

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Надежда Петрова Маджирова, ДМ, ДМН,

хоноруван преподавател към ПУ „Паисий Хилендарски” - Пловдив

на Тихомир Илиев Въчев, гл. асистент към ПУ – „Паисий Хилендарски”, Пловдив, Биологически факултет, Катедра Физиология на растенията и молекулярната биология за присъждане на научна степен „доктор на науките”, Област на висше образование: 4 „Природни науки, математика и информатика” Професионално направление: 4.3. „Биологически науки” Научна специалност: „Молекулярна биология”

Тема на дисертационния труд: СРАВНИТЕЛНИ ГЕНОМНИ, ТРАНСКРИПТОМНИ И ПРОТЕОМНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ НЕВРОРАЗВИТИЙНИ РАЗСТРОЙСТВА

1. Предмет на рецензиране

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен Катедрен съвет на „Катедра Физиология на растенията и молекулярна биология” към Биологическия факултет на ПУ - „Паисий Хилендарски”.

2. Кратки биографични данни

Общо представяне на докторанта - Тихомир Въчев е роден през 1981 г., завършва „Бакалавър – биология” (2001-2005) и магистър – „Молекулярна биология и биотехнологии“ към ПУ - „Паисий Хилендарски“. Трудовият му стаж започва от 2007 г. в същия университет. Заемал е длъжността Биолог младши експерт ПУ „Паисий Хилендарски“. 2012 - Докторска степен – „Молекулярна биология“ ПУ „Паисий Хилендарски“, 2013 - Докторант – „Медицинска генетика“. 2016 - Докторска степен – „Генетика“ към Медицински Университет – Пловдив. Основните предмети и застъпените професионални умения са в областта на Молекулярната биология, Генетика, Вирусология, Молекулярна генетика, Регулация на генната експресия.

Други насоки на научните му интереси са: епигенетика на някои психични разстройства (аутизъм и шизофрения); молекулярни аспекти на психичните заболявания. Тук имам пряко наблюдение от проявения ентузиазъм, усърдие и изключителното научно мислене при съвместните разработки с д-р Николай Попов (мой докторант). Направи ми впечатление невероятният ентузиазъм, с който двамата работеха – те приключиха след година и половина, при възможност работата да продължи 3 години. Може би още тогава у него е проблеснала мисълта да се насочи към генетичните прояви у някои психични заболявания – РАС и шизофрения.

Представеният от Тихомир Въчев комплект материали на електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита;
- автобиография в европейски формат;
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование (ОКС „магистър”);
- протоколи от катедрени съвети, свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат (на английски и на български);
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за покриване на минималните национални изисквания в направление 4.3. Биологически науки. за придобиване на научната степен „доктор на науките”

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

Значимост на изследвания проблем:

Акцентът на изследователския замисъл в представения дисертационен труд е поставен върху съвременни молекулярно генетични въпроси при невноразвитийните разстройства и в частност РАС и шизофрения. Към момента стотици милиони хора по света страдат от психични заболявания. При 10 до 20% от младите хора се откриват проблеми с психичното здраве като тези проценти са по-високи сред категориите в неравностойно положение. Психичните разстройства и самоубийствата са източник на големи страдания за лицата, семействата и общността. От друга страна, психичните разстройства представляват една от основните причини за инвалидност и са тежест за системите за социална защита, здравният сектор и секторът на образованието, икономиката и пазарът на труда.

4. Познаване на проблема

През последните близо седемдесет години етиологичните парадигми в психиатрията показват значително развитие, успоредно с концепцията, че когнитивните и поведенчески разстройства имат органична "ЦНС - базирана" етиология. През 1980 г. аутизмът се класифицира като разстройство на развитието като се приема тезата за неговата биологична природа. Терминът генерализирано (первазивно) разстройство на развитието (pervasive developmental disorders (PDD)) се въвежда по-късно в диагностичния и статистически наръчник на психичните разстройства - III (DSM), включено в Международната класификация на болестите - 10 (МКБ, ICD).

Диагнозата РАС е характерна за всички расови, етнически и социално икономически групи. Диагнозата се среща пет пъти по-често при момчета, отколкото при момичета. Преди 1990г., повечето проучвания, съобщават за общо популационна честота от 4 - 5 на 10 000 (1/2000-1/2500). През последните няколко години в световен план се докладва повишена честота на нарушенията от аутистичния спектър. Според Центъра за контрол на заболяванията (CDC) и Мрежата за мониторинг на аутизма (ADDM) в САЩ 1 на 88 деца са диагностицирани с РАС.

