

Анотация на материалите по чл.65 (1) от Правилника за РАС на ПУ "Паисий Хилендарски", включително самооценка на приносите - чл. 66(2) т.8

НА ГЛ. АС. Д-Р ТИХОМИР ИЛИЕВ ВЪЧЕВ

за участие в конкурс за заемане на академична длъжност "Доцент"
по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Молекулярна
биология “

обявен в ДВ бр. 99/ 20.11.2020 г.

На вниманието на уважаемите членове на Научното жури са представени общо **26** научни труда, които могат да бъдат класифицирани по следния начин:

1 хабилитационен труд – монография (ISBN 978-619-202-637-0);

16 публикации в научни издания, реферирани и индексирани в Web of Science и Scopus **11** от тях притежават импакт фактор;

2 публикации в реферирани научни издания, без импакт фактори и квартали (Q) съответно метриката на научните издания реферирани в Web of Science и Scopus;

3 учебни помагала (ISBN 978-954-423-917-6; ISBN 978-619-202-629-5; ISBN 978-619-202-607-3);

1 учебник (ISBN);

2 книги на базата на дисертационен труд (ISBN 978-619-202-639-4 и ISBN 978-619-202-640-0);

1 автореферат за придобиване на ОНС „Доктор“ по Молекулярна биология;

1 автореферат за придобиване на ОНС „Доктор“ „Доктор“ по Генетика;

1 автореферат на дисертационен труд за придобиване на НС „Доктор на науките“

1 дисертационен труд за придобиване на НС „Доктор на науките“

Оригиналните ми научни приноси могат да бъдат обобщени в следните групи: приноси от научно-изследователската и научно-приложна дейност и приноси в областта на учебно-преподавателската дейност.

I. ПРИНОСИ С НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА И ПРИЛОЖНА ДЕЙНОСТ

1. НАУЧНИ ПРИНОСИ - МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ

1. Анализ на малки РНК молекули при *Phelipanche ramosa* в отговор на инфекция с Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd)

1.1. За пръв е изследван специфичният профил на малки РНК молекули в паразитното растение *P. ramosa*, в резултат на инфекция с PSTVd. Наскоро експерименталният обхват на гостоприемници на PSTVd беше разширен с кореновите нефотосинтетични паразитни плевели - *Phelipanche ramosa* (L) Pomel. Растенията се защитават срещу вирусна/виroidна инфекция чрез механизъм свързан с деградация на вирусна/виroidна РНК или инхибиране на транслацията. Механизма се реализир чрез производството на малки РНК, наричани малки интерфериращи РНК и микроРНК, ключовите молекули за реализиране на РНК насочен сайлънсинг (*публикация 1*).

В представената работа за пръв път са открити и характеризирани малки (21-25нд) интерфериращи PSTVd специфични РНК (PSTVd сиРНК) в инфектирано растение *P. ramosa* с помощта на хибридизационни техники (*Northern blot* и *small RNA microarray* базиран анализ); описани са 58 статистически достоверни PSTVd сиРНК, които произхождат от геномната верига на PSTVd и 5 PSTVd сиРНК, които произхождат от антигеномната верига на PSTVd; Идентифицирани бяха малки РНК молекули, получени от (PSTVd-специфичните сиРНК) геномната молекула. Специфичните места (горещите точки) за получаването на тези специфични за PSTVd малки РНК са определени чрез тяхното картиране върху секвенцията на генома на PSTVd молекула. (*публикация 1*).

1.2. За пръв път е изследван експресионният профил на консервативни миРНК в PSTVd инфектирано паразитно растение *P. ramosa* чрез *small RNA microarray*; доказана е повижена експресия на представители на стрес-индуцируемите миРНК фамилии: миРНК395 и миРНК156; описано е съществено понижение в експресионните нива на представителите на фамилиите миРНК-167, миРНК-390; миРНК165; миРНК166; миРНК395 и миРНК 319; резултатите са валидирани с помощта на qPCR (*публикация 1*).

1.3. Потенциалните прицелни места на статистически променените миРНК в *P. ramosa* са дефинирани в EST секвенции на *Phelipanche aegyptiaca* на базата на комплементарност. Секвенциите, притежаващи прицелни места са анотирани

чрез алгоритъм BLAST2- GO. Открити са 832 секвенции, притежаващи прицелни места за 43 миРНК секвенции (*публикация 1*). Всички тези открития предполагат участието на различни малки класове РНК в отговора и защитата на *P. ramosa* към PSTVd инфекция.

