



РЕЦЕНЗИЯ

от

Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн

Институт по молекулярна биология, БАН

на дисертационен труд за присъждане на научната степен „Доктор на науките“
в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“,
професионално направление 4.3. „Биологически науки“ (Молекулярна биология)

Автор: Гл. ас. Д-р Тихомир Илиев Вълчев, ПУ „Паисий Хилендарски“

Тема: „Сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невроразвитийни разстройства,“

1. Предмет на рецензиране

Със заповед № Р33-5262 от 29.10.2020 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невроразвитийни разстройства“ за придобиване на научната степен „Доктор на науките“ на ПУ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“ професионално направление 4.3. „Биологически науки“ (Молекулярна биология). Автор на дисертационния труд е гл. ас. д-р Тихомир Илиев Вълчев от Катедра: „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при БФ на ПУ.

Представеният ми комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл.45 (4) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита;
- автобиография (европейски формат);
- копие от дипломи за образователната и научна степен „доктор“ – 2 бр;
- протоколи от катедрени съвети, свързани с разкриване на процедурата и предварителното обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации свързани с дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на минималните национални изисквания;

2. Кратки биографични данни

Тихомир Вълчев е роден на 09.01.1981 г. Възпитаник е на БФ на ПУ „П. Хилендарски“, откъдето през 2005 г. получава бакалавърска степен по „Биология“ и магистърска по „Молекулярна биология и биотехнологии“ (2008 г.). До 2011 г. е редовен докторант при катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“, където под научното ръководство на проф. дбн Иван Минков разработва и успешно защитава докторска дисертация по специалността „Молекулярна биология“. От 2013 г. е докторант по „Генетика“ в МУ - Пловдив, откъдето през 2016 г. придобива втора докторска степен по „Генетика“. От 2007 г. д-р Вълчев работи в Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при БФ на ПУ, където последователно заема длъжностите биолог, асистент и главен асистент.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Дисертационният труд на гл. ас. Т. Вълчев е посветена на молекулно-генетичното охарактеризиране на група широко разпространени невро-психични заболявания, познати като разстройства от аутистичния спектър (РАС) и шизофрения. До неотдавна тези болести представляваха интерес само за невролози и психиатри, но с напредъка на молекулярната биология и генетиката, те станаха обект на изследване и от страна на молекулярни биолози и генетици. Така се доказва, че аутизма и свързаните с него синдроми имат наследствена основа. Доказателство за това е и факта, че вероятността за развитие на заболяването при едно-йичните близнаци е над 90%, а при разнотичните е близка до тази на контролите. Именно това е мотивирало д-р Вълчев да посвети своя дисертационен труд на търсенето на молекулярни маркери за диагностика и прогноза на РАС и шизофрения.

Целта на дисертацията е формулирана кратко и общо: *Провеждане на сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невноразвитийни разстройства.* Поставените задачи обаче са значително по-конкретни и от тях става ясно, че докторантът възнамерява да проведе мащабно изследване върху диагностицирани пациенти, което включва сравнителен експресионен анализ на белтък-кодиращи гени; сравнителен експресионен анализ на микро-РНК (миРНК) молекули; сравнителен протеомен анализ (iTRAQ); цялостно екзомно секвениране; ROC анализ на диференциално експресирани белтък-кодиращи гени и миРНК и др.

Имайки предвид голямата социална значимост на изследваните болести, тяхната хетерогенност и трудностите при диагностицирането им, то актуалността на избраната дисертационна тема не подлежи на съмнение.

4. Познание на проблема

Съдейки по литературния обзор, който обхваща около 100 страници, докторантът е отлично запознат с литературата по разработваната тема. Голяма част от обзора е посветен на етиологията на шизофренията и болестите от аутистичния спектър, с акцент върху молекулярно-генетичните основи на тяхната патология. Разгледани са предполагаемите фактори свързани с тези заболявания, като възраст на родителите (по конкретно на бащата); фактори на външната среда; пренатални и перинатални фактори (пренатален и преморбиден стрес); усложнения по време на бременността; нутригенни фактори; употреба на психоактивни вещества и др.

