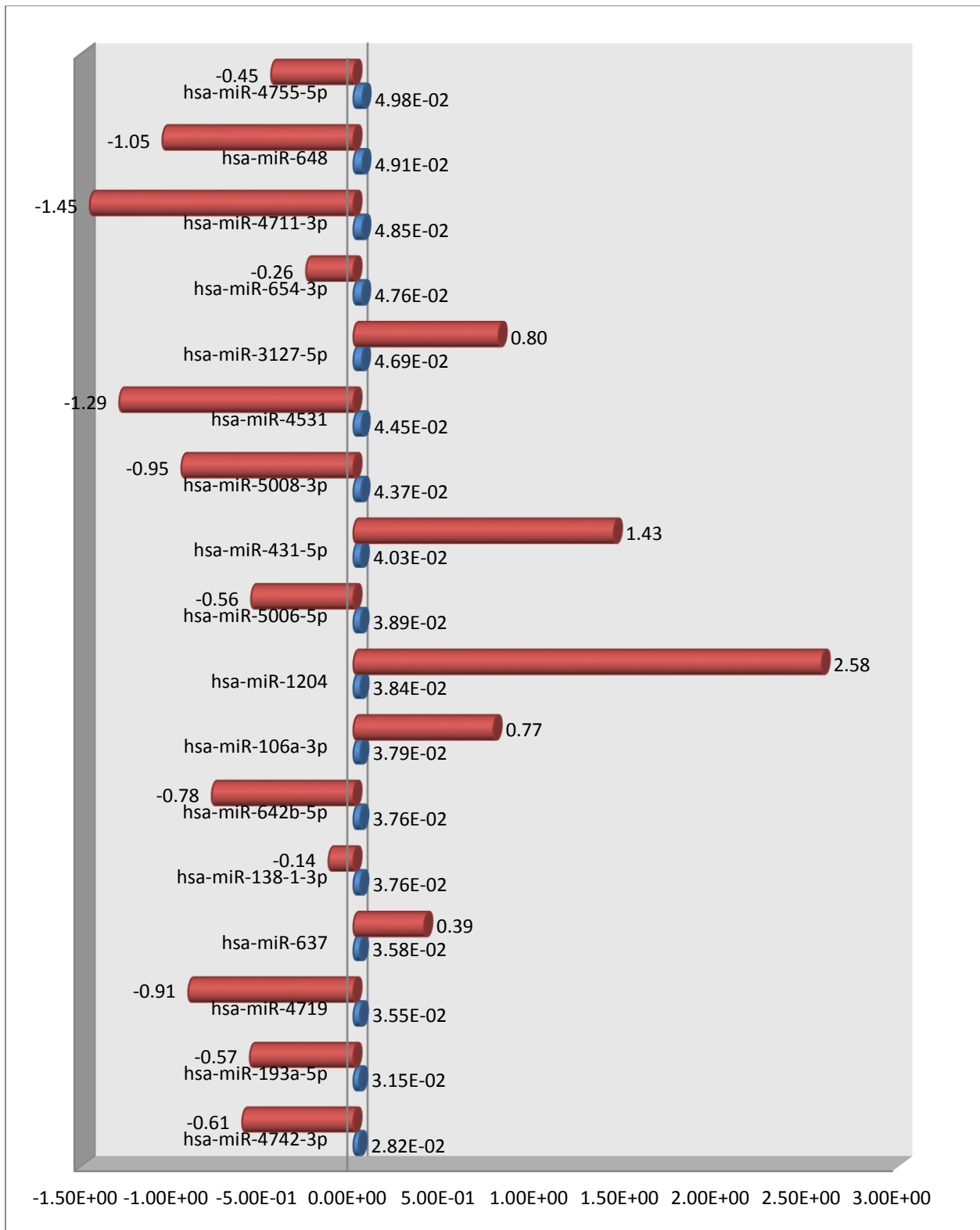


Таблица 10. Диференциално експресирани миРНК при шизофренна група със сигнал < 500 .

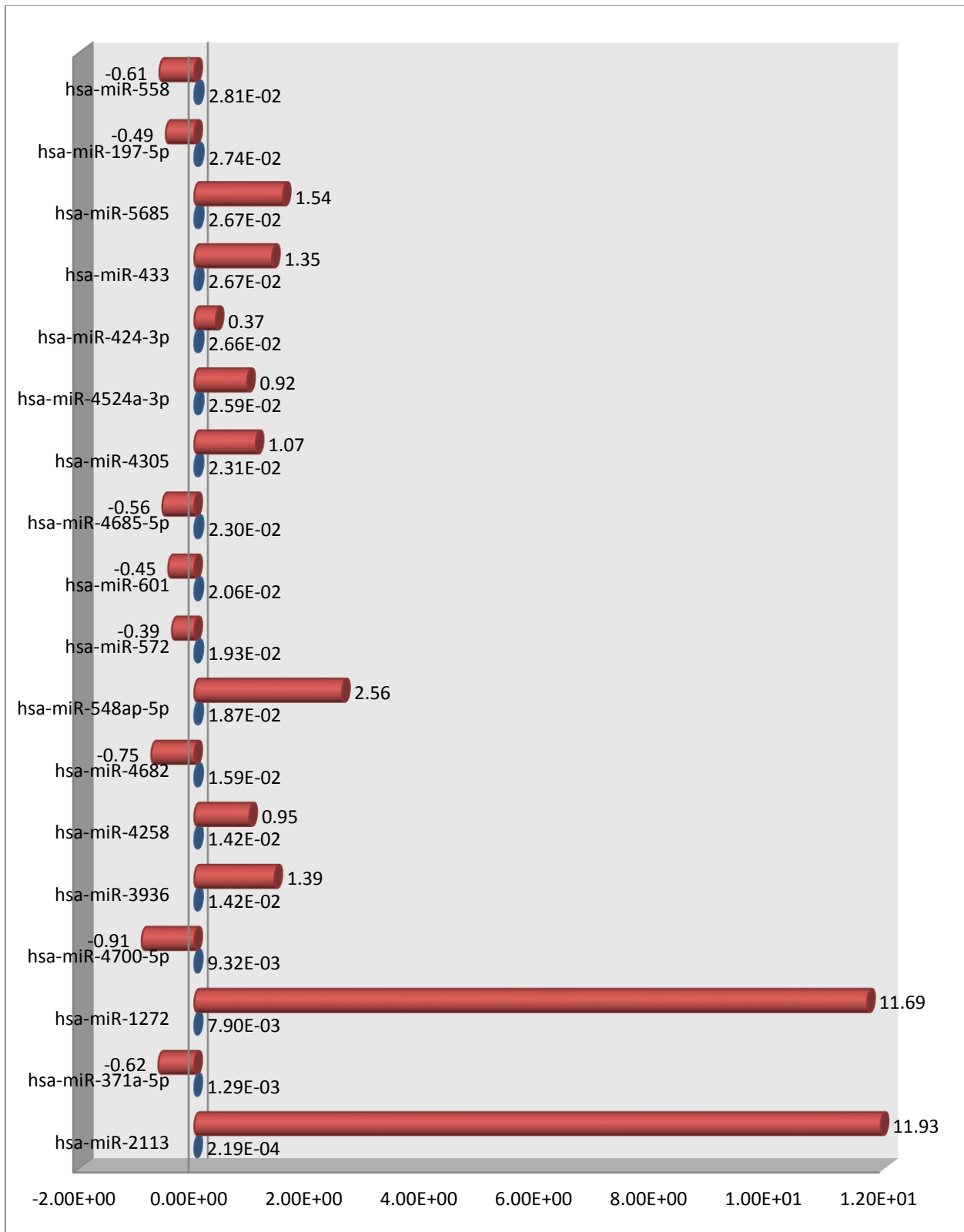


Таблица 11. Диференциално експресирани миРНК при шизофренна група със сигнал < 500 .

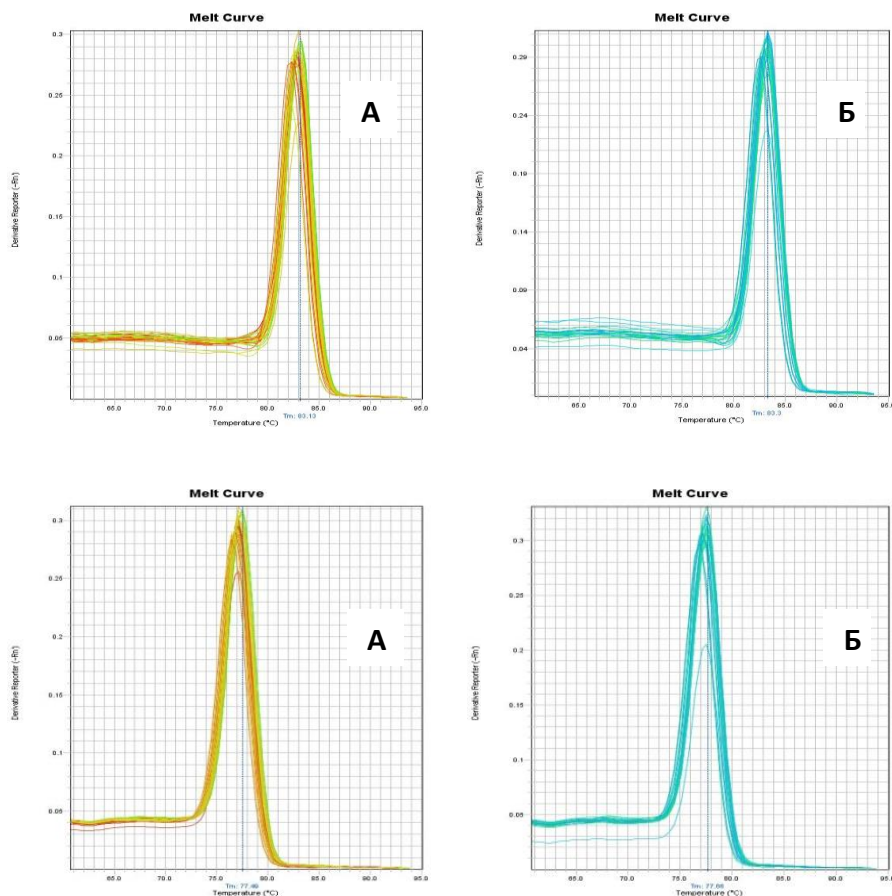
V. 6. Количествен PCR анализ (*Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR*) на експресия на миРНК транскрипти при пациенти с шизофрения в сравнение с контролна група

За изследване на експресията на индивидуални миРНК молекули, беше използван Stem-loop qRT-PCR анализ. МиРНК специфични кДНК бяха синтезирани от 1 µg тотална РНК, използвайки RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*Thermo Fisher Scientific*) и миРНК-специфични stem-loop праймерни двойки. Количество от 5 µl синтезирана кДНК бяха използвани за предварителна амплификация преди провеждането на qPCR анализа, за потенциално увеличаване на чувствителността на теста. qRT-PCR анализът беше проведен, използвайки SYBR Green Maxima qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*) с ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystems*).

Всички PCR реакции бяха проведени в две технически повторения в 96 местни плаки в присъствието на отрицателна контрола (реакция с отсъствието на матрица), които бяха включени във всеки експеримент, за да се изключи всяко възможно замърсяване. Относителните нива на експресия бяха определени използвайки *Actin-B*, като ендогенна контрола, използвана за изчисляване на промените в миРНК експресията с $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода.