2. Изследване на експресията на малки РНК при реакции на отговор към ниско-температурен и високо-температурен стрес, използвайки техника (Digital gene expression) дълбоко секвениране при *Arabidopsis thaliana*

2.1. Профилирането на малките РНК молекули и оценката на зависимостта им от променящите се фактори на околната среда разшириха нашите разбиране на транскрипционната и пост-транскрипционната регулация на реакциите към стреса при растенията. В представената научна разработка са представени данни, за профилирането на различни малки класове РНК в отговор на стрес, свързан с температурата, който изследвания имат голямо значение за биологията и изучаването на отговора на растеничта към динамичните климатични промени. В настоящето проучване, се извършва сравнителна оценка на геномното профилиране на малки РНК молекули в *Arabidopsis thaliana*, използвайки два условни отговора, индуцирани от висока и ниска температура. (*публикация 2*).

2.2. Приложеният подход на широк геномно профилиране на малки РНК демонстрира изобилие от 21 нт. малки РНК в отговор на проложен ниско температурен стрес, докато при високо температурният стрес се наблюдава изобилие от 21 нт и 24 нт. малки РНК. (*публикация 2*).

2.3. Приложените две температурни условия (стерсови фактори) променя експресията на специфична подгрупа зрели миРНК молекули и показва диференциална експресия на определена група миРНК изоформи (isomiRs). Сравнителният анализ разкрива, че голям брой протеини-кодиращи гени могат да доведат до диференциално експресирани малки РНК след температурни промени. Ниската температура има за резултат акомулирането на малки РНК, съответстващи на кодиращата верига на редица реагиращи на ниско-температурен стрес гени. За разлика от тях, високо-температурният стрес стимулира производството на малки РНК и в двете полярности от гени, кодиращи функционално разнообразни протеини. (*публикация 2*).

3. Оценка на миРНК-486-3р експресионния профил при пациенти с разстройство от аутистичния спектър (РАС)

3.1. За първи път беше изследвано нивото на експресия на миРНК-486-3р в 30 кръвни проби от РАС и типично развиващите се деца, използвайки RT-qPCR. МикроРНК молекулите като нов клас регулатори на генната експресия, действащи като негативни регулатори на пост-транскрипционно ниво фокусират вниманието на изследователите при много заболявания включително и при РАС. Разбирането на молекулярната сигнатура на миРНК молекули при РАС е обещаващ инструмент за идентифициране на нови биомаркери, свързани с разстройството. Резултатите от представеното изследване демонстрират статистически значимо понижаване на миРНК-486-3р в РАС групата. *(публикация 3)*.

3.2. В допълнение беше демонстрирана значителна диагностична стойност на миРНК-486-3р при РАС използвайки ROC анализ. *(публикация 3)*.

3.3. За изследване на потенциалната модулация в експресията на протеин-кодирани ген, която може да бъде свързана със специфични промени в миРНК-486-3р, бяха проведени проучвания, използвайки публично достъпна база данни, miRWalk. Идентифицирахме бяха гени, свързани с развитието на невроните и епигенетичните процеси. Всички тези открития потвърждават диференцирано експресирания миРНК-486-3р при деца с РАС, както и подкрепят използването на кръвни тъкани като алтернатива за изследване на експресията на миРНК при РАС. *(публикация 3)*.

4. Сравнителен експресионен анализ на човешки ендеогенни ретровирусни елементи (HERV) в кръвни проби на деца с разстройство от аутистичния спектър

Представеното проучване изследва експресията, на пет различни човешки ендеогенни ретровирусни елемента в кохорта от пациенти 31 деца с диагноза разстройство от аутистичния спектър (РАС) в сравнение с контролна група от 27 деца с показващи типично развитие. Около 8% от човешкия геном се състои от човешки ендеогенни ретровирусни елементи (HERV). Редица научни изследвания демонстрират, че HERV транскрипцията е променена не само в специфични мозъчни области, но също така и в периферна кръв на пациенти с психиатрични състояния като шизофрения, множествена склероза и в частност при РАС.