Критично са анализирани основните патогенетични хипотези за възникване на шизофренията и РАС, като глутаматергична, допаминергичната и ГАМК-ергичната хипотези. В отделен раздел са разгледани и молекулярно-генетичните находки свързани с изследваните разстройства, а именно скаченост на гени, структурни генни вариации, брой на генните копия и др. Наред с генетичните, са разгледани и някои епигенетични фактори свързани с шизофренията и аутизма, а именно ДНК-метирирането и хистоновите модификации, както и промените в имунния транскриптом на мозъка, активирането на майчината имунна система и пр. Особено внимание е отделено на дисрегулацията на генната експресия под въздействие на малките РНК (миРНК), върху които пада и тежестта на експерименталната част на дисертацията. Тук докторантът дава обща характеристика на миРНК молекулите и описва взаимодействията им с иРНК молекули, която води до промяна в генната експресия на транскрипционно и транслационно ниво. Проследена е и връзката между клетъчните и свободно циркулиращи миРНК молекули с невропсихиатричните разстройства, в аспект на приложението им като биомаркери за шизофрения и аутизъм. Във връзка с последното са разгледани и някои методични и технологични аспекти на миРНК анализа.

Въз основа на задълбочения и творчески анализ на обемистата литература, докторантът е намерил своята изследователска ниша и е формулирал точно целите и задачите на своята дисертация.

5. Методика на изследването

Методичният раздел обхваща 70 стр. и включва подробно описание на многобройните методи, а именно: изолиране и количествен анализ на РНК и ДНК от периферна кръв; ДНК и РНК секвениране от следващо поколение; цялостно екзомно секвениране с цел откриване на мутации в белтък-кодиращи гени асоциирани с РАС; qRT-PCR анализ на експресионен профил на ми-РНК молекули и протеин-кодиращи гени свързани с РАС; биоинформатичен анализ на резултатите от секвенирането; анализ за генно покритие и нива на генна експресия; идентифициране на диференцирано експресирани гени; генно онтологичен анализ на диференциално експресирани гени и KEGG анализ на биологичните пътищата обогатени с такива гени; количествен протеомен анализ (ITRAQ) и др. Изброените методи са адекватни на поставените цели и задачи, а някои от тях се прилагат за първи път у нас.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Рецензията дисертационен труд обхваща 391 стандартни страници и съдържа 89 фигури, 17 таблици и повече от 600 литературни източници. Той е построен по класическата схема: Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и Дискусия, като се забелязва известна диспропорция в разпределението на материала между отделните раздели. Така например, Литературен обзор + Материали и методи = 170 стр., докато Резултати + Дискусия + 72 обемисти фигури и таблици + големи празни пространства между тях = 140 стр.

Със своята дисертация Т. Вълчев си поставя за задача да хвърли повече светлина върху молекулните основи на етиопатогенезата на аутизма и шизофренията. Техният материален субстрат е човешкия мозък, но поради невъзможност да се използват мозъчни биопсии за анализ, докторантът търси неинвазивни подходи, като заменя мозъчните проби с периферна кръв, отчитайки всички условности и артефакти произтичащи от този подход. Компромисът с неточността на стратегията би се оправдал само в случай, че се намери корелация между някоя от изследваните молекулни проби (било като структура/секвенция или ниво на експресия) и съответното психично разстройство. Тогава тя би се превърнала в безценен диагностичен и прогностичен маркер за РАС и/или шизофрения.

В изпълнение на поставените цели д-р Вълчев и колегите му от МУ-Пловдив, съставят група от 40 деца с диагноза РАС и 30 здрави индивиди (контроли), от които събират периферна кръв. От нея изолират нуклеинови киселини за три вида молекулярно-биологични изследвания: а) пълно екзомно секвениране на белтък-кодиращи ДНК последователности; б) сравнителен количествен анализ (ITRAQ) на диференциално експресирани протеини; в) експресионен анализ на миРНК молекули.

Пълното екзомно секвениране е осъществено чрез така нареченото „Секвениране от следващо поколение“ (NGS), проведено *de facto* в лабораториите на Oxford Gene Technology, Ltd. Както следва да се очаква, секвенционният анализ разкрива множество протеин кодиращи гени асоциирани с РАС, чийто мутации могат да имат сериозни биологични последици за носителите. Мутациите са отнесени към четири категории: а) поява на нов терминаращ кодон (засягащ гените MOB3C, REG4, PDE4DIP, RHBG, OR10X1, FMO6P, CAPN8, TSSC1); б) загуба на терминаращ кодон (FEZ2, GBA3, ADH1C, MATN2, NANS, ACTN3, NF1); в) несинонимни замени (SPATA3, SLC22A1, ADCK5, NLRC5, APOBR, NUDT11); г) изместване рамката на четене (CDCP2, CASP9, HRNR, ATG3, NOP16, FGFR4). Обобщено може да се каже, че геномът на пациентите с РАС съдържа многобройни генни варианти на протеин кодиращи гени, чието задълбочено изучаване може да спомогне за изясняване на етиологията, патогенезата и диагностиката на заболяването.