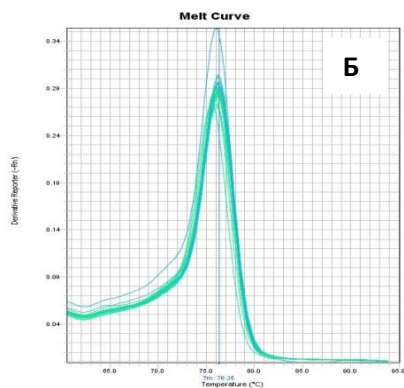
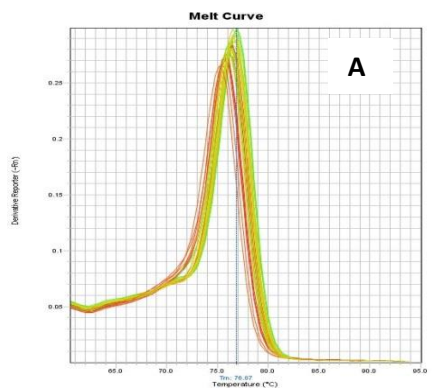
V. 7. Анализ на кривите на денатурация (*Melting curve analysis*)

Анализът на кривите на денатурация от проведените qPCR експерименти демонстрира висока специфичност на амплификация получена с праймерините двойки използвани за анализ на кандидат миРНК молекулите и ензимът участващ в тяхната биогенеза, *DICER1*. При всички миРНК и *DICER1* беше наблюдаван отчетлив пик в кривите на денатурация, което еднозначно говори за специфичността на получените миРНК ампликони. Наличието на специфични ампликони отговарящи на *B-actin* референтният ген, също беше потвърдено чрез проследяване на кривите на денатурация.

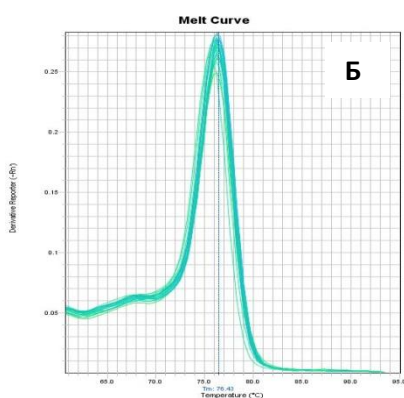
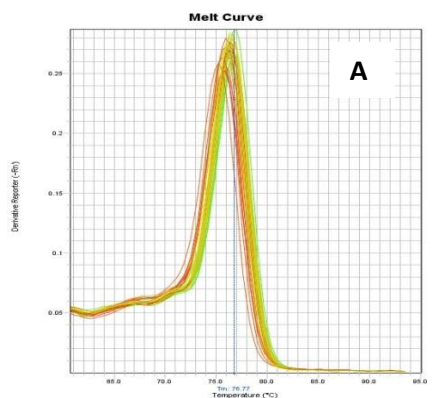


Фигура 20А. Криви на денатурация на *B-actin* специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(83\pm 0,3^\circ\text{C})$ При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).

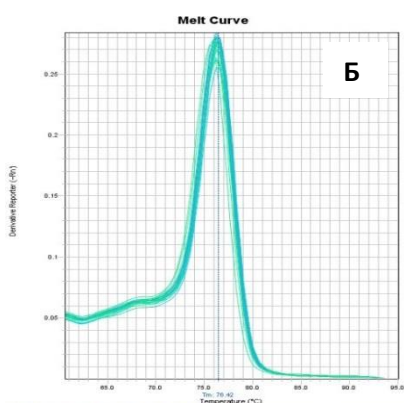
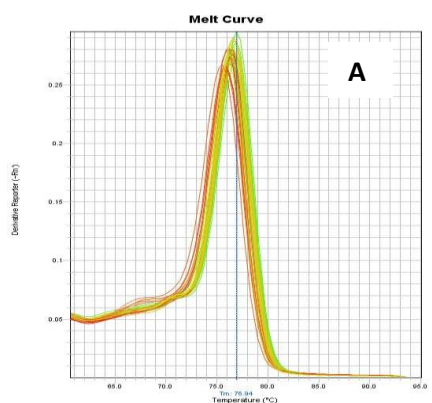
Фигура 20А. Криви на денатурация на *DICER1* специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(77\pm 0,1^\circ\text{C})$ При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



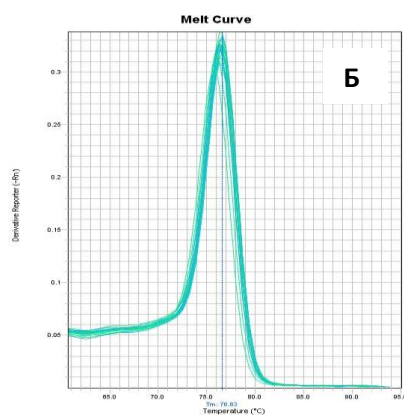
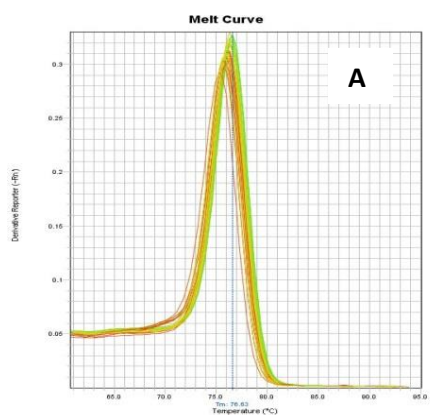
Фигура 20Б. Криви на денатурация на миРНК-320b специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(77\pm 0,5^\circ\text{C})$. При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



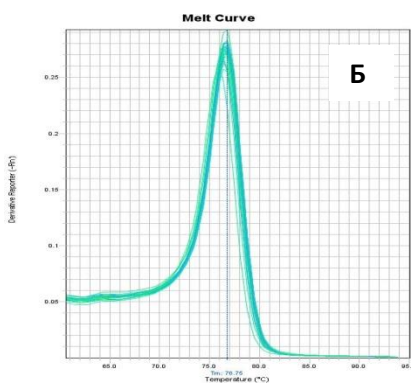
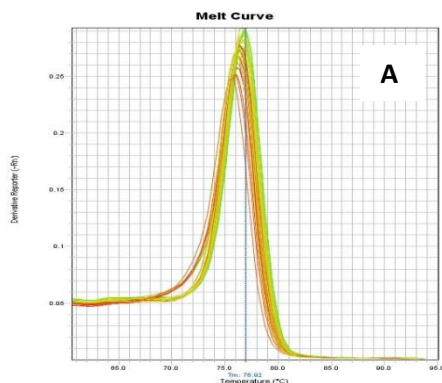
Фигура 20Б. Криви на денатурация на миРНК-320c специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(76,5^\circ\text{C})$. При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



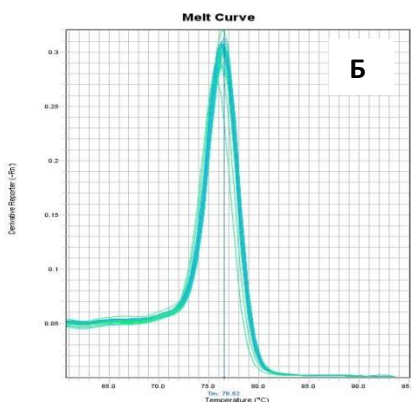
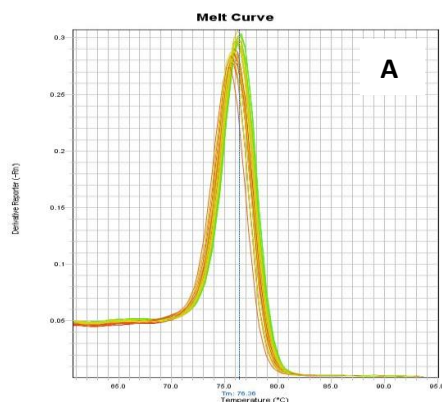
Фигура 20Б. Криви на денатурация на миРНК-320d специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(77\pm 0,3^\circ\text{C})$. При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



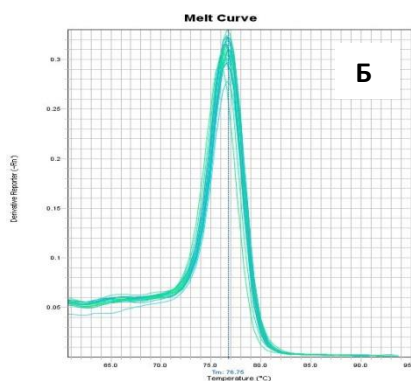
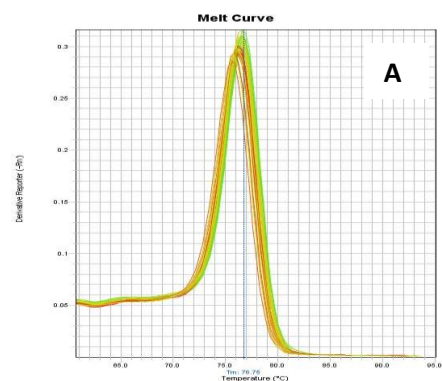
Фигура 20Б. Криви на денатурация на миРНК-320a специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(76,6^\circ\text{C})$ При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



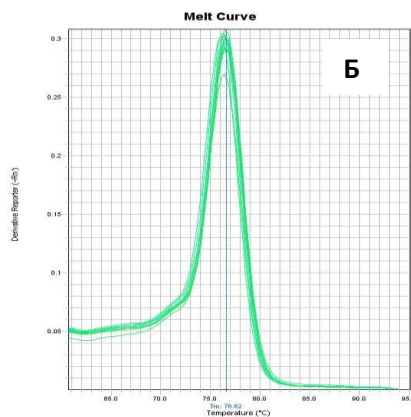
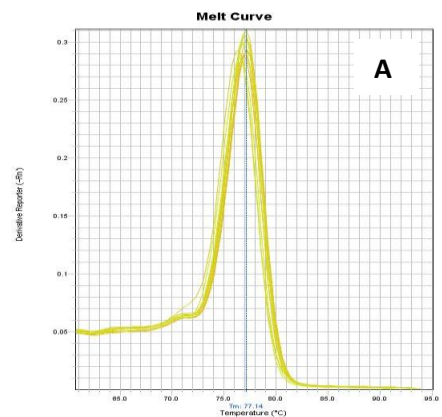
Фигура 20В. Криви на денатурация на миРНК-222-3r специфичени ампликони показващи пикове на денатурация при $(76\pm 1^{\circ}\text{C})$ При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



Фигура 20В. Криви на денатурация на миРНК-106a-5p специфичени ампликони показващи пикове на денатурация при $(76\pm 1^{\circ}\text{C})$ При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



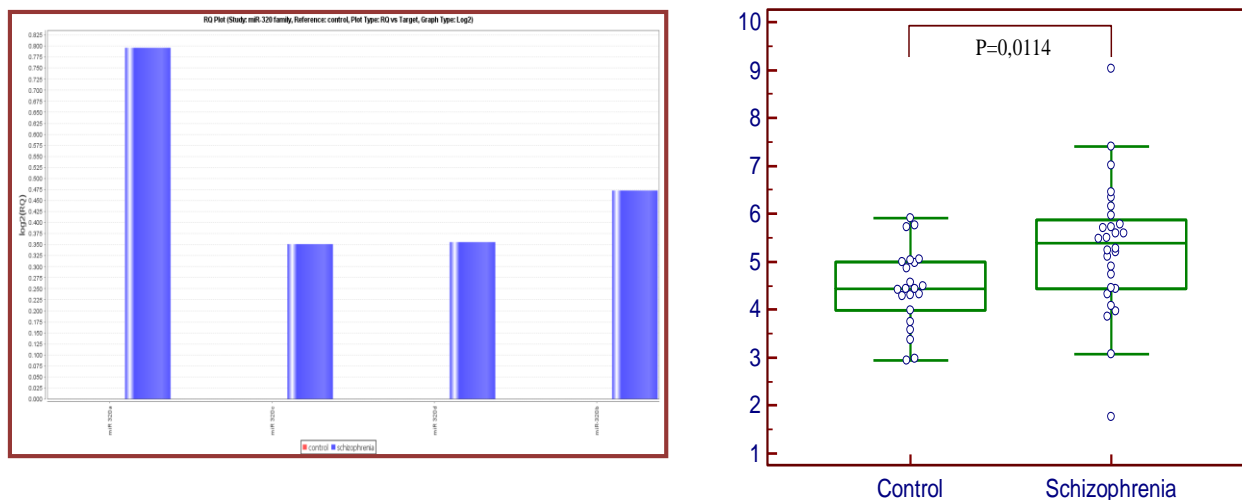
Фигура 20В. Криви на денатурация на миРНК-192-5p специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(76,7^{\circ}\text{C})$ При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).