Сравнителният HERV експресионен анализ при 31 деца с диагноза PAC и 27 здрави контроли, извършен чрез цялостен подход на секвениране на транскриптома (RNA-seq), комбиниран с допълнително валидиране чрез qRT-PCR анализ установи наличието на два HERV-кодирани гена, HERV-P env и HERV-R env, които показват статистически значима промяна в експресията (понижена) в групата на децата с PAC. Друг HERV ген, HERV-W pol показва значително повишена експресия. Използвайки ROC анализ беше демонстрирано, че наблюдаваните промени в нивата на транскриптите на HERV-P env и HERV-R env могат да дискриминират пациентите с PAC от здравите контроли със значителна чувствителност и специфичност. Представените в изследването резултати заедно с голям обем експресионни изследвания, проведени от други изследователи, предполагат, че човешките ендегенни ретровирусни елементи могат да участват във важни физиологични процеси и да служат като ключови фактори и потенциални биомаркери при много състояния, включително PAC. (*публикация 4*).

5. Експресионни промени на MYB1 и ACO гени при инфекция с Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) на *Phelipanche ramosa*

Доказана е промяна в експресионните нива на специфичните за *P. ramosa* MYB1 (транскрипционен фактор) и ACO (аскорбат оксидаза) гени в отговор на PSTVd инфекция; експресионният профил на MYB1 показва 5кратно понижена експресията в PSTVd инфектираното растение *P. ramosa*; описана е понижена експресия на ACO в инфектирана *P. ramosa* и индуциране на ACO при прилагане на синтетични стриголактонови аналози (*публикация 5*).

6. Неинвазивно пренатално идентифициране на пола с помощта на свободно циркулираща фетална ДНК (сцфДНК) в майчиното кръвообръщение

Основният принос от представената научна разработка е постигната успешно феталната идентификация на пола във всички анализирани случаи. От анализираните 33 проби 18 са мъже и 15 жени. За допълнително валидиране на получените резултати, данните са сравнени с действителния пол на новородените, потвърден при раждането. (*публикация 6*).

Напредъкът на изследванията относно използването на свободно циркулираща фетална ДНК в майчиния серум по време на бременност предостави възможността за прилагане на сцфДНК като неинвазивен метод в пренаталната диагностика. СцфДНК в майчиния серум по време на бременност, е полезен инструмент за определяне на пола на плода в ранна гестационна възраст. В представеното проучване е оценена вероятността за откриване на специфични Y-хромозомни последователности при бременни жени с цел идентифициране на пола на плода.

Обект на изследване са периферни кръвни проби получени от 33 бременни жени с гестационна възраст между 11-та и 13-та седмица. Етап на предварително амплификация на специфични за Y-хромозома маркерни последователности, последван от анализ на кривите на денатурация на qPCR, беше приложен за откриване на последователности специфични за SRY и DYS14 гените, както и специфична за Y-хромозома маркерна последователност на AMELY гена. Разработената методика, базирана на използването на сцфДНК в майчиния серум спомага за получаването на ранни данни за пола на плода като по този начин притежава потенциала да намали необходимостта от провеждането на инвазивни процедури при бременни жени, носители на X-свързани разстройства. *(публикация 6).*

7. Дерматоглифен анализ и флукутираща асиметрия при здрави и психично болни

Целта на представеното проучване е да се оцени нивото на флукутираща асиметрия (ФА) в броя на гребените на хребета при психично здрави пациенти и пациенти с шизофрения и биполярни I от двата пола.

Проучването включва 344 лица с българска етническа принадлежност на възраст 18-64 години, 285 психично здрави и 59 пациенти с шизофрения и биполярно разстройство тип I. В представеното проучване не са открити статистически значими разлики в броя на хребетите на пръстите между пациенти с шизофрения и биполярно разстройство тип I и психично здравите контроли. Пациентите, особено от женски пол, показват по-високи нива на ФА в броя на гребените на пръстите в сравнение с лицата от контролната група.

Получените резултати потвърждават хипотезата, че ФА при броя на хребетите на пръстите изглежда биологичен маркер, който може да помогне да се

предскажат индивиди, чувствителни към развитие на шизофрения и биполарно разстройство тип I. (*публикация 7*).

8. Дерматоглифни черти на дланта на пациенти с шизофрения и здрави контроли.