Шизофренията съществува от дълбока древност. На нея е посветена огромна литература и почти няма неизследвана област за изясняване на етиологията и патогенезата. Провеждани са редица клинични, микробиологични, хронобиологични, имунологични, бактериологични, инфекциозни, вирусни, химични, биохимични, ензимни, генетични, епигенетични и много други изследвания. През последните няколко десетилетия усилията на генетици и психиатри са насочени към търсене на генетични/епигенетични фактори за отключването ѝ. Повечето психиатри са наблюдавали фамилии с подчертана обремененост. Към 2011 г. шизофренията засяга около 0,3 – 0,7% от хората в определен период от живота им или 24 милиона души по света. Заболяването засяга 1,4 пъти по-често мъжете и се проявява по-рано (между 20 - 28 г), отколкото при жените (между 26 - 32 г.). Това определя и значимостта на темата.

Наличието на стандартизирани методики за характеризирание и профилиране на иРНК молекули (RNA Seq) и миРНК молекули (Small RNA sequencing) както и бързи и универсално приложими подходи за количествен анализ (количествен RT-PCR) подсказва че съвременната наука притежава нови методични подходи за изследване на патогенезата на заболяванията които са с потенциал да детайлизират познанията ни в областта. През последното десетилетие се натрупаха редица доказателства подкрепящи хипотезата, че нарушената регулацията на миРНК регулаторните мрежи може да стои в основата на невроразвитийните разстройства. Поради факта, че миРНК могат да бъдат опаковани в екзосоми и микровезикули и по този начин секретирани в извън клетъчните флуиди, те могат да циркулират в телесните течности и да се транспортират до отдалечени тъкани и органи. Част от представените резултати в това проучване обхваща експресионни изследвания на серумни миРНК молекули при индивидуален анализ на пациенти с диагноза РАС в сравнение с контролна група от здрави деца.

5. Методика на изследването

Основните цели при настоящото изследване са:

Основната цел посочена в дисертационният труд описана като провеждане на сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невроразвитийни разстройства може да бъде подразделена на няколко основни цели:

1. Да се потвърдят установени геномни варианти характерни за РАС в изследваната кохорта, показващи тенденция и подкрепящи хипотезата за генетична хетерогенност при РАС.
2. Да се идентифицират специфични геномни варианти в анализираната извадка от пациенти с диагноза РАС, които не са установени до момента. По отношение на поставената първа цел в проучването, получените данни подкрепят съществуването на патогенетични мутации в изследваните извадки някои от тях характерни за РАС.
3. Да се идентифицират кандидат миРНК молекули в анализираната извадка от пациенти с диагноза РАС. По отношение на поставената втора цел в проучването, получените данни подкрепят съществуването на диференциално

експресирани миРНК молекули в изследваните извадки някои от които са характерни за РАС.

4. Да се идентифицират кандидат иРНК молекули в анализираната извадка от пациенти с диагноза РАС които са характерни за РАС.
5. Да се идентифицират кандидат иРНК молекули в анализираната извадка от пациенти с диагноза шизофрения.
6. Да се идентифицират специфични белтъчни молекули в анализираната извадка от пациенти с диагноза РАС

За да отговори на така заложените цели в научната разработка, дисертанта поставя следните задачи:

1. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на белтък-кодиращи гени (RNA Sequencing) при РАС.
2. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на малки РНК молекули (Small RNA sequencing) при РАС.
3. Провеждане на сравнителен протеомен анализ – Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification (ITRAQ) при РАС.
4. Провеждане на мащабно екзомно секвениране (Whole Exome Sequencing) при РАС.
5. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на белтък-кодиращи гени (Digital Gene Expression) при шизофрения.
6. Провеждане на сравнителен експресионен (qRT-PCR) анализ на белтъккодиращи гени при РАС.
7. Провеждане на сравнителен експресионен (qRT-PCR) анализ на миРНК при РАС.
8. Провеждане на сравнителен експресионен (qRT-PCR) анализ на белтъккодиращи гени при шизофрения.
9. Провеждане на ROC (Receiver Operating Characteristic) анализ на диференциално експресирани белтък-кодиращи гени и миРНК молекули при РАС и шизофрения.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Тъй като разработката на дисертацията е интердисциплинарна, което личи и в избора на рецензенти от различни университети и дисциплини, по отношение на тази част от труда не бих могла да дам компетентен отговор, защото приложените методи не са в моята квалификация.