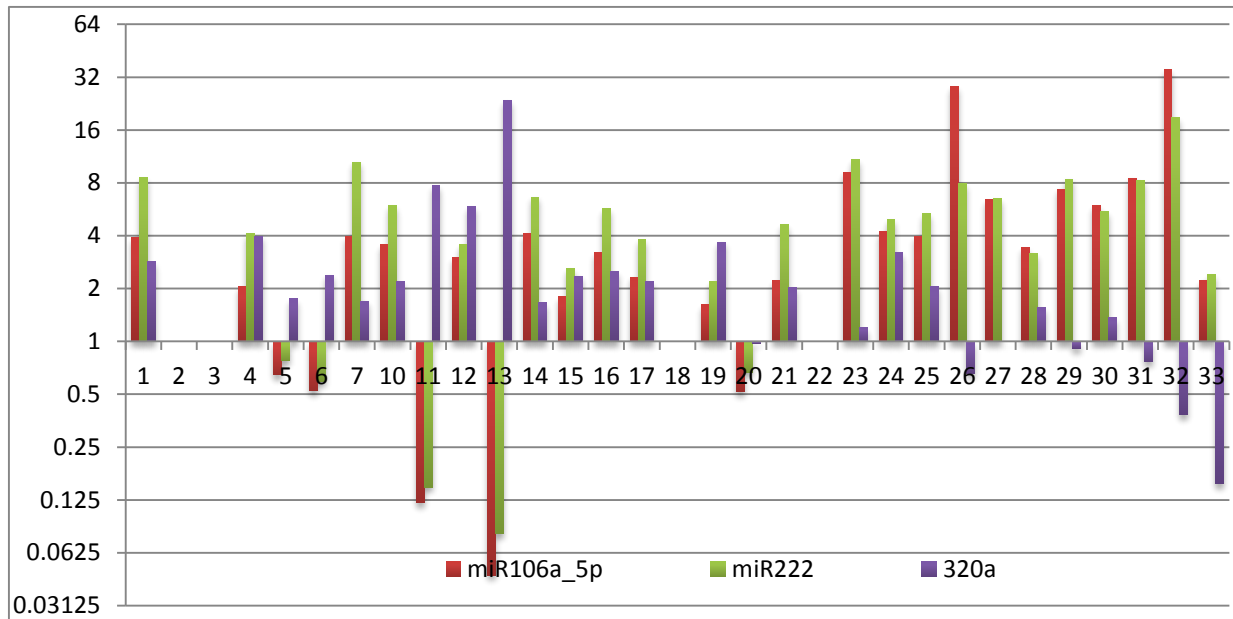
Фигура 20В. Криви на денатурация на миРНК-320a специфични ампликони показващи пикове на денатурация при $(75,5\pm 1^{\circ}\text{C})$. При шизофренно болни (А) и контролна група (Б).

С цел да бъдат анализирани нивата на експресия на кандидат миРНК молекули в групата на пациентите с шизофрения, получените средни стойности за всички миРНК молекули в контролната група бяха приравнени към нула, а тези в групата от пациенти с шизофрения бяха приведени към тях.

Относителният количествен анализ на миРНК молекулите миРНК-320с, миРНК-320d и миРНК-320b показва промяна в експресията, но проведеният статистически анализ не показва статистически значима промяна в средната стойност на експресията в извадката от пациенти с шизофрения в сравнение с контролната група от здрави лица (**Фигура 21**).



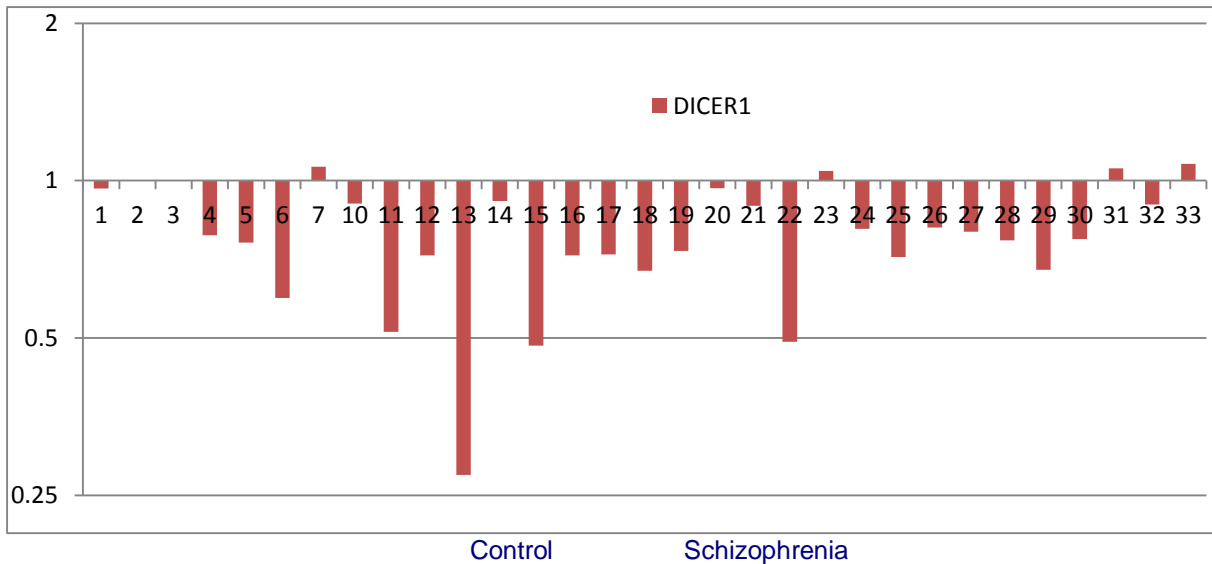
Фигура 21. Количествен PCR анализ на представителите на миРНК-320 семейството в периферна кръв при пациенти с шизофрения спрямо контролната група от здрави индивиди. Относителното ниво на експресия на представителите на миРНК-320 семейството (микро-320a, \log_2 (RQ) = 0,79), микро-320c (\log_2 (RQ) = 0.35), микро-320d (\log_2 (RQ) = 0.35) и микро-320b (\log_2 (RQ) = 0.47), е показано съответно (лява диаграма). Бокс диаграма на миРНК-320a експресията (дясна диаграма), показваща повишаване на експресията на миРНК-320a при пациенти с шизофрения, в сравнение с контролни лица, със статистическа разлика между групите ($p = 0,0114$).



Фигура 22. Асоциирана с шизофрения миРНК експресия. Статистически значима промяна в експресията е наблюдавана при 3 от анализираниите миРНК молекули (миРНК-320а, миРНК-106а-5р и миРНК-222-3р). Резултатите са получени с помощта на миРНК специфичен stem-loop qRT-PCR анализ. На диаграмата са показани резултатите за относителната експресия (RQ) представена чрез логаритмична трансформация (\log_2). Резултатите са получени при сравнението на 33 пациента и 25 контролни лица.

При 5 от пациентите с шизофрения беше също наблюдавано понижена експресия на за миРНК-222-3р, докато при всички останали 28 пациента миРНК-222-3р показва повишена експресия. Разлика в експресията на миРНК-320а беше наблюдавана също при 5 пациента които показват различие от общата тенденция (**Фигура 22**).

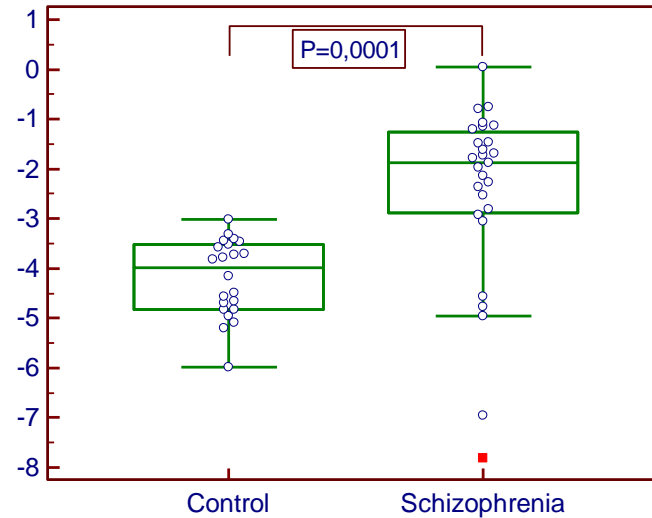
Интересно е да се отбележи и факта, че промяна, различна от общата тенденция и за две от диференциално експресирани миРНК молекули (миРНК-106а-5р и миРНК-222-3р) беше наблюдавана в идентични пациенти. представени на **Фигура 22** (Проби 5, 6, 11, 13, 20).



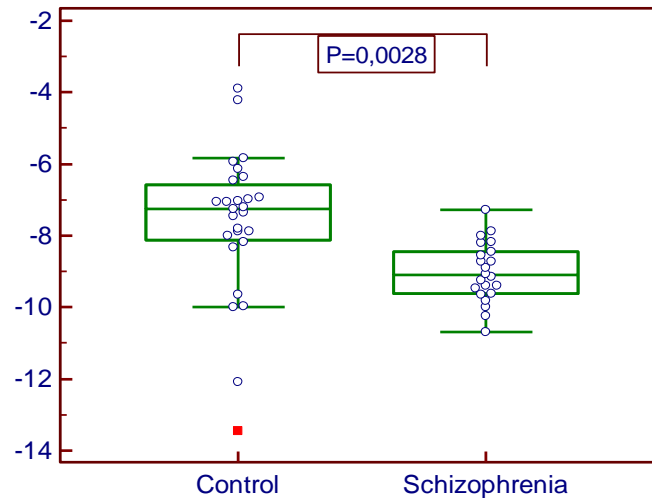
Фигура 23 Асоциирана с шизофрения *DICER1* експресия. Индивидуален анализ на относителното ниво на експресия на иРНК на *DICER1* гена в периферна кръв при пациенти с шизофрения спрямо контролна група от здрави индивиди. На диаграмата са показани резултатите за относителната експресия (RQ) представена чрез логаритмична трансформация (\log_2).

Изследването на експресията на иРНК на *DICER1* беше проведено върху 31 пациента с шизофрения. При сравнение на нивата на експресията на *DICER1* между пациенти с шизофрения и контролна група от здрави индивиди беше установено, че относителното ниво на експресия при шизофрения е по-ниско в сравнение с експресията му при здрави лица. Наблюдавана беше статистически значима промяна в експресията на *DICER1* ($p = 0,0001$), което насочва вниманието върху гена, като евентуална причина за наблюдаваната дисрегулация на миРНК молекули. Данните от проведените анализ са представени на **Фигура 23**. Единствено при 4 от пациентите с диагноза шизофрения беше наблюдавана повишена експресия на иРНК на *DICER1*, докато при всички останали пациенти експресията беше понижена, което отразяваше общата тенденция на промяна.