9. Идентифициране на Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) малки РНК молекули в паразитното растение *Orobanchе ramosa* посредством микро РНК специфичен майкроарей анализ

Основният принос на представената научна разработка е постигнатото успешно идентифициране на PSTVd специфични малки интерфериращи РНК молекули, резултат от пост-транскрипционният генен сайлънсинг и тяхното успешно картиране по геномната РНК верига на PSTVd. Пост-транскрипционният генен сайлънсинг (PTGS) при растенията се разглежда като защитен механизъм срещу патогени, включващо нахлуване на вируси и вироиди, транспозони и трансгени. Процесинга на двуверижни РНК до 21-24 нт. РНК дуплекси (малки интерфериращи РНК) чрез РНКаза III тип, Dicer-подобни (DCL) ензими е ключова стъпка от този процес. В представеното научно изследване интерес представляваше възможността на вироидната (PSTVd) геномна РНК молекула да предизвиква генен сайлънсинг при паразитно растение *O. ramosa*. Поради това беше проведено инфектиране на паразитното растение *O. ramosa*, при гостоприемник домати, с Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd), последвано от провеждането на микро РНК специфичен майкроарей анализ. Наличието на малки интерфериращи РНК, получени от PSTVd, е установено чрез микро РНК специфичен майкроарей анализ. (*публикация 9*).

10. Детекция на Potato Spindle Tuber Viroid варианти произлизли от паразитното растение *Phelipanche ramosa* в цветни части на *Solanum lycopersicum*

За пръв път е изследвано придвижването и репликацията на PSTVd от инокулирания лист до цветни части на домати посредством използването на няколко паралелно проведени молекулярни анализа: Northern blot, RT-PCR и секвениране с последващ геномен анализ на PSTVd изолатите; доказано е

присъствие и репликация на PSTVd KF440-2 изолат във венчелистчета на домати, като същото е потвърдено за чашелистчета на домати; доказано е, че PSTVd вариантите (G241-C, C208-U) изолирани от паразитното растение *P. ramosa* подобно на KF440-2 са способни да се придвижват и размножават в чашелистчета и венчелистчета на домати (*публикация 10*).

Наскоро описахме три нововъзникващи варианта на PSTVd в паразитното растение *Phelipanche ramosa* след механично инокулиране с изолат PSTVd KF440-2. Тези мутанти, получени от *P. ramosa*, са означени като варианти на G241-C, C208-U и C227-U PSTVd. Всеки от тези варианти носи единична нуклеотидна субституция в сравнение с последователността PSTVd KF440-2, от която се счита, че са еволюирали. С представените резултати се допълват предходни проучвания върху тези мутанти, като е изследван техният потенциал за заразяване на флоралните органи на домати растения. Установихме, че вариантите на PSTVd G241-C и C208-U са в състояние да се възпроизвеждат в системни листа и флорални органи на домати растения, докато вариантът PSTVd C227-U не показва способност за реализиране на системна инфекция. Освен това, анализа на потомството на тези варианти на PSTVd в чашелистчета и венчелистчета на домати растения показва стабилност на специфичните мутации (G241-C, C208-U). (*публикация 10*).

11. Сравнителен експресионен анализ на човешки ендогенни ретровирусни елементи в периферна кръв при деца със специфично езиково нарушение

Това е първото по рода си научно изследване насочено към изучаването на профили на експресия на човешки ендогенни ретровирусни елементи (HERV) при пациенти със специфично езиково нарушение. Представеното проучване идентифицира диференцирано експресирани HERV елементи в периферната кръв на деца със специфично езиково нарушение, в сравнение с деца от контролната група. Специфичното езиково нарушение е психиатрично състояние със сложна етиология и съществена генетична основа, която засяга способностите на децата за вербална комуникация. В представеното (*публикация 11*).

В представеното проучване беше изследвана експресията на пет различни човешки ендогенни ретровирусни елемента (HERV) в кохорта от 25 деца със специфично езиково нарушение и 25 здрави деца от контролната група. Човешките ендогенни ретровирусни елементи, разнообразна група повтарящи се

ДНК последователности, могат потенциално да причинят значителна генетична хетерогенност. Те са били интегрирани в генома на нашите предци през цялата еволюция и сега се състоят от около 8,0% от човешкия геном. Няколко HERV локуса се транскрибират в различни типове клетки. Експресията им в периферната кръв и в мозъка се променя при много неврологични и психиатрични заболявания. В изследването бяха установени два ретровирусни гена: HERV-K (HLM-2) gag и HERV-P env които показват по-ниски нива на експресия в кръвните проби при деца със специфично езиково нарушение в сравнение с тези в контролна група. *(публикация 11)*.