Искам обаче да подчертая, че постановката по отношение на избора на пациентите, приложените клинично-психологични и диагностични тестове, както и оценяването на пациентите са адекватни, правилно подбрани и използвани. Не трябва да се пренебрегва и високия професионализъм на екипа осъществил изследването на контингента.

Представената дисертация се състои от 391 стандартни машинописни страници разпределен както следва:

Съкращения: 11-13 стр.;

Въведение: 3 стр.;

Литературен обзор – 100 страници. Тази част е доста подробно написана, като са обхванати водещите световни теоретични виждания за шизофренията, БАР и аутизма, които са задълбочено коментирани. Дисертантът обсъжда генетичните, епигенетични, пренатални и натални фактори на шизофренията и аутизма, възрастта на родителите, особено на бащата, фамилната обремененост. Коментира различни патогенетични хипотези при шизофренията (ГАМК, глутаматергични, допаминаергични, анализи на скаченост, вариации в броя на копията, гени и локуси, хистонови модификации, проучване на протеин кодиращи гени, активиране на майчината имунна функция, както и общата характеристика на РНК молекулите и т.н.). При аутизма авторът акцентира на социалните дефицити и поведенчески теории с различните хистологични и биохимични промени, Са сигнализации, огледални неврони, влиянието на околната среда, вит. Д и фолиева киселина, хромозомните аберации, броя на копията, свръхпредставеност на редки варианти на мутации и мРНК-молекулите като биомаркери.

Струва ми се, че разглеждането на БАР с голям депресивен епизод не се налага или просто може съвсем бегло да се спомене. Неоспорим факт е, че при това разстройство участват различни гени, което обяснява и разнообразната клинична картина.

Мнение – нямам специални критични бележки по отношение на терминологията и изложените теоретични аспекти на шизофренията и аутизма. Сред много изброените хипотези не се споменава за хронобиологичната теория на шизофренията, според която има подчертана десинхроноза на биологичните ритми. Тази теория е тясно свързана с генетика – делението на клетките е кодирано и при ендогенните психози се наблюдава избързване/изоставане или десинхроноза на биологичния часовник. Струва ми се, че споменаването на БАР и големия депресивен епизод, трябва да е съвсем кратко, въпреки че при това разстройство участват различни гени. Смятам, че тази част би могла да бъде по-кратка. Несъмнен обаче е фактът, че дисертантът е направил много пълна и задълбочена справка, с която му е трудно да се раздели.

Литературни източници: броят на използваната литература е представителен (666 автора само на латиница). Мисля, че ако авторите бяха номерирани, при цитирането им би се съкратил обема на страниците. Спазена е коректността при цитирането на авторите. Включени са и български автори работещи в чужбина в тази област.

Стилът е подчертано научен, изискан, ясен и точен, няма неуместно използвани изрази и граматически неточности. Много рядко срещнах грешки, които не считам за правописни, а по-скоро за грешка при натискане на съседна буква от клавиатурата - напр. стр. 8, 2-ри абзац ...съвременни, вместо съвременния, стр. 9 (14 ред отгоре пацитета, вместо пациента), втория ред отдолу (значения, вместо значение), стр. 11 (4 ред отгоре: Дизайнът на **на**), 12 ред отгоре (новите критериите, вместо критерии), Фиг. 31, стр. 218 (Кръгово, вместо Кръгова), фиг. 36, стр. 226 (Разлика в нивото на **на....**). Тези дребни и незначителни грешки не снижават стойността на дисертационния труд.

Материали и методи: обхваща 65 страници (128-195 стр.).

Дизайнът на настоящото проучване и формата за информирано съгласие са били одобрени от комисията по научна етика към МУ - Пловдив. Писмено информирано съгласие е било получено от 33 болни, в ДПБ - Пазарджик и 25 здрави доброволци. Провели са Mini-International Neuro-psychiatric Interview и рутинен психиатричен и соматичен преглед. Интервюто е извършено от сертифициран психиатър, а оценка на

диагнозата параноидна шизофрения е осъществена на базата на DSM IV -TR (Диагностичен и статистически наръчник на психичните разстройства - IV преработено издание) с цел изключване на каквито и да е други психични разстройства при контролите. При всичките включени пациенти е поставена консенсусна диагноза - шизофрения съгласно международната класификация DSM-IV (American Psychiatric Association. 1994; Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, 4th ed.). *Задължителен критерий за включване в извадката е участниците да не са приемали никаква терапия (дори и психотропна) в рамките на 1 месец преди вземане на кръвните проби.* Лицата с други хронични медицински и настоящи остри соматични/неврологични заболявания, злоупотреба с алкохол или наркотична зависимост са изключени от извадките.