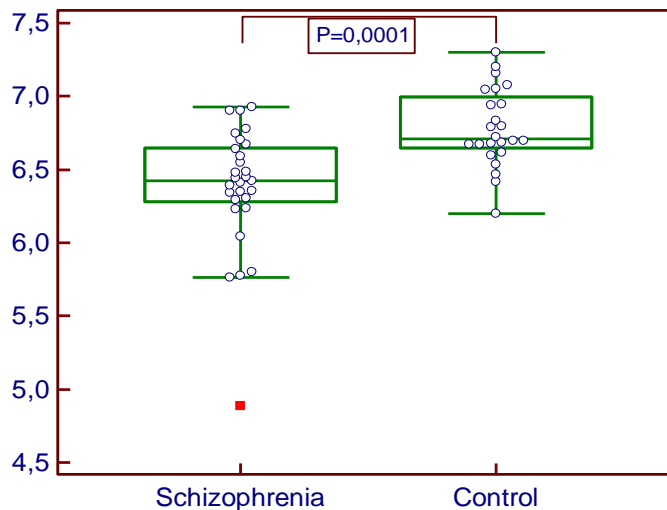
Данните в научната литература относно експресията на *DICER1* са противоречиви *Beverige* и *Santarelli* демонстрират повишена експресия в DLPC при шизофрения, което се потвърждава от разработките на *Sanders* и колектив.



Фигура 24. Относително ниво на експресия на миРНК 222-3р в периферна кръв при пациенти с шизофрения спрямо контролната група от здрави индивиди. Бокс плот диаграмата на експресията, показва понижена експресия на миРНК 222-3р при пациенти с шизофрения.



Фигура 25. Относително ниво на експресия на миРНК 106а-5р в периферна кръв при пациенти с шизофрения спрямо контролната група от здрави индивиди. Бокс плот диаграмата на експресията, показва понижена експресия на миРНК 106а-5р при пациенти с шизофрения.



Фигура 26. Относително ниво на експресия на мРНК на гена *DICER1* в периферна кръв при пациенти с шизофрения спрямо контролната група от здрави индивиди. Бокс плот диаграмата на *DICER1* експресията, показва понижаване при пациенти с шизофрения, в сравнение с контролна група индивиди.

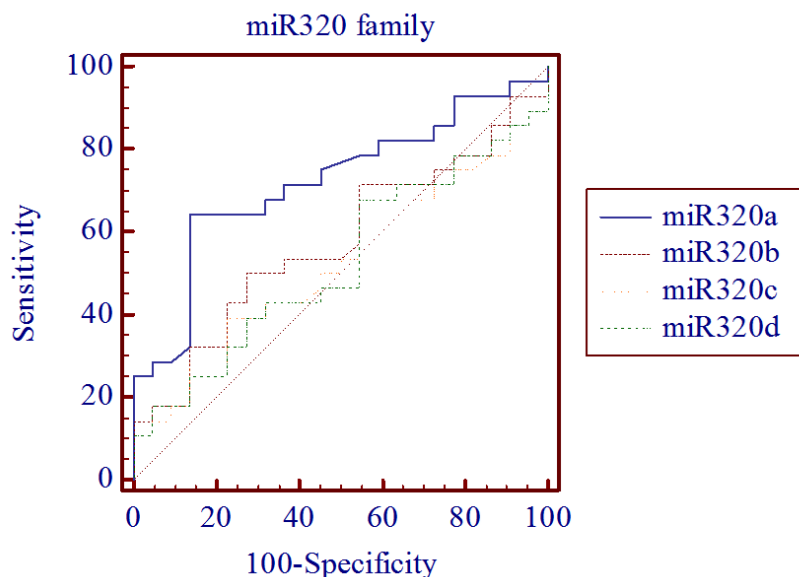
V. 8. Анализ на ROC (receiver operating characteristic) кривите за определяне на диагностична точност на изследваните миРНК биомаркери при шизофрения

С цел оценка на потенциала на анализираниите миРНК молекули в периферна кръв като потенциални биомаркери при шизофрения, беше извършен ROC (receiver operating characteristic) анализ на данни получени от проведените qRT-PCR анализи. Построени бяха ROC криви за миРНК молекулите, които показали статистически значима промяна в експресията и площта под кривата беше изчислена (AUC) за всяка една от тях. Данни от ROC анализ за оценка на чувствителността и специфичността бяха получени за всички миРНК молекули.

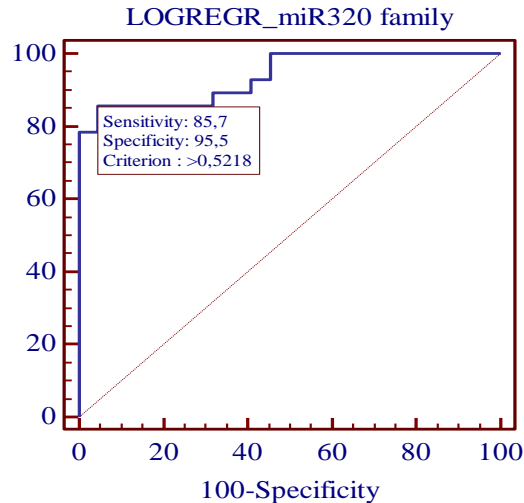
Диагностичната чувствителност на миРНК-320a, миРНК-320b, миРНК-320c и миРНК-320d, за шизофрения са 64,3%, 50,0%, 39,3% и 67,9%, съответно. Специфичност беше оценена на 86,4%, 72,7%, 77,3% и 45,5%, със площ под ROC кривата както следва за миРНК-320a (AUC = 0,722, 95% CI: 0,577 - 0,839), миРНК-

320b (AUC = 0,574, 95% CI: 0,426 - 0,713), miРНК-320c (AUC 0,529, 95% CI: 0,383 - 0,672), и miРНК-320d, който получава, (AUC 0,524, 95% CI: 0,378 - 0,667) (Фигура 27). Диагностичната чувствителност на miРНК-106-5p беше определена на (70,4%) със съответна специфичност оценена на 95,5 % и площ под ROC кривата (95% CI) 0,805 (0,667 - 0,904) (Фигура 29).

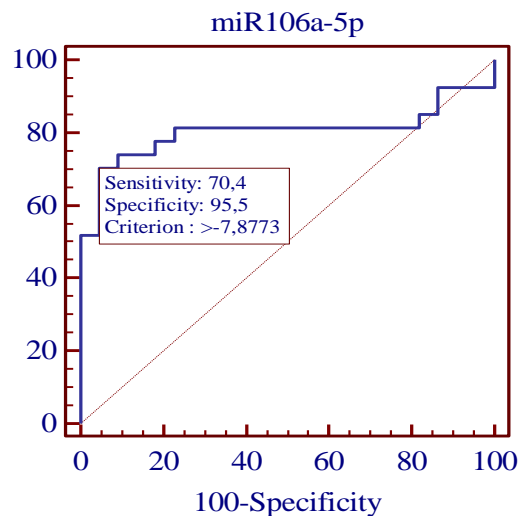
От получените данни става ясно, че комплексната характеристика на няколко miРНК молекули като потенциални биомаркери при шизофрения показва по добри предиктивни характеристики в сравнение с използването на единични такива. Като например при използването на miРНК 320 семейството (Фигура 28) и диференциално експресираниите miРНК-222-3p, miРНК-106-5p и miРНК-320a, като класификатори. Диагностичната чувствителност на комбинираните класификатори беше определена на 81,5% със съответна специфичност от 100%. Получени бяха ROC криви с изчислена адитивна площ под кривата (AUC = 0,909) При ниво на значимост $p < 0,0001$. (Фигура 31).



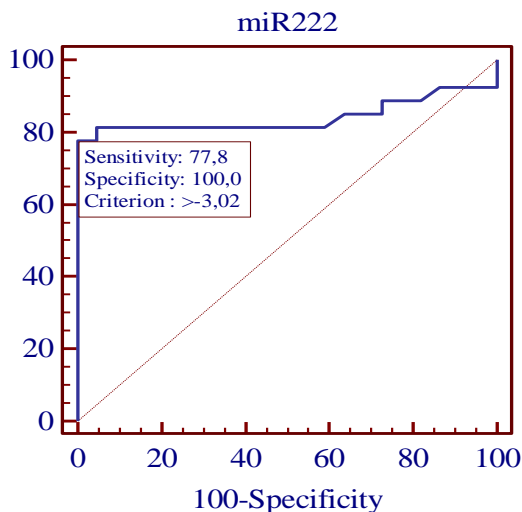
Фигура 27. Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с шизофрения от здрави контроли с представители на микро-320 семейството като класификатори. Пунктираната линия представлява произволна класификационна точност (AUC 0.5). Получени бяха ROC криви и изчислена площ под кривата както следва за представителите на miРНК 320 семейството.



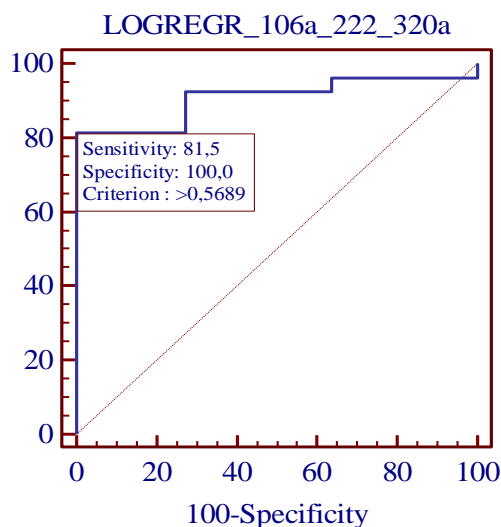
Фигура 28. Анализ на ROC кривите на диференцирано експресирани членове на миРНК-320 семейството (миРНК-320а, миРНК-320b, миРНК-320с и миРНК-320d). Диагоналната линия представлява произволна класификационна точност (AUC 0.5). Диагностичната чувствителност на комбинираните класификатори беше определена на 85,7% със съответна специфичност от 95,5%.



Фигура 29. Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с шизофрения от здрави контроли на база на миРНК-106-5p като класификатор. Пунктираната линия представлява произволна класификационна точност (AUC 0.5). Получени бяха ROC криви и изчислена площ под кривата за миРНК-106-5p (AUC = 0,805). При ниво на значимост $p < 0,0001$.



Фигура 30. Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с шизофрения от здрави контроли на база на миРНК-222-3р като класификатор. Пунктираната линия представлява произволна класификационна точност (AUC 0.5). Получени бяха ROC криви и изчислена площ под кривата за миРНК-222 (AUC = 0,843). При ниво на значимост $p < 0,0001$.