12. Честоти на фетални хромозомни аберации, открити чрез амниоцентеза: нашият 15-годишен опит

В проучването се предоставя важна информация за пренаталната генетична консултация на семейства с повишен риск за целите на пренатална грижа и профилактика по време на бременност. Целта на настоящото проучване е да оцени ретроспективно 15-годишен опит с пренатална цитогенетична диагностика чрез амниоцентеза, като се фокусира върху индикациите и честотата на хромозомни аномалии. Настоящото проучване включва пренатален цитогенетичен анализ от 564 амниоцентеза, извършен в отделението по медицинска генетика, Университетска болница „Свети Георги“, Пловдив между януари 2000 г. и декември 2014 г. *(публикация 12)*.

Сред клиничните показания, аномални резултати от скрининг на майчин серум (54,96%; 310/564) е най-честата индикация за амниоцентеза. Хромозомни аномалии са открити в 5,5% (31/546) от случаите. Структурните пренареждания са най-честите открити аномалии (16/31; 51,61%) с преобладаване на балансиранни аберации 11 случая. Най-високата честота на откриване на хромозомни аберации е в случаите на амниоцентеза поради известна фамилна анамнеза за хромозомна аномалия (15,1%), последвано от абнормна фетална ултразвукова находка (7,69%), резултати от пренатален скрининг на майката с повишен риск (4,52%) и напреднала възраст на майката (3,28%). *(публикация 12)*.

13. Цитогенетичен анализ на пациенти с първична аменорея

Първичната аменорея е едно от често срещаните репродуктивни разстройства, засягащи жените. Това води до липса на менархе в репродуктивната възрастова група при жените и/или пълно отсъствие на репродуктивни органи. Физиологията на менструацията и репродукцията има силна корелация с експресията на X хромозомата. По този начин ролята на клиничните генетици по отношение на диагностиката, оценката на риска, генетичното консултиране и манажирането на пациенти с първична аменорея и техните семейства е от съществено значение. Генетичният принос свързан с аменореята се изследва както на клетъчно, така и на молекулярно ниво, насочен към хромозомни аномалии и генни мутации. (*публикация 13*).

В настоящото проучване беше извършен хромозомен анализ при 140 пациенти, с първична аменорея, използвайки техника на GTG бендинг. Получените данни за кариотипа разкри 67,4% (n = 95) с нормален хромозомен състав и 32,6% (n = 46) лица с хромозомни аномалии. При пациенти с аномални хромозоми 20% (n = 9) показват числени аберации, 22% (n = 10) показват структурни аномалии, 43% (n = 20) мозаечен генотип и 15% (n = 7) от случаите - мъжки кариотип. В допълнение, участието на Y хромозома и произхода на маркерната хромозома е потвърдено чрез прилагане на флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) при четирима пациенти. (*публикация 13*).

14. Пренатална диагностика на тризомия 3q с бащин произход

Балансираните хромозомни транслокации обикновено нямат фенотипна проява, но водят до повишен риск от спонтанен аборт и живо раждане на хромозомно небалансирано потомство при носители. Често пренаталната диагностика на небалансирана транслокация може случайно да открие балансирана транслокация в семейството. Тук докладваме уникален случай на тризомия 3q (кариотип 46, XYder (3) t (3; 21) (q11; p11)), открит пренатално поради аномални находки на плода, установени чрез ултразвукова оценка като забавяне на растежа, вермална агенезия, микрогнатия, кистозна хигрома на шията, дистра позиция на *arcus aortae*, по-къса за гестационните седмични кости. За да се определи бащинството на тази хромозомна аберация, бяха извършени цитогенетични анализи на родителите. При проведеното изследване е идентифицирана балансирана транслокация по бащина линия 46, XY, t (3; 21)

(q11; p11). По време на следващата бременност също се идентифицира идентична балансирана транслокация от бащин произход. Този случай демонстрира значението на пренаталния ултразвуков скрининг на плода; необходимостта от цитогенетичен анализ на плода с пренатални ултразвукови аномалии; генетично консултиране на такива семейства с цел пренатална грижа и профилактика по време на следваща бременност. (*публикация 14*).

15. Рядък случай на пръстеновидни 22 хромозоми

Пръстеновидните (ринг) хромозоми (22-ра) са редки цитогенетични находки, първият случай е описан от Weleber и съавтори. през 1968 г. оттогава има около 70 подобни регистрирани случая. В научната публикация е представен случай на дете с леко интелектуално увреждане и умерено забавяне на езиковото развитие, лека мускулна хипотония и лек дисморфизъм с пръстен 22 хромозома, доказана с цитогенетичен анализ и молекулярно-генетичен анализ (FISH).