Проведен е и количествен сравнителен анализ на диференциално експресирани протеини при РАС чрез ITRAQ метода. По този начин са идентифицирани общо 351 протеина, 60 от които са диференциално експресирани в пациентската група. От тях 24 са с повишена и 36 с понижена експресия. Гъм групата на последните се отнасят гените на серпин-2, интерлевкин-1, IgJ, ангиогенин, фибулин-5, аполипопротеини C2, C4 и F, периостин, миозин-9,

плетин-2 и др. Измежду диференциално експресираните протеини изпъкват такива, които участват в регулацията на Notch сигналния път, вродения имунен отговор (активацията на комплемента), сглобяването и позиционирането на нуклеозомите, направляването на аксоните, метаболизма на холестерола, транспорта на липопротеини и холестероловия ефлукс, активирането на Т клетките и др. Получените резултати имат главно потвърдителен характер.

Многобройни литературни данни сочат, че в основата на РАС и шизофрения стоят нарушения в невроналната пластичност, които пък са асоциирани с нарушения в миРНК медираната пост-транскрипционна регулация в мозъчните неврони. Именно това е мотивирало докторанта да предприеме мащабно изследване на общия експресионен профил на миРНКи изолирани от периферна кръв. За целта е приложено „РНК-секвениране от ново поколение“ с използване на сборни (pool) миРНК проби. Така са идентифицирани 42 миРНКи, от които 29 са с понижена, 11 с повишена и 2 с непроменена експресия при деца с РАС. От тях 8 миРНКи имат особено силно изразена дисрегулация. Проведеният с тях qRT-PCR анализ показва, че някои, като например миРНК-424-5p и миРНК-500a-5p са асоциирани с РАС. Доказано е, че контролираните от тях иРНКи вземат активно участие в мозъчните процеси, а миРНК-500a-5p е асоциирана и с карцином на черния дроб.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Изследванията свързани с дисертационния труд на д-р Т. Вълчев имат фундаментален характер, но са с подчертана приложна насоченост. Неговата крайна цел е да намери молекулни маркери и да разработи неинвазивен (или малко инвазивен метод) за диагностика на аутизъм и шизофрения. На този етап повечето от получените резултати имат потвърдителен характер, но има и такива, които обогатяват познанията ни относно молекулярно-генетичните основи на двете психични заболявания. Въпреки че понастоящем докторантът не е идентифицирал надежден биомаркер, имаме всички основания да очакваме, че такъв ще бъде намерен измежду стотиците генни варианти, дисрегулирани протеини и миРНКи описани в неговата дисертация.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертацията са публикувани 9 статии, от които 6 в национални и 3 в международни научни списания, в които докторантът е водещ (първи или последен) автор. От статиите в национални списания 4 са във Folia Medica (Q3, SJR 2017 = 0.21) и 2 в Доклади на БАН (Q2, SJR 2017 = 0.21), а от тези в международни списания 2 са в Balkan J Med. Genetics (Q4, SJR 2017 = 0.2) и 1 в Biodiscovery (без Q и SJR). Сумарният SJR от всички статии е 1.66. Съгласно приложената справка, те са цитирани 56 пъти. Към документите не са представени данни за изнесени доклади и представени постери.

Оценката ми за трудовете свързани с дисертационния труд е, че те са недостатъчни като брой и са публикувани в ниско рейтингови списания, което прави автора малко забележим на международната научна сцена.

9. Лично участие на автора

Съдейки по лидерското място на докторанта в публикуваните статии приемам, че преобладаващата част от постиженията на дисертацията са негово лично дело.

10. Автореферат

Авторефератът следва схемата на дисертацията и отразява адекватно нейната същност.