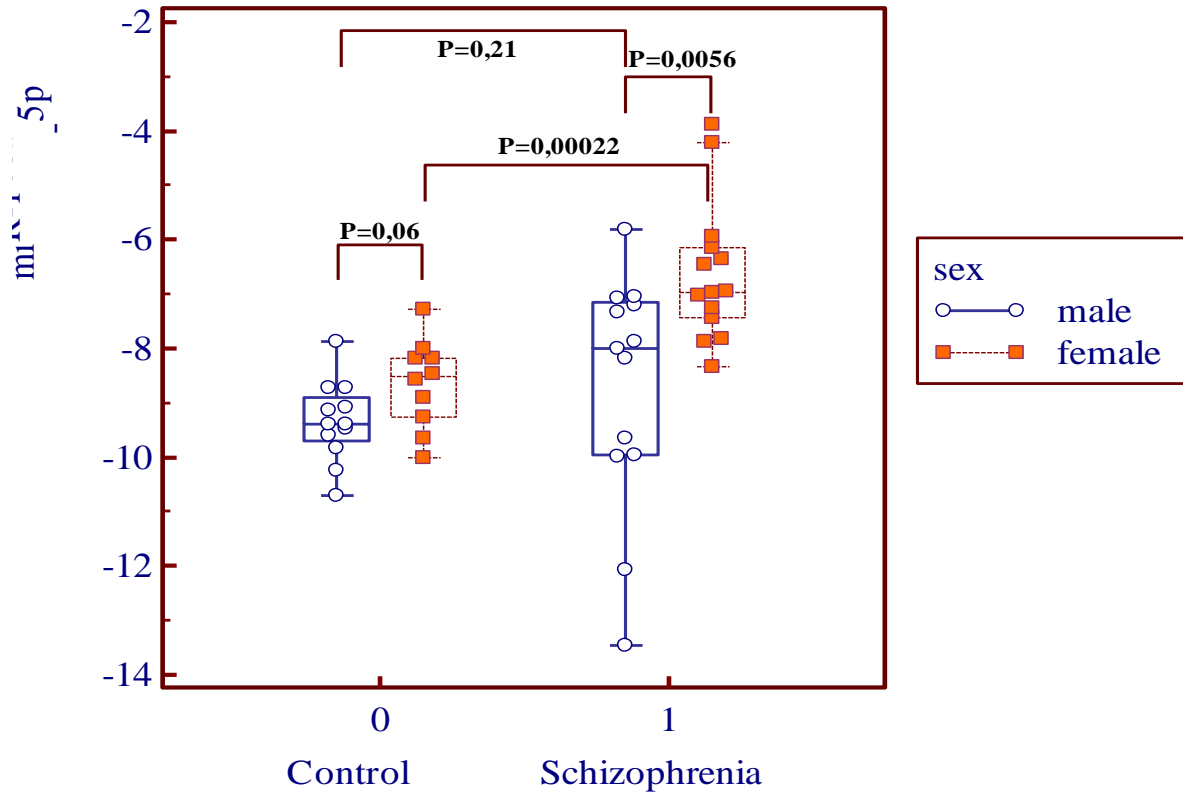
Фигура 31. Анализ на ROC кривите на диференцирано експресирани статистически значими миРНК молекули (миРНК-222-3р, миРНК-106-5р и миРНК-320а). Диагоналната линия представлява произволна класификационна точност (AUC 0.5).

V. 9. Изследване на асоциирани с пола вариации в миРНК експресията при шизофрения

Към момента е известно, че съществуват различия между половете по отношение на експресията на белтък кодиращи гени, метилационен статус, етап на развитие и др. За да се оцени влиянието на факторът пол съвместно с факторът заболяване при евентуална разлика в миРНК експресията както между пациентите с шизофрения така и между участниците от контролната, а също така и различията по пол между изследваните групи (шизофрения и контролна група) в настоящата работа беше използван непараметричен Kruskal-Wallis тест.

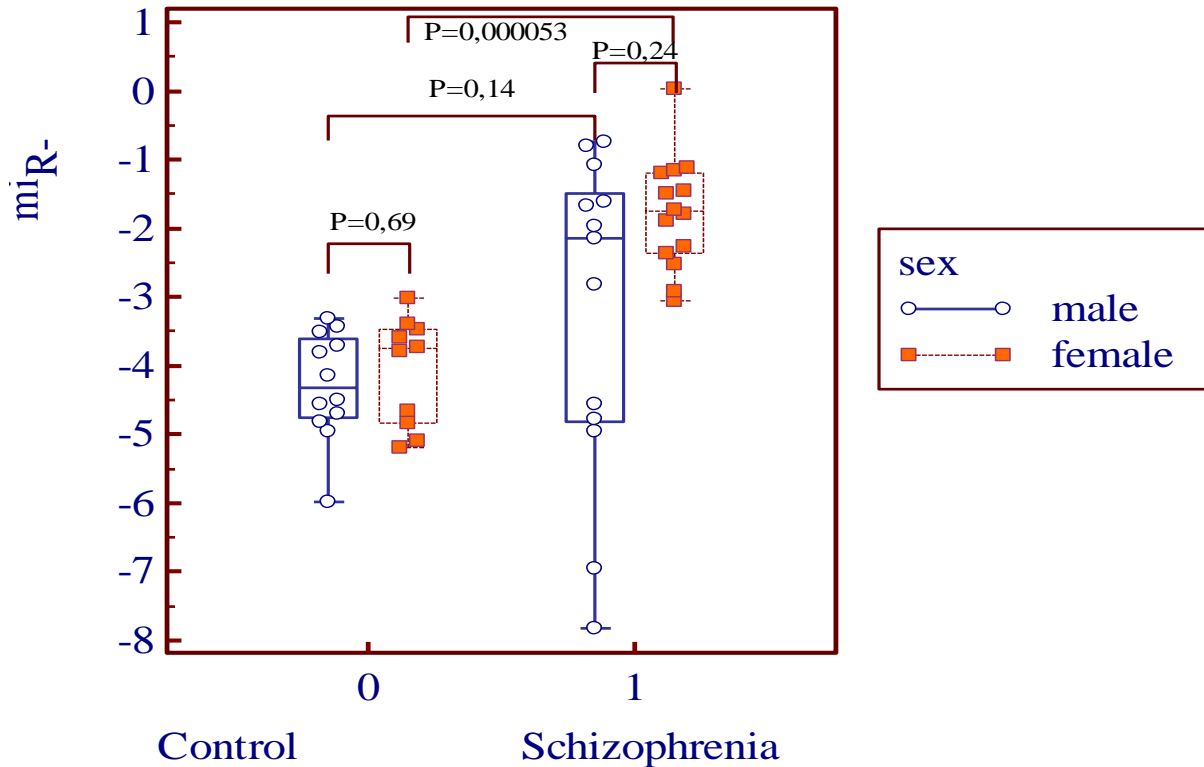
За изследване на евентуална асоциация на миРНК експресията с пола бяха анализирани единствено миРНК молекулите показали статистически значима промяна в експресията, а именно миРНК-106a-5p, миРНК-222-3p, миРНК-320a. Изследването на асоциираните с пола вариации в миРНК експресията бяха проведени с помощта на непараметричен Kruskal-Wallis тест.

Чрез прилагането на непараметричен Kruskal-Wallis тест беше установена зависима от пола статистически значима разлики в нивото на експресия на микроРНК-320a при шизофрения ($p = 0.0056$). Не се наблюдава значима разлика в миРНК-320a експресията между мъже и жени здрави контроли ($p = 0.06$). Значима разлика беше наблюдавана в нивото на миРНК-106a-5p експресия между двата пола при пациенти с шизофрения в сравнение със здрави контроли, съответно между мъже ($p = 0.03$) и жени ($p = 0,04$). Наблюдавана беше също статистически значима разлика в експресията на миРНК-106a-5p между жени и мъже пациенти с шизофрения в сравнение със здрави контроли ($p = 0.00022$), докато такава разлика в експресията не се наблюдава между мъже с шизофрения и мъже от контролната група ($p = 0.21$).



Фигура 32. Асоциирани с пола вариации в модела на миРНК-106а-5р експресия между анализирани групи с помощта на непараметричен Kruskal-Wallis тест. Представителите на двата пола са представени съответно с червени квадратчета – жени и бели кръгчета – мъже.

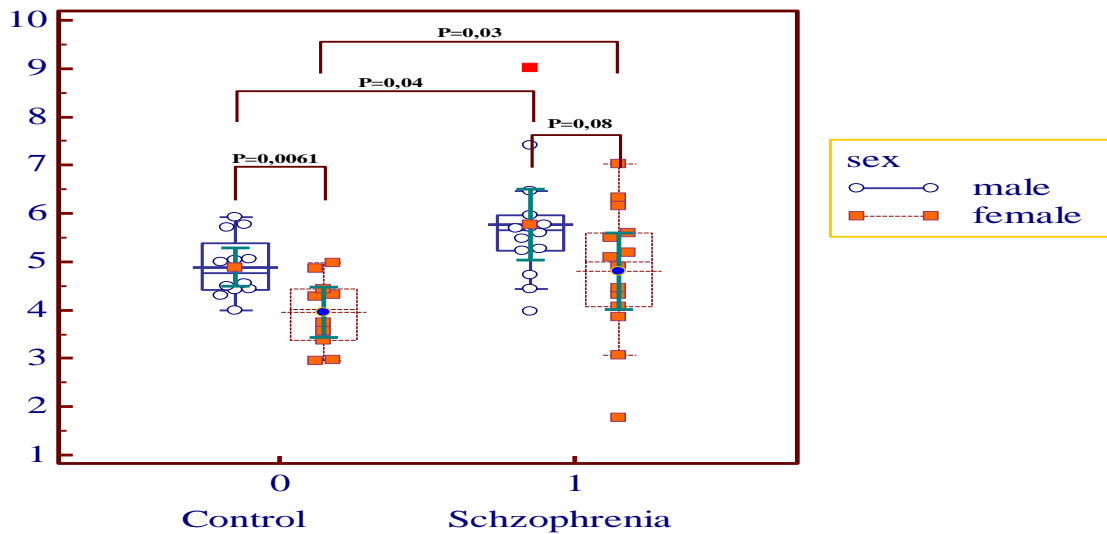
Както е видно от **Фигура 33**, не се наблюдава статистически значима разлика в нивото на експресия на миРНК-222-3р между мъже и жени с шизофрения ($p = 0.24$). Не се наблюдава също и значима разлика в експресията на миРНК-222-3р между мъже и жени здрави контроли ($p = 0.69$). Голяма статистически значима разлика в миРНК-222-3р експресията се наблюдава между жени с диагноза шизофрения в сравнение със здрави жени от контролната група ($p = 0,000053$), докато не се наблюдава статистически значима разлика между мъже с шизофрения и мъжеот контролна група ($p = 0.14$).



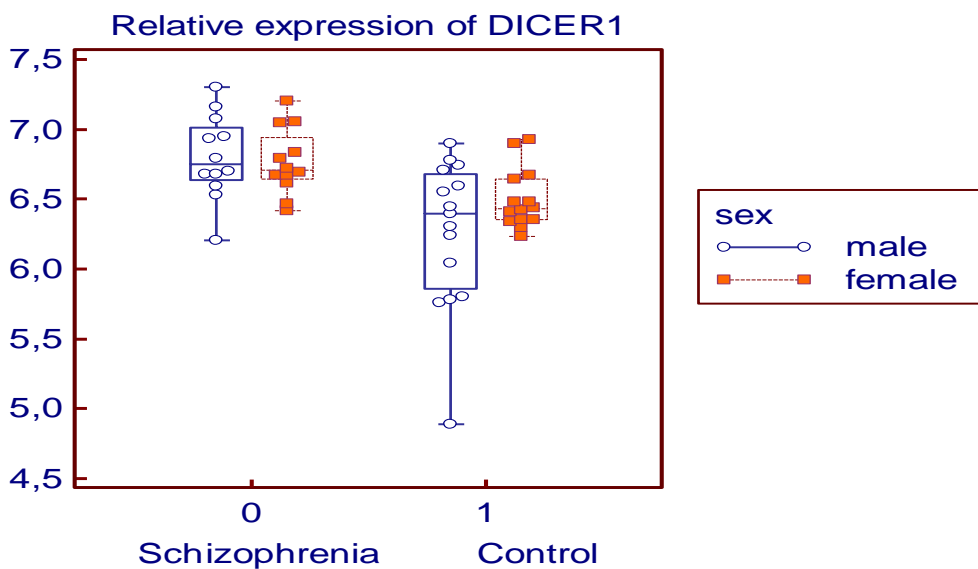
Фигура 33. Асоциирани с пола вариации в модела на експресия на миРНК-222-3р между анализирани групи с помощта на непараметричен Kruskal-Wallis тест. Представителите на двата пола са представени съответно с червени квадратчета – жени и бели кръгчета – мъже.