Представеният в публикацията пример е първият докладван случай на пръстеновидна 22-ра хромозома в България. Представеният случай потвърждава ролята на ранното генетично консултиране за деца с интелектуални затруднения с неизвестна етиология. (*публикация 15*).

16. Разстройство от аутистичния спектър (РАС) – клинично-диагностични и научно-изследователски аспекти

Разстройство от аутистичния спектър (ASD) е нарушение на централната нервна система, характеризиращо се с нарушения в комуникацията и социалната реципрочност. Въпреки многото проучвания по тази тема, етиопатогенезата на този тип нарушения остава неясна, с изключение на общоприетото убеждение, че те произтичат от взаимодействие между няколко гена и околната среда. Целта на този преглед е да обобщи ключовите констатации от генетичните изследвания, които показват, че аутизмът е комплексно разстройство в резултат на комбинацията от генетични и негенетични фактори.

17. Изследвания свързани с диференциална експресия на протеин-кодиращи гени при деца със специфично езиково нарушение и разстройство от аутистичния спектър

Разстройствата от аутистичния спектър се характеризират с дефицити в социалните и комуникативни взаимодействия и стереотипно поведение, интереси и дейности. Специфичното езиково нарушение се характеризира с несъразмерно забавено развитие на речта с нормален невербален интелект. Напредъкът в областта на молекулярната генетика дава възможност за провеждането на мащабни анализи на генна експресия, които помагат да се оценят възможните транскриптомни вариации при тези разстройства. В посоченото проучване бяха анализирани профилите на генната експресия в комплексни проби за всяка група включена в изследването. Чрез провеждане на секвениране беше получена информация за количествената промяна в експресията на протеин-кодиращи гени. Въз основа на проведенния експресионен анализ бяха идентифицирани диференцирано експресирани гени със статистически значима промяна ($p < 0,01$ и $FDR < 0,001$). (*публикация 16*).

18. Понижена експресия на миРНК let-7b-3p и let-7d-3p в периферна кръв на деца с разстройство от аутистичния спектър

Благодарение на динамичната природа на кръвният транскриптом, разбирането на профила на експресия на миРНК гени при аутизъм се разглежда като обещаваща стратегия за откриване на свързани с болестта гени и биологични пътища. Целта на това проучване е да идентифицира промените в експресията на миРНК гени при деца с РАС в сравнение с контролна група от популацията. Прилагайки микро РНК (LC Science) профилиране на експресия в периферна кръв е демонстрирана промяна в експресията на миРНК молекули (миРНК let-7b-3p и let-7d-3p) при пациенти с диагнозата РАС. Установени бяха промени в експресията на миРНК молекули които могат да допринесат за определяне на етиологията, генетиката и наблюдавания клиничен фенотип. (*публикация 17*).

II. МЕТОДИЧНИ ПРИНОСИ

Разработена е методика за неинвазивно идентифициране на пола на фетуса от бременни жени с гестационна възраст между 11-та и 13-та седмица.

Специфична амплификация на всички използвани маркери SRY1 и SRY2, DYS14, AMELY и AMELX, специфични маркери, беше потвърдено чрез анализ на кривите на топене.

Разработената беше стратегията, за предварителна амплификация на (Y-специфични маркерни последователности, последван от анализ на кривите на денатурация на qPCR), и амплифицира специфичните за Y-хромозома AMELY, SRY1, SRY2, DYS14 и AMELY маркери последователности.

Етап на предварителна амплификация на специфични за Y-хромозома маркерни последователности, последван от анализ на кривите на денатурация на qPCR, беше приложен за откриване на последователности специфични за SRY и DYS14 гените, както и специфична за Y-хромозома маркерна последователност на AMELY гена.

Полът на плода се определя във всяка проба от наличието или отсъствието на усилване на последователността SRY1 и SRY2, DYS14, AMELY и AMELX.

Идентифицирането на пола на плода беше успешно постигнато чрез прилагането на разработената методика във всички случаи чрез предварителна амплификация на SRY1, SRY2, DYS14 и X / Y хомоложни области на гена амелогенин.