Дизайнът на проучването и формата за информирано съгласие са одобрени от етичната комисия към МУ - Пловдив. Приложен е Mini-International Neuropsychiatric Interview, рутинен психиатричен преглед от сертифициран психиатър и пълни анамнезни данни на базата на критериите (DSM IV – TR; Диагностичен и статистически наръчник на психичните разстройства, IV - то преработено издание) с цел изключване на каквито и да е други психични разстройства при контролите. Пациентите в настоящето проучване са подбрани в рамките на проект “Аутизъм и специфично нарушение на развитието на речта – сравнителни геномни изследвания за идентифициране на обща патогенетична основа” No ДФНИ-Б01/21 към Катедрата по Педиатрия и Медицинска генетика, МУ –Пловдив. Проект “Анализ на експресионния профил на небелтък кодиращи – микро РНК гени при шизофрения” и съответно проект „Изследване на серумните нива на микро РНК биомаркерни молекули при деца с аутизъм с цел създаване на платформа за целите на неинвазивната молекулярна диагностика на аутистично болни” № НО-12/2013.

В представеното проучване са включени 40 деца с генерализирано разстройство на развитието, на възраст от 3 до 11 години (средна възраст на извадката е 6,86). За целите на изследването са използвани диагностичните критерии на DSM IV-TR и на пациентите е поставена диагноза съобразно класификацията на Американската Психиатрична Асоциация. За потвърждаване на диагнозата РАС при всеки пациент е извършено подробно психиатрично изследване с прилагане на ADI-R, CARS и GARS. След публикуването на DSM 5 диагнозата РАС е препотвърдена съгласно новите критериите. В контролната група са включени 30 здрави деца на възраст от 3 до 11 години (средна възраст на извадката е 6,43), след подписване на информирано съгласие от родителите.

Авторът подробно описва методът на вземане на кръв, начина на засекретяване на пробите, екстракция на тотална РНК от периферната кръв, изолирането на проби от тоталната РНК чрез прилагането на PAXgene Blood miRNA Kit. Екстракция на тотална ДНК от периферната кръв с помощта на QIAmp DNA Blood Mini Kit Spin протокол (Qiagen). Принципът на процедурата и отделните етапи са последователно и пълно описани в подробен за целта протокол, а резултатите са представени в таблици 8 (стр. 146-148), 9 и 10, Авторът използва методът на полимеразна верижна реакция в реално време Real-Time qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR) може да бъде използван за количествен, полуколичествен и качествен анализ. Методът

позволява надеждна детекция и измерване на генерираните PCR продукти при всеки цикъл от процеса на полимеразна верижна реакция. Всеки етап от осъществяването им, както и прилаганата методика и апаратура са прецизно подбрани и подробно описани. Получените резултати са представени в нагледни фигури. Накрая приключва със стандартен и детайлен биоинформатичен анализ. Авторът осъществява секвениране на РНК (Транскриптомен анализ - Методика) и прави качествена оценка и филтриране на данните от секвенирането, количествен анализ на генната експресия и изследване на генното покритие, както и нивата на генната експресия. Количествен протеомен анализ – Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ) при PAC, на фиг. 13 (стр. 175) посочва принципа на провеждане на количествения протеомен анализ (iTRAQ) анализ, като изтъква предимствата на iTRAQ метода.

Според авторът_трудоемкият подход за пълното секвениране на всички кодиращи региони има потенциала да се превърне както в клинично значимо за генетичната диагностика изследване, така също и за идентифицирането на варианти в ДНК с потенциално значим патологичен ефект при заболявания с все още неизвестна етиология. Целта на този подход е идентифицирането на функционални промени в генома, които са отговорни за развитието на специфична патология. Масштабното екзомно секвениране бързо се превръща в техниката на избор при нужда от идентифициране на нови генетични вариации, които стоят в основата на заболявания, като редица форми на рак, така и редица психиатрични заболявания като шизофрения, PAC и др.