11. Критични забележки и препоръки

Във връзка с рецензирания дисертационен труд имам следните забележки:

- Обемът на дисертацията е силно раздут за сметка на разделите Литературен обзор и Материали и методи. Докато вторият раздел е съществен за дисертациите за ОНС „доктор“, то за „доктор на науките“ той би трябвало да съдържа цитати на използваните методи, но не и подробно описание, както е в конкретния случай.
- Липсва раздел Изводи. В моята дългогодишна практика на рецензент, това е първият случай на дисертация без формулирани изводи.
- Приносите са лошо и неадекватно формулирани. Не мога да приема за научен принос: „Успешно е приложена технологията за секвениране от ново поколение *Whole-Exome Sequencing*“ и „Успешно е приложена технологията за секвениране от ново поколение *RNA-Sequencing*“.
- Повечето от резултатите имат потвърдителен характер. Липсва отчетлив научен и приложен резултат.
- Трудовете свързани с дисертацията са твърде малко (9 бр.) за „доктор на науките“. Статиите са малко и на фона на големия обем на дисертацията (почти 400 стр.). Друга тяхна слабост е ниският им SJR (едва 1.66). Незадоволителен е и техният отзвук в световната литература.
- Списъкът на цитиранията не е изготвен по правилата. Даден е списък с 56 линка, които не се отворят от компютри без IP в Scopus.
- В дисертацията се откриват много машинописни, граматически и стилови грешки, което създава впечатление за небрежност и усещане за предпоследна редакция.

12. Лични впечатления

Познавам Тихомир Вълчев от времето на неговата докторантура, когато бях избран за рецензент на първата му докторска дисертация (2011 г.). Оттогава наблюдавам професионалното му развитие и сега го поздравявам за неговото постоянство и упоритост в професионалното израстване.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

В дисертацията на д-р Вълчев са описани многобройни гени асоциирани с РАС, чиято структура, транскрипционна или транслационна активност е различна от тази на изследваната контролна група. На този етап те не могат да бъдат използвани като диагностични маркери, но тъй като темата е актуална, бих посъветвал докторанта да продължи изследванията си върху малка група от тези молекули избрани въз основа на тяхната екстремност в отклоненията от съответните контроли. Те трябва да бъдат изследвани и на индивидуално (а не pool) ниво, с цел да се оцени индивидуалното, а не средното отклонение от нормата. Най-надеждните от тях следва да се нормализират и спрямо вече утвърдени в практиката биохимични показатели.

14. Обобщена оценка за покриване на националните минимални критерии

Обобщената оценка за покриване на минималните национални изисквания за научната степен „Доктор на науките“ в направление „Природни науки“ съгласно Правилника за прилагане на ЗРАСРБ е представена в долната таблица:

Показател	Изискуем минимум	Реален брой точки
А: Показател 1	50	100
Б: Показател 2	100	100
В: Показатели 3 и 4	-	-
Г: Показатели 5-10	100	124
Д: Показател 11	100	112
Е: Показатели 12-	-	-

Общо	350	436
------	-----	-----

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на гл. ас. д-р Т. Вълчев е посветена на молекулно-генетичното охарактеризиране на разстройства от аутистичния спектър (РАС) и шизофренията, и търсенето на молекулни маркери за тяхното диагностициране. За целта е изследвана група пациенти с диагноза РАС, от чиято периферна кръв са изолирани нуклеинови киселини за анализ чрез пълно екзомно секвениране на белтък-кодиращи гени, сравнителен анализ на диференциално експресирани протеини и миРНК и др. Така са идентифицирани множество гени и миРНКи асоциирани с РАС, чиято структура/секвенция и ниво на експресия се различава от тази на контролната група. Получените резултати имат предимно потвърдителен характер. Въпреки че на този етап не е намерен надежден диагностичен маркер, изследванията хвърлят допълнителна светлина върху молекулната етиопатогенеза на изследваните болести и в това се състои техния научен принос. Резултатите от изследванията са отразени в 9 научни статии с общ SJR =1.66, които са цитирани 56 пъти. Намирам тази наукометрия за твърде ниска, но тъй като комплексно докторантът покрива минималните национални изисквания (436 т. при изисквани 350 т.), препоръчам на уважаемото Научно жури да му присъди научната степен „Доктор на науките“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Молекулярна биология“.

11.12.2020 г.

Рецензент:

/Акад. проф. дбн Иван Г. Иванов/