Фетуси от мъжки пол (n = 18) бяха идентифицирани чрез откриване на Y-специфични последователности AMELY, DYS14, SRY1 и SRY2 заедно със специфичния за X хромозомата продукт на AMELX гена като контролна проба. *(публикация б).*

III. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

Разработената методика, базирана на използването на сцфДНК в майчиния серум спомага за получаването на ранни данни за пола на плода като по този начин притежава потенциала да намали необходимостта от провеждането на инвазивни процедури при бременни жени, носители на X-свързани разстройства. *(публикация б).*

IV. ПРИНОСИ В ОБЛАСТТА НА УЧЕБНО-ПРЕПОДАВАТЕЛСКАТА ДЕЙНОСТ

- 1. Разработване и издаване на учебник като самостоятелен автор по медицинска молекулярна диагностика за студенти в „ОКС“ магистър „Приложна молекулярна биология“**

Учебник по МОЛЕКУЛЯРНА МЕДИЦИНСКА ДИАГНОСТИКА Автор: Тихомир Върчев ISBN:978-619-202-638-7

Учебника по МОЛЕКУЛЯРНА МЕДИЦИНСКА ДИАГНОСТИКА включва седем глави:

Глава 1. Хромозомни аберации, цитогенетични и молекулярно- генетични методи за детекция

Глава 2. Генетична оценка, генетично консултиране и репродуктивни възможности

Глава 3. Типично Менделово унаследяване

Глава 4. Неменделов тип унаследяване

Глава 5. Атипично Менделово унаследяване

Глава 6. С крининг за заболявания и носителство

Глава 7. Медицинска генетика на популациите

В учебника по молекулярна медицинска диагностика са разгледани основните типове структурните аберации като анеуплоидии, полиплоидии, транслокации, дубликации инверсии и съответните цитогенетични и молекулярно-генетични методи за детекция на хромозомни аберации като флуоресцентна *in situ* хибридизация, спектрално кариотипиране и др., за целите на идентифициране на хромозомния произход на комплексни структурни пренареждания. Обърнато е внимание върху спецификата на ДНК-базирани методи като: Мултиплексна лигазно-зависима амплификация (*Multiplex Ligation-*

Dependent Probe Amplification, MLPA), Сравнителна геномна хибридизация (*CGH Array comparative genomic hybridization*) при идентифицирането на съответната генетична патология. Акцентирано е върху специални точки при провеждането на медикогенетично консултиране, изграждане на семейна история и родословие, получаване на подходяща информация и съвет относно наследствени заболявания с основна цел да позволи вземане на информиран избор при репродукция. Описани са различни методи свързани с идентифицирането на генетична патология включващи, пренаталните диагностични техники които могат да бъдат разделени условно на две големи групи: инвазивни и неинвазивни. Техники за пробовземане като амниоцентеза, биопсия на хорионни вѐси кордоцентеза, ембрионална кожна биопсия. Описани са техники за анализ на феталният геном като подходи за идентифициране на генома на плода чрез оценка на родителските хаплотипи. Молекулярно-генетични техники за пренатално откриване на моногенни заболявания като детекция на свободно циркулираща фетална ДНК и РНК и предимплантационна генетична диагностика. Обърнато е внимание върху мултифакторни заболявания и анализа на генетичните фактори отговорни за развитието на мултифакторни черти. митохондриални заболявания. В отделна глава в ъчебника е обѐрнато специално внимание на ситуации на атипичното Менделово унаследяване свързани с Псевдоавтозомно унаследяване, Автозомно доминантно унаследяване с полова ограниченост, Псевдодоминантно унаследяване Х-свързано доминантно унаследяване с особености, Болест на Хънтингтън, спиноцеребеларна атаксия тип 1, мозаицизъм. В последната глава на учебника са описани едни от най-често използваните подходи за пренатален и неонатален скрининг на специфични генетични състояния. Представени са примери за ситуации, в които се изследва носителство при възрастни индивиди. Този подход не е подходящ за всички генетични заболявания тъй като за провеждането му е необходимо да бъдат спазени определени принципи. Разгледани са случаи при които генетични заболявания са добре дефинирани, но поради факта, че те са твърде редки провеждането на скрининг на цялата популация при тях е неаргументирано.

2. **Разработване на практически упражнения и участие в издаване на ръководство** по медицинска молекулярна генетика за студенти в „ОКС“ бакалавър по Молекулярна биология и „ОКС“ бакалавър по „Медицинска биология“.