Една основна характеристика на идентифицирането на специфични ДНК варианти (SNPs, и др.) чрез използването на технологиите за секвениране от следващо поколение се крие в това, че методите включват вариабилни на редица нива при провеждането на анализа, които подлежат на корекции от все по-оптимизирани математически програми и алгоритми за анализ.

Валидиране на данните от проведения транскриптомен анализ се осъществява с помощта на количествен Real-Time PCR анализ. На индивидуален количествен Real-Time PCR анализ били подложени 5 диференциално експресирани гени във всички проби от пациенти с диагноза шизофрения и контролна група от здрави лица. Промяната в генната експресия е анализирана чрез използване на $2^{-\Delta\Delta CT}$ метода.

Резултати: обхващат 72 страници (196-268 стр.)

Обобщеният анализ на получените данни от **пълното екзомно ДНК секвениране** демонстрира наличие на мутации при PAC групата, водещи до формирането на нефункционални протеини. Основните мутации могат да бъдат разделени в няколко отделни категории:

1. Мутации, водещи до поява на терминаращи кодони,
2. Мутации, водещи до загуба на терминаращи кодони,
3. Мутации, водещи до появата на сериозни несинонимни замени,
4. Мутации, свързани с изместване на рамката на четене (frameshift mutation) – делеции или инсерции.

В групата от деца с диагноза PAC прави впечатление, че мутациите, водещи до **формирането на стоп кодони** са свързани с гени като MOB3C (MOB kinase activator 3C), асоцииран със свързването на метални йони. Cytochrome P450 Family 4 Subfamily B Member 1 (CYP4B1), ген кодиращ член от цитохром P450 суперфамилията от ензими. Протеините на цитохром P450 катализират реакции,

свързани с метаболизма на лекарствени препарати и синтеза на холестерол, стероиди и други липиди.

Мутациите, водещи до **загуба на стоп кодони** включват гени като: Fasciculation and elongation protein zeta 2 (FEZ2), свързан с невроналното свързване, Actinin alpha 3 (ACTN3), асоцииран с невроналната свързаност, Neurofibromin 1 (NF1), свързан с неврофиброматоза тип 1 и синдромен аутизъм.

Дисертантът установява 337 мутации в гени, водещи до изместване на рамката на четене между които са гени като: Caspase 9 (CASP9), от групата на каспазите, Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3(ATG3), убиквитин-подобен конюгиращ ензим, Fibroblast Growth Factor Receptor4 (FGFR4-фибробластен растежен фактор 4) и др.

От проведеният ITRAQ протеомен анализ дисертанта демонстрира наличието на диференциално експресирани протеини между анализирани групи.

От iTRAQ-LC-MS/MS анализа са идентифицирани общо 351 протеина. В сравнение с контролната група, са установени общо 60 диференциално експресирани протеини, включително 24 с повишена експресия и 36 с понижена експресия. Установените протеини с понижена експресия включват: SERPINE2 Glia-derived nexin (GDN), интелектин 1, имуноглобулин J, ангиогенин, фибулин, аполипопротеин С-II, аполипопротеин С4 (APOC4), аполипопротеин F, комплемент С4-А протеин, периостин, миозин-9, пластин. Докато протеини с повишена експресия включват: Аполипопротеин С-II, Аполипопротеин С4 (APOC4), Аполипопротеин F, както и редица белтъчни компоненти на системата на комплемента: Комплемент С4-А протеин, Комплемент С1q субкомпонент субединица А и др. Авторът е показал и анотация по клъстери от ортоложни групи от протеини (Clusters of Orthologous Groups of Proteins (COG), генно онтологичен (GO) анализ на диференциално експресирани протеини които са прекрасно онагледени в няколко кръгови диаграми.

От проведеният анализ на миРНК експресионният профил чрез секвениране на малки РНК молекули при РАС дисертантът демонстрира наличието на диференциално експресирани малки РНК молекули (експресионния профил) при РАС в сравнение с контролна група деца в периферна кръв показва наличието на специфични промени характерни за разстройството. Авторът представя данни от стандартен биоинформатичен анализ за профилиране от малките РНК молекули по референтният геном. Накрая авторът представя резултати от проведеният индивидуален анализ на експресионния профил на миРНК молекули от периферна кръв и серум при деца с диагноза РАС. Така проведеното проучване представя доказателство, че периферната кръв е подходяща и лесно достъпна тъкан (материал) за изучаване на динамиката в експресията на кандидат биомаркери при РАС.