Не беше установена статистически значима разлика в нивото на експресия на миРНК-320а между мъже и жени с диагноза шизофрения ($p = 0.08$). Получените данни от проведенят непараметричен тест демонстрират значителна разлика в експресията на миРНК-320а между мъже и жени здрави контроли ($p = 0,0061$). Статистически значима разлика беше наблюдавана в нивото на експресия на миРНК-320а между двата пола при пациенти с шизофрения в сравнение със здрави контроли, между мъже ($p = 0.03$) и между жени ($p = 0,04$).

Резултатите от проведенят анализ демонстрират разлики в експресионният модел на анализираните миРНК молекули в зависимост от пола.



Фигура 34. Асоциирани с пола вариации в модела на експресия на миРНК-320а между анализирани групи с помощта на непараметричен Kruskal-Wallis тест. Представителите на двата пола са представени съответно с червени квадратчета – жени и бели кръгчета – мъже.



Фигура 35. Асоциирани с пола вариации в модела на експресия на *DICER1* между анализирани групи с помощта на непараметричен Kruskal-Wallis тест. Представителите на двата пола са представени съответно с червени квадратчета – жени и бели кръгчета – мъже.

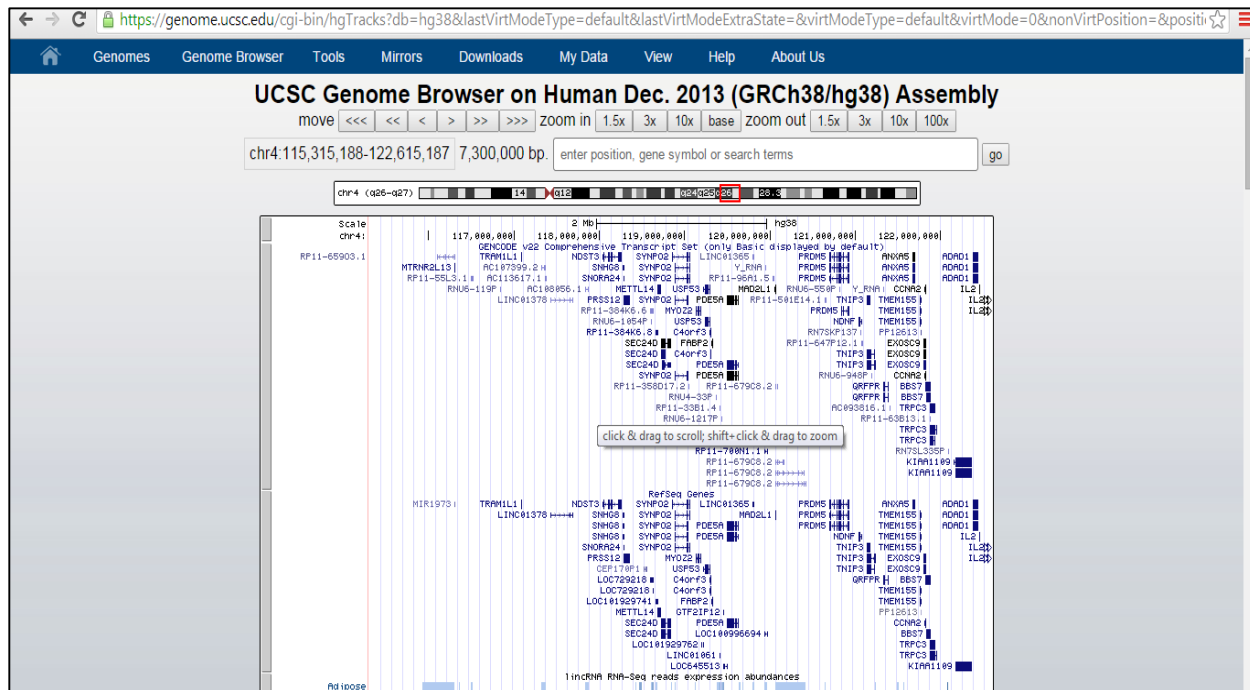
V. 10. Биоинформатичен анализ за идентифициране на таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули

Всяка диференцирано експресирана миРНК молекула има потенциал да регулира многобройни таргетни гени и следователно може да модулира множество биологични пътища. За идентифициране на белтък-кодиращи генни таргети и пътища, които могат да бъдат повлияни от идентифицираните от нас диференцирано експресирани миРНК молекули, беше използвана miRWalk базата данни (<http://mirwalk.uni-hd.de/>), като важен ресурс съдържащ функционалните връзка между миРНК молекулите и валидираните и предсказаните таргетни гени.

V. 11. Картиране на миРНК молекули показали диференциална експресия от майкроарей данни (LC Sciences) в генома с помоща на UCSC Genome Browser

Определяне на хромозомната локализация на диференциално експресирани миРНК молекули

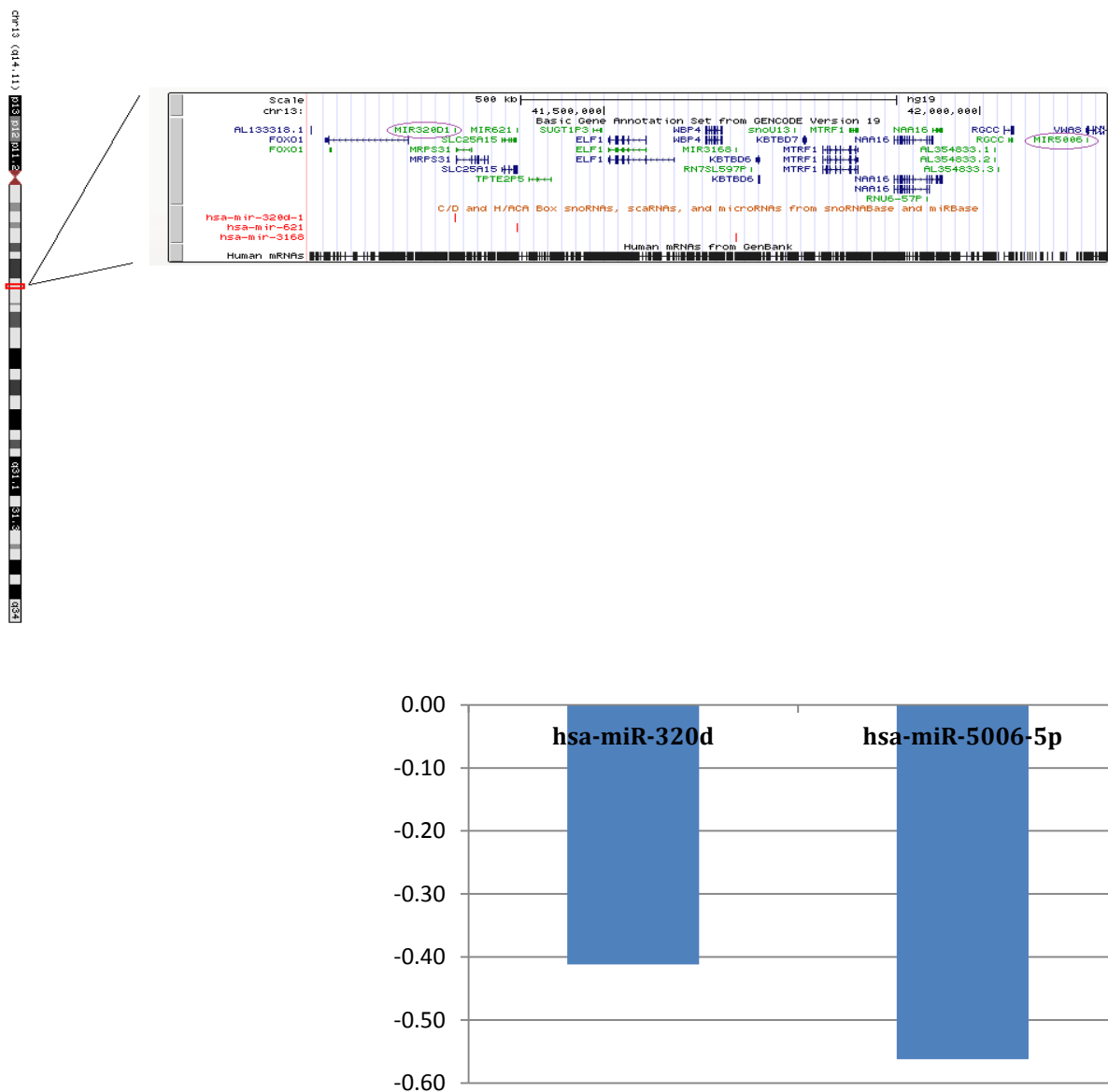
В допълнение към резултатите получени от експресионните изследвания, ние се опитахме да определи дали има/се наблюдава специфичен модел на експресия по отношение на хромозомната локализация на дисрегулираните миРНК молекули. МиРНК гените са разпределени в генома с изключение на Y хромозомата. С цел да се определи дали дисрегулираните миРНК молекули са близко разположени, ние картирахме местоположението на статистически значимите дисрегулирани миРНК молекули ($p > 0,05$ показали както понижена така и повишена промяна в експресията) в човешкия геном, използвайки UC Santa Cruz Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>)(Фигура 36).