Ръководство: МЕДИЦИНСКА МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА Авторски състав: **Тихомир Въчев**, Николай Попов, Младен Найденов, Данаил Минчев. Пловдивски Университет "Паисий Хилендарски" ISBN:978-619-202-607-3 В ръководството са разгледани основните молекулярни механизми, които са в основата на развитието на генетичните заболявания, както и основните принципи на методите за цитогенетична и молекулярно-генетична диагностика на хромозомни, моногенни и мултифакторни заболявания, както и техните механизми на патогенеза. Ръководството по „Медицинска молекулярна генетика“ съдържа набор от протоколи, предвидени за провеждане на лабораторни занятия с образователно-квалификационна степен „Бакалавър“ по дисциплината „Молекулярна генетика“ със специалност „Медицинска биология“ и „Молекулярна биология“ на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

3. **Разработване на практически упражнения и издаване на ръководство като самостоятелен автор по молекулярна биология за студенти в „ОКС“ магистър “Репродуктивна биология“**

Ръководство: МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ Автор: **Тихомир Въчев** Пловдивски Университет "Паисий Хилендарски" ISBN: 978-619-202-629-5 Специализираната научна тематиката включена в настоящото ръководство по Молекулярна биология отговаря на съвременните нововъведения в областта на молекулярната биология. Ръководството има за цел да разшири кръгозора на студентите, редовна и задочна форма на обучение в квалификационните степени „Бакалавър“ и „Магистър“ в областта на съвременната молекулярна биология. В ръководството са разгледани основните молекулярни механизми, които са в основата на развитието на генетичните заболявания, както и основните принципи на методите за работа в областта на молекулярната биология. Настоящото ръководство по молекулярна биология съдържа набор от протоколи, предвидени за провеждане на лабораторни занятия с образователно-квалификационна степен „Бакалавър“ по дисциплината „Молекулярна генетика“ със специалности „Медицинска биология“ и „Молекулярна биология“ на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“. Ръководството също така е предназначено за провеждане на лабораторни занятия със студенти в образователно-квалификационната степен

“Магистър” по „Приложна молекулярна биология“ с дисциплина „Медицинска молекулярна диагностика“, ОКС „Магистър“ по „Медицинска биология“ по дисциплина „Молекулярна генетика“ и образователно-квалификационната степен “Магистър” по „Репродуктивна биология по дисциплина „Молекулярна биология.

4. **Разработване на практически упражнения и участие** в издаването на учебното помагало по молекулярна вирусология за студенти в „ОКС“ бакалавар по Молекулярна биология и „ОКС“ бакалавар по „Медицинска биология“ и „ОКС“ бакалавар Биоинформатика.

Ръководство: МОЛЕКУЛЯРНА ВИРУСОЛОГИЯ, Авторски състав Марияна Гозманова, Гергана Захманова, **Тихомир Въчев**, Десислава Иванова, Иван Минков; Пловдивски Университет “Паисий Хилендарски” ISBN: 978-954-423-917-6. Описани и систематизирани са методи за изолиране, пречистване и анализ на вирусни и вироидни геноми, които могат да се прилагат в лабораторни упражнения по Молекулярна вирусология и използват от студенти и/или млади учени занимаващи се с научно-изследователска работа в областта на молекулярната вирусология.

5. **Издаване на книга на базата на дисертационен труд:** Взаимодействие между вироид *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd), паразитно растение - *Orobanche ramosa* и домати като техен гостоприемник

Книга: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ВИРОИД POTATO SPINDLE TUBER VIROID (PSTVD), ПАРАЗИТНО РАСТЕНИЕ - OROBANCHE RAMOSA И ДОМАТ КАТО ТЕХЕН ГОСТОПРИЕМНИК ISBN 978-619-202-640-0 Автор: **Тихомир Въчев**

6. **Издаване на книга на базата на дисертационен труд:** Анализ на експресионния профил на некодирани микро РНК гени при пациенти с шизофрения

Книга: АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИЯ ПРОФИЛ НА НЕКОДИРАЩИ МИКРО РНК ГЕНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ШИЗОФРЕНИЯ ISBN 978-619-202-639-4

Автор: **Тихомир Въчев**

Издаване на собствен монографичен труд: Разстройства от аутистичния спектър през погледа на съвременната медицина, бъдещи терапевтични перспективи и молекулярно-генетични аспекти на изследване Автор: **Тихомир Въчев ISBN: 978-619-202-637-0**

7. **Активна самостоятелна работа със студенти, довела до разработване и защита на дипломни работи (9 дипломанта).**
8. **Активна съвместна работа с докторанти като научен ръководител (2 докторанта), довела до провеждането на научни изследвания свързани с разработването на темите на докторските им програми и публикуване на изискуемите публикации свързани със защита на дисертационен труд. (Към момента 2 докторанта отчислени с право на защита).**

Изготвил: **гл. ас. д-р Тихомир Илиев Въчев**

(ПОДПИС)