В резултатите от проведеният транскриптомен анализ чрез секвениране на РНК (RNA-Sequencing) при РАС дисертантът демонстрира наличието на диференциално експресирани малки РНК молекули (експресионния профил) при РАС. Двадесет и два РНК транскрипта показват диференциална експресия със статистическа значимост $p < 0,001$, $FDR \leq 0.001$ и $\log_2 \geq 1$. При десет гена авторът установява

повишено ниво на експресия, докато други 12 гена показват понижени нива на експресия. Допълнително валидиране на данните от проведеният транскриптомен анализ автора осъществява с помощта на количествен Real-Time PCR анализ. На индивидуален количествен Real-Time PCR анализ той подлага 10-те диференциално експресирани гени във всички проби от децата с диагноза РАС и контролна група от здрави деца.

Резултати от проведеното транскриптно профилиране на белтък-кодиращи гени в периферна кръв при шизофрения

След проведения предварителен широкомащабен експресионен анализ (DGE) между анализирани групи дисертанта идентифицира значителен брой диференциално експресирани гени при шизофрения (гени с повишена експресия бяха 1012, и съответно 2582 гена с понижена експресия). От получените предварителни данни от DGE анализа дисертантът подлага на индивидуален анализ кандидат гени показали най-големи промени в профила на експресия. За да оцени характеристиката на диференциално експресирани гени, DICER, FEZ1, DRD4, GRIN2 като потенциални биомаркери при шизофрения, дисертантът извършва ROC анализ за определяне на диагностичната точност на изследваните белтък-кодиращи гени. Диагностичната чувствителност на DICER, FEZ1, DRD4 и GRIN2D гените е определена съответно на 72,4%, 55,2%, 86,2% и 48,3%, със съответна специфичност оценена на 83,3%, 87,5%, 91,7% и 83,3%.

Дискусия:

Дискусията обхваща 64 страници (269-334 ст).

Изложената в настоящата дисертация научна разработка е първото по рода си комплексно научно изследване, което обхваща сравнителни геномни транскриптомни и протеомни изследвания, проведени върху клинично подбрана група от български пациенти с диагноза РАС и сравнени с контролна група от здрави лица. Авторите са търсели връзка на редица кандидат гени с някои заболявания. В разработката детайлно се разглежда общият експресионен профил на миРНК молекули в периферна кръв от пациенти с РАС. Посредством метода на секвениране на малки РНК молекули се намира промяна в експресията на голям брой миРНК молекули. Използваният подход допринася за разбирането на ролята на миРНК молекулите и свързаните с тях биологични процеси в етиопатогенезата на РАС. Нов акцент в изследванията на биомаркерите при шизофрения и РАС е подходът базиран на изследване на молекулярния профил на биомолекули от периферни тъкани и по специално миРНК молекули в периферна кръв, отразяваща физиологичното състояние. Използването на миРНК специфичен qRT-PCR анализ потвърждава, че дисрегулацията на миРНК молекулите играе известна роля в патогенезата на РАС.

Въпреки че кръвта не е идеалната тъкан за изследвания при РАС, периферната кръв, която е лесно достъпна обикновено е обект на изследване при невроразвитийни разстройства за изследвания – т.е. транскриптомното секвениране на кръвни клетки е от съществено значение за поставянето на диагноза при пациенти с диагноза РАС.

В допълнение интегративният подход също дава възможност за идентифициране на редки наследени варианти с функционални последици, които биха могли да допринесат

за развитието на фенотипа. Интегративните анализи на геномни и транскриптни данни може да се окажат важни за разгадаването на механизма на мултифакторните заболявания. Д-р Въчев допуска, че екзомното секвениране може да подобри диагностицирането на проблемните случаи.

Използвания протеомен подход предоставя окуражаващи предварителни данни които трябва да спомогнат за стимулиране на продължаващото търсене на етиопатологията при РАС и новите терапевтични подходи чрез изследване на периферна кръв. Оказва се, че мозъчната тъкан не е особено подходяща в търсенето на биомаркери с цел профилактика, диагностика на РАС в клиничната практика. Представеният анализ може да бъде разглеждан като предварително пилотно изследване, което би изисквало разширяване на извадката, както и допълнително индивидуално валидиране на установените протеини при РАС.