Фигура 36. Графичен интерфейс на уебсайта на UCSC Genome Browser

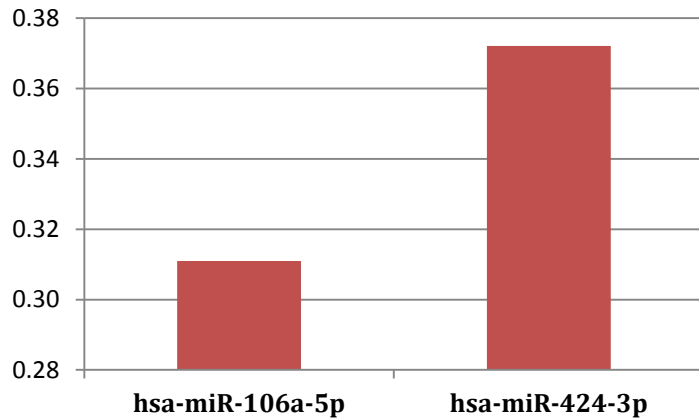
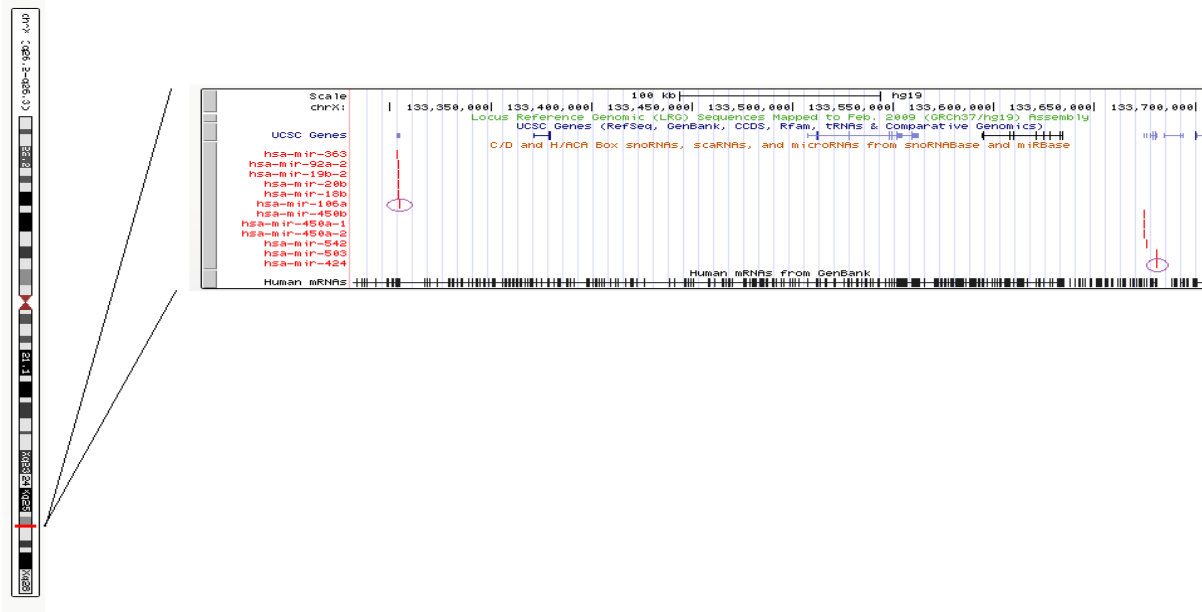
Допълнителна причина за предполагаемо съвместно регулиране на кандидат миРНК молекулите може да бъде тяхната ко-локализация в генома. За тази цел, бяха потърсени миРНК молекули базирайки се на данните получени за експресия, които са разположени на една и съща хромозома и са групирани заедно. В последствие, миРНК кандидат двойките бяха картирани до точната им хромозомна позиция. Открити бяха няколко близко разположени на една и съща хромозома двойки миРНК молекули показващи сходна промяна в експресията. Резултатите от проведеният анализ са представени по хромозоми.

Диференциално експресирани миРНК молекули в хромозома 13



Фигура 38. Локализация на диференциално експресираните миРНК молекули миРНК-320d и миРНК-5006-5p в хромозома 13. На диаграмата са показани резултатите за относителната експресия (RQ) представена чрез логаритмична трансформация (\log_2).

Диференциално експресирани миРНК молекули в хромозома X



Фигура 39. Локализация на диференциално експесираните миРНК молекули миРНК-106а-5р и миРНК-424-3р в X хромозома. На диаграмата са показани резултатите за относителната експресия (RQ) представена чрез логаритмична трансформация (\log_2).

VI. Дискусия

Представената в настоящата дисертация научна разработка е първото по рода си миРНК експресионно изследване, проведено върху клинично подбрана група от български пациенти с диагноза шизофрения в сравнение с контролна група от здрави индивиди. Едно от най-големите предизвикателства в изследването на епигенетичните промени и в частност върху изследвания на миРНК експресия при невро-психиатричните заболявания е събирането на проби от първичната прицелна тъкан, т.е. мозък. Поради невъзможността за извършване на епигенетични изследвания на мозък *in vivo*, за тази цел, се провеждат основно ретроспективни проучвания с постмортем мозъчни проби. Причината за избора на този вид материал е, обоснована и се изразява в това, че шизофренията е заболяване, засягащо мозъчната функция, а най-логично е промени в експресията да се търсят именно в засегнатата тъкан. Подобен подход наистина би имал голяма стойност при идентифицирането на етиопатогенетичните фактори в развитието на заболяването, които за съжаление все още не са напълно изяснени.

В настоящата експериментална работа детайлно беше изследван общият експресионен профил на миРНК молекули в периферна кръв от пациенти с шизофрения. Чрез използването на *μParaflo*TM миРНК микрочиповият анализ беше установена, промяна в експресията на голям брой миРНК молекули. Използваният в настоящата работа подход предлага възможност да се направи първата стъпка в разбирането на ролята на миРНК молекулите и свързаните с тях биологични процеси в етиопатогенезата на шизофренията. На база на получените от нас резултати може да се предположи, че промяната в нивата на експресия на миРНК молекулите допринасят за комплексните глобални промени в генната експресия, които лежат в основата на патофизиологията на заболяването. В настоящото проучване ние наблюдавахме, че миРНК експресионният профил е глобално дисрегулиран в периферна кръв на пациенти с диагноза шизофрения. На молекулярно ниво, нашите резултати могат да бъдат обяснени с една или повече от следните възможности: **а)** намаляване на транскрипционната или епигенетична репресия на първичните миРНК транскрипти, **б)** промени в нива на Argonaute и хомоложните протеини, **в)** промени в миРНК процесинга (например, от *DICER1*, и т.н.), или **г)** повишен период на полуразпад/полуживот на миРНК молекулите.

Чрез извършеният миРНК микрочиповият анализ беше установено, че представителите на миРНК-320 семейството са диференцирано експресирани при шизофрения. Представителите на семейството миРНК-320 имат редица експериментално потвърдени таргетни гени, както също така и много потенциални, предсказани таргетни гени с множество функции в централна нервна система.

Настоящото изследване на експресионния профил на всички известни микроРНК гени (miRBase v.18.0), (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) показва 25 диференциално експресирани миРНК молекули със статистическа разлика спрямо контролна група лица. Няколко от тях са показани като променени и в предходни изследвания (Таблица 12). Въпреки различните биологични материали, използвани в предходните проучвания нашето изследване потвърждава установената диференциална експресия на редица изследвани миРНК молекули, едновременно с това и идентифицира нови миРНК молекули с промяна в експресията.

Наличието на относително малко съвпадения между наличните изследвания може да бъде обяснено от части с различните тъкани, използвани в тях, а също така и с различния брой изследвани миРНК, поради различията на използваните експериментални платформи (най-голям в представеното от нас изследване). Липсата на точни съвпадения между изследванията би могла да се дължи и на разликата в използваните клинични единици. От друга страна, съвпаденията между изследванията могат да се разглеждат като основни, базисни промени при шизофрения, които се срещат ако не при всички то при голям процент от пациентите с шизофрения.

Поставени така, получените данни предполагат обсъждания в няколко насоки:

1. Използването на периферна кръв като биологичен материал за изследвания на генната експресия, както е показано и в по-ранни изследвания е подходящ за целите и удобен за провеждането на миРНК експресионни изследвания субстрат.

2. С увеличаване броя на изследваните миРНК се увеличава и броя на установените диференциално експресирани такива. (В предходните изследвания

са използвани платформи с по-ранни издания на miRBase, т.е по-малко на брой изследвани миРНКи или индивидуални експресионни анализи на конкретни миРНК молекули). Това от своя страна потвърждава хипотезата за цялостен променен експресионен профил, миРНК експресионна сигнатура при шизофрения.

3. В този ред е уместно да се обсъди създаването на миРНК платформа за целите на молекулярното диагностициране, базирана на диференциално експресираните миРНК молекули, подходящи за биомаркери при шизофрения.

VI. 1. МиРНК молекули с промяна в експресията при шизофрения

Част от миРНК молекулите, които бяха идентифицирани като диференциално експресирани в настоящото изследване са също свързани с редица други онкологични, неврологични и психиатрични заболявания. Детайлна информация за отделните миРНК молекули с промяна в експресията при шизофрения е представена за всяка една миРНК молекула по отделно.

МиРНК- 320a

Генът кодиращ миРНК-320a е локализиран в 8 хромозома. До момента миРНК-320a е обект на разнообразни проучвания, свързани с ролята на миРНК-320a като медиатор при карцином на пикочния мехур, връзката между ниските й нива и рак на дебелото черво и глиобластома. Има данни, че миРНК-320a проявява тумор супресорно действие при остеосаркома, както и при инициаторните клетки на рак на простата.

В настоящото изследване от особен интерес е ролята на миРНК-320a като потенциален регулатор на експресията на гени, свързани с нервната система. Например демонстрирано е, че нивото на миРНК-320a е занижено в В лимфоцити при пациенти с множествена склероза, което най-вероятно допринася за повишения пермеабилитет на кръвно-мозъчната бариера и неврологичната нестабилност. Също със занижена експресия на тази миРНК се характеризира аутоимунното разстройство миастения гравис. Предполага се, че миРНК-320a

участва в регулирането на продукцията на възпалителни цитокини. Заедно с още няколко други миРНК молекули, миРНК-320а се счита за критична регулаторна молекула при развитието на централната нервна система, като е наблюдавана промяна в експресията на миРНК-320а при редица психиатрични състояния, както и при някои други заболявания при човека.

МиРНК-320b

Интересна е връзката на миРНК-320b с медикамента натализумаб (natalizumab), който представлява хуманизирано миши антитяло, чиято мишена е алфа-4 интегрин. Медикамента се използва с доказана ефективност срещу поредни пристъпи при множествена склероза и срещу прогресия на инвалидизацията. Но действието му е свързано и с увеличаване на риска от развитие на прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия (PML) – състояние, засягащо миелиновата обвивка на мозъчните неврони. В скорошно изследване е анализиран набор от 754 миРНК молекули в кръв от пациенти в ремисия по време на терапия с натализумаб, като някои от тях развили PML след повече от две години лечение. МиРНК-320b е един от биомаркерите, които показва промяна в експресията вследствие на действието на антитялото след 12-месечно третиране. Съответно, тази миРНК молекула може да бъде използвана като биомаркер за оценка на индивидуалния риск от развитие на мултифокална левкоенцефалопатия.

МиРНК - 320c

МиРНК-320c е повишена значително в серум при пациенти с Хепатит С. Оказва се, че миРНК-320c регулира резистентността към стандартната химиотерапия при рак на панкреаса. Освен това, една от нейните таргетни молекули е циклин-зависимата киназа 6, чрез което взаимодействие миРНК-320c може да инхибира пролиферацията и миграцията на клетки от тумор на пикочния мехур, което е аргумент в бъдеще миРНК 320c да се използва като терапевтичен агент.

МиРНК-320d

Една от таргетните молекули на миРНК-320d е иРНК на протеина индуциращ преминаването към литичен цикъл на асоциираният със сарком на Капоши херпес вирус (KSHV). Заедно с миРНК-498 и миРНК-320d тези миРНК молекули имат таргетни секвенции в 3' нетранслируемия регион на транскрипта. Следователно, при свръх експресия на тези миРНК молекули се наблюдава значително намаляване на индуцирана от KSHV херпес вируса репликация. Освен това миРНК-320d е една от идентифицираните миРНК като референт в кръвната плазма при състояние на клинична депресия.

МиРНК 106a-5p

Микро РНК 106a-5p е обект на множество изследвания в, които е доказано, че тя регулира голям брой генни таргети. Микро РНК 106a-5p е асоциирана със състояние като неоплазия, заболявания, като рак на дебелото черво и хепатоцитен карцином. Например доказано е, че тази миРНК има благоприятно действие срещу астроцитом (вид вътре-черепен тумор), ефект който оказва чрез потискане пролиферацията и миграцията на туморни клетки.

За същата миРНК е установено, че заедно с още няколко миРНК молекули показват повишена експресия при назофарингиален тумор, с което промотират прогресията на тумора.