Получените данните демонстрират подчертана хетерогенност, връзката на имунната система, дисрегулацията на основни клетъчни процеси и доказателства за мултифакторния модел в патогенезата на РАС.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

По отношение на приносите с научно-методологичен характер във своята работа дисертанта успешно прилага технологията за секвениране от ново поколение “Whole-Exome Sequencing“ за анализ на генетичната вариабилност в кодиращите области на гените при пациенти с диагноза РАС. Също така успешно са приложени и технологиите за секвениране от ново поколение “RNA-Sequencing“ и “Small RNA-Sequencing“ за идентифициране на диференциално експресирани белтък-кодиращи и мРНК гени при пациенти с диагноза РАС.

За да се изследват и евентуални промени на белтъчно ниво настъпващи при пациенти с РАС е приложена технологията за провеждане на сравнителен протеомен анализ „Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification (ITRAQ)“ за анализ на протеомният профил при пациенти с РАС. Докато за целите на идентифицирането на диференциално експресирани белтък-кодиращи гени при пациенти с диагноза шизофрения дисертанта успешно прилага технологията Digital Gene Expression Tag Profiling (DGE). Създадената колекция от ДНК образци от пациенти с диагноза РАС и шизофрения, както и съответните им кохорти от здрави лица представлява съществен принос с приложен характер, предоставящ възможност за по-мощни бъдещи генетични проучвания в областта.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Списъкът на публикациите приложени към процедура за придобиване на научна степен „доктор на науките“ включва 9 публикации, в български и международни списания. Квartilите на публикациите са отчетени съответно метриката на научните издания реферирани във Scopus Scimago Journal Rank (SJR) <https://www.scimagojr.com/journalrank.php>

Две от публикациите са със Q2, четири със Q3 и две с Q4. Едно от списанията (Biodiscovery) в което дисертанта има публикация не притежава квантил, но поради връзката си с темата на дисертационния труд публикацията е представена в списъка с публикации. При кандидата са спазени минимални изисквани точки по групи показатели за научна степен „доктор на науките”, – от необходимите 350 точки по показателите А, Б, Г, Д – кандидатът има 432 точки.

9. Лично участие на автора

Считам за основен личният принос на дисертанта като се позовавам на факта, че във всички от посочените публикации свързани с дисертационния труд дисертанта е водещ автор.

10. Автореферат

Авторефератът е оформен според изискванията в структурен, съдържателен и технически аспект на български и на английски език. Авторефератите със своето съдържание отразява точно и разкрива основните моменти и идеи в дисертацията. В представените автореферати на български и на английски език са представени най важните резултати от проведеното изследване. Представените автореферати са изготвени според съответните изискванията.

11. Критични забележки и препоръки

Критични бележки – струва ми се, че обемът на дисертацията е доста голям, което си обяснявам с направената огромната литературна справка по проблема, с която му е трудно да се раздели.

Препоръка – авторът би могъл да помисли този огромен и оригинален труд, единствен по рода си у нас, да бъде издаден като книга на базата на защитен дисертационен труд, за да се ползва от повече учени в областта на медицината, психиатрията, генетиката и биологията.

12. Лични впечатления

Накрая искам да акцентирам на факта, че Гл ас. д-р Тихомир Вълчев има две дисертации за научната степен „Доктор”, едната от които е свързана с епигенетиката при шизофренията. Дисертационният труд за присъждане на научна степен „доктор на науките” е разработен самостоятелно и не повтаря темата и значителна част от съдържанието на труда, представен за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Гл ас д-р Вълчев е участвал и в предходни съвместни проучвания с д-р Николай Попов, свързани с епигенетиката при аутистични деца. Използваният контингент от пациенти и контролна група лица и приложените методики в дисертационният труд на д-р Николай Попов не се припокриват с методиките и публикациите представени в настоящата дисертация.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Изследванията в областта на миРНК биологията все още са в начален стадий. Ролята на миРНК при психиатричните разстройства, включването на мета-анализи на миРНК, обхващащи генетични вариации, експресия и биологична функция, ще предоставят допълнително ценна информация за потенциалната роля на миРНК молекулите при РАС и някои психиатрични разстройства по отношение на тяхната диагноза, етиология и патогенеза. Биомаркерите, базирани на миРНК молекули могат да бъдат много полезни при