МиРНК - 222-3p

Генният локус на миРНК-222-3p се намира в X хромозомата. МиРНК 222-3p е една от диференциално експресиранияте миРНК молекули в нашето изследване, до момента данни за асоциация на миРНК 222-3p с шизофрения се намират единствено в разработките на *Beveridge* и сътрудници където миРНК 222-3p показва незначима статистически промяна в експресията в STG получена от миРНК майкромарей анализ, която не е потвърдена с друг метод. Резултати получени от многобройни изследвания сочат за ролята ѝ в генезата на различни туморни образувания както и в резистентността към някои антиракови

терапевтични съединения. Например, в *in vitro* изследвания на клетъчни линии от рак на простатата, е демонстрирана взаимовръзка между експресията на миРНК-222-3р и туморния супресор p27. В допълнение, по-високото ниво на експресия на миРНК-221/миРНК-222-3р води до промяна в растежа на тези клетки, чрез инициране на прехода от G1 към S фаза на клетъчния цикъл. В проведеният биоинформатичен анализ за търсене на таргетни гени на миРНК-222-3р един от валидираните таргетни гени е *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog, фосфатаза и тензинов хомолог гена) локализиран в хромозома 10, кодиращ белтък отговорен за потискането на клетъчното делене и разрастване, мутации в който по рано са асоциирани с РАС.

Получените данни от експресионният анализ на миРНК бяха използвани за провеждане на ROC анализ за оценка на диагностичната чувствителност и специфичност на кандидат миРНК биомаркерите при шизофрения.

Прилагайки ROC анализ за оценка на диагностичната чувствителност и специфичност на анализирания миРНК биомаркерни молекули Y_i и колектив определят диагностична чувствителност на анализирания от тях миРНК молекули както следва, миРНК-132 (94%), миРНК-134 (92%), миРНК-1271(91%), миРНК-664 (88%), миРНК-200с (93%) и миРНК-432 (88%) за шизофрения. Със съответстваща специфичност от 89%, 82%, 81%, 74%, 78% и 68%, и област под ROC кривата (95% CI) от 0.934 (89.4 - 97.5%), 0.920 (88.0 - 96.0%), 0.921 (88.1 - 96.1%), 0.836 (78.0 - 89.1%), 0.878 (82.8 - 92.7%) и 0,821 (76.5 - 87.6%), съответно. Данните показват значителна диагностична стойност на миРНК-132, миРНК-134, миРНК-1271, миРНК-664*, миРНК-200с и миРНК-432 молекулите при шизофрения, което е основателен аргумент в подкрепа на факта, че тези молекули могат да бъдат използвани като нови неинвазивни биомаркери за диагностика при шизофрения.

В сравнение с тези данни резултатите получени от нас показват сравнително завишени характеристики за чувствителност и специфичност на изследваните от нас кандидат миРНК молекули в периферна кръв. Използвайки анализ на ROC кривите чувствителността за миРНК 222-3р беше определена на 77,8%, докато получената специфичността беше максимална (определена на 100%).

Резултатите при ROC анализа на друг наш кандидат, миРНК 106-3р показаха чувствителност определена на 70,4% със съответна специфичност от

95,5%, която надвишава получените резултати от Y_i и колектив при които максималната получена специфичност достига до 89% за анализираната от тях миРНК-132.

В допълнение анализирана беше също диагностичната чувствителност и специфичност на комбинирани класификатори включващи диференцирано експресирани членове на миРНК-320 семейството (миРНК-320a, миРНК-320b, миРНК-320c и миРНК-320d), като диагностичната чувствителност, определена от нас на 85,7% със съответна специфичност от 95,5% показва по добра характеристика в сравнение с използването на единични класификатори (отделни миРНК молекули).

Анализът на комбинирани класификатори включващ намерените от нас диференцирано експресирани молекули, миРНК 222-3p, миРНК 106-5p и миРНК-320a, показва диагностична чувствителност, определена на 81,5% със съответна специфичност от 100%. Всичко това демонстрира по добра диагностична характеристика на комбинирани класификатори, в сравнение с използването на единични класификатори (отделни миРНК молекули), както и при съвместното с комбинирани класификатори, изследвани също от нас но, които включват диференцирано експресирани членове на миРНК-320 семейството, Всичко това до известна степен е очаквано тъй като включените миРНК молекули в този ROC анализ показват статистически значима промяна, за разлика от анализът с който е направено сравнението във който единствено миРНК 320a статистически значима промяна.

VI. 2. Бъдещи изследвания

Детайлното разбиране на ролята, която миРНК молекулите имат при реализирането на мозъчните функции, и в частност при психичните разстройства е все още динамично развиваща се сфера. Ясно е, че връзката между миРНК експресията и тези разстройства е сложна, като в подкрепа на това твърдение е факта, че дисрегулацията на голям брой миРНК молекули изглежда корелира значително с тези заболявания. Някои миРНК молекули са по добри кандидати, като миРНК-137, миРНК-132/212, и представители на миРНК-15 семейството тъй като, са идентифицирани в няколко различни проучвания, което ги превръща в особено интересни кандидати за биомаркери в бъдещи изследвания.

По-доброто разбиране на пространствено-времевата диференциална експресия на миРНК молекулите ще помогне за идентифицирането на миРНК молекули с особено значение за психиатричните заболявания, както и в кой етап и до каква степен те допринасят за развитието на заболяването.

Провеждането на допълнителни изследвания на мозъчна тъкан при клинично здрави индивиди ще бъдат безценни за разбирането ни за това как миРНК молекулите допринасят за развитието на заболяванията. Открит остава и въпроса за локализацията на свързаните с психичните разстройства миРНК молекули в отделните неврони и в какви биологични процеси те вземат участие. Комбинация от такъв тип проучвания с висока субклетъчна разделителна способност, както и колекцията на данни от големи кохорти от аутопсирани мозъчни проби значително ще подобрят разбиранията ни относно функциите на миРНК молекулите в невробиологията на психиатричните разстройства.

VII. Заключение

В заключение, настоящото проучване е първото по рода си проучване в България на пълният транскрипционен профил на миРНК гени от периферна кръв при пациенти с диагноза шизофрения в сравнение с здрави контролни лица. Извършен беше индивидуален експресионен анализ на диференциално експресирани миРНК молекули, резултатите от, който анализ потвърдиха наличието на миРНК молекули, показващи статистически значими разлики между анализирани групи. Всички тези резултати ни дават убеждението да твърдим, че идентифицираните от нас миРНК молекули могат да се разглеждат като биомаркерни молекули отразяващи обективно физиологичното състояние шизофрения. В проведените биоинформатични анализи бяха идентифицирани редица валидирани и предсказани таргетни гени на диференциално експресирани миРНК молекули, които участват в редица биологични процеси някои от които, по рано свързани с разстройството. Получените от нас резултати подкрепят участието на миРНК молекулите в развитието на шизофрения, които могат да участват в редица основни пътища свързани с развитието и диференциацията на нервната система, както и с един от ензимите участващ в биогенезата на миРНК молекули.

Резултатите от нашето изследване демонстрират, че съществуват специфични нарушения в генната експресия от периферни кръвни проби, получени от пациенти с шизофрения в сравнение със здрави контроли. Изследването подкрепя наблюдението, че периферната кръв е потенциално полезен източник за идентифициране на потенциални диагностични биомаркери при шизофрения. В резултат на получените данни от експресионният анализ ние картирахме локализацията на диференциално експресираниите миРНК молекули в генома и за някои от които показахме локус специфична диференциална експресия, което може да бъде насока за бъдещи изследвания за търсене на причините които водят до наблюдаваната диференциална експресия. В бъдеще ако нашите резултати се потвърдят и от други проучвания, може да предположим, че диференциално експресираниите гени могат да бъдат използвани, като потенциални биомаркери, а дисрегулираните пътища, в които те участват да се превърнат в потенциални таргети за прицелни терапии при това разстройство.

Използваните широкомащабни транскрипционни анализи на миРНК молекули предлагат огромни възможности при изследване на етиопатогенезата на мултифакторните заболявания. Настоящото изследване е все още в начален етап, изследването за в бъдеще ще бъде продължено с по-задълбочени проучвания на потенциалните кандидат биомаркерни молекули в по-големи групи от пациенти и с диагноза шизофрения.

VIII. Изводи

1. МиРНК експресионните промени в периферна кръв могат обективно да отразяват заболяването, поради което могат да се приемат за потенциални биомаркерни молекули при шизофрения.
2. При проведеният майкроарей експресионен анализ са идентифицирани 25 диференциално експресирани миРНК молекули, 14 от които с повишена и 11 с понижена експресия при пациенти с шизофрения.
3. Установена е статистически значима разлика в експресията на 3 миРНК гена, миРНК-106a-5p, миРНК-222-3p, миРНК-320a и гена, участващ в

биогенезата на миРНК молекули *DICER1*, при провеждането на индивидуалния експресионен профил на пациенти с шизофрения.

4. Въз основа на проведените биоинформатичните анализи, са идентифицирани таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресираниите миРНК молекули, които участват в ключови сигнални пътища, имащи роля в патогенезата на шизофрения.
5. Специфичният модел на експресия на диференциално експресираниите миРНК молекули може да се дължи на съвместно регулиране поради тяхната колокализация в генома.
6. Проведените експресионни изследвания на анализираниите миРНК молекули дават основание да предположим участие на миРНК, миРНК-106a-5p, миРНК-222-3p, миРНК-320a и *DICER1* гена в патогенезата на шизофрения.

IX. Приноси

IX. 1. Приноси с научен характер:

- Установени са кандидат миРНК молекули с диференциална експресия, които показват асоциация с шизофрения.
- Предложен е нов епигенетичен механизъм с участието на специфични миРНК молекули в патогенезата на шизофренията.
- Установени са асоциирани с пола разлики в миРНК експресионните профили, както между пациенти с шизофрения и контролна група лица, така и между пациенти с шизофрения.
- Установена е връзка между експресията на миРНК молекули, показали диференциална експресия и геномната им локализация.
- Идентифицирани са таргетни белтък-кодиращи гени на диференциално експресионните миРНК молекули.

- За първи път в България е изследван експресионният профил на миРНК молекули в периферна кръв при пациенти с шизофрения.

IX. 2. Приноси с приложен характер:

- Идентифицирани са кандидат миРНК молекули с потенциални характеристики на биомаркери при шизофрения.
- Разширена е ДНК и РНК банката от пациенти с шизофрения, предоставящи възможност за по-мащабни бъдещи проучвания.

Научни публикации, свързани с дисертационния труд:

1. **TI Vachev**, Popov HT, Stoyanova VK, Ivanov HY, Minchev DS. **Down Regulation of MIR-320 Gene Family Members in the Peripheral Blood of Schizophrenia Patients** *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2016) 5(1): 221-230
2. **TI Vachev**, Popov HT, Stoyanova VK, Ivanov HY, Minchev DS. **Alterations of miR-320 Family Members as a Novel Diagnostic Biomarkers in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients** *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2016) 5(3)
3. **Tihomir I. Vachev**, Nikolay T. Popov, Danail Marchev, Hristo Ivanov and Vili K. Stoyanova. **Characterization of Micro RNA Signature in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients using μ Paraflo™ miRNA Microarray Assay** *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2016) 5(7): 503-512

Доклади на научни форуми:

1. Dysregulation of MicroRNA and Protein Coding Gene Expression as a Potential Peripheral Blood-based Biomarker for Schizophrenia Nikolay Todorov Popov, Vili Krasteva Stoyanova, Ivan Nikiforov Minkov, **Tihomir Iliev Vachev**; Second Bulgarian-Japanese Symposium „Genomic in Medicine“ 08. 12. 2012
2. Transcriptomic Profile of Micro RNAs and Protein Coding Genes in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients Vili Krasteva Stoyanova, Nikolay Todorov Popov, Ivan Nikiforov Minkov, **Tihomir Iliev Vachev**; ESHG, Paris, France June 8 - 11, 2013 *EJHG* vol 21, S2, p193 - P06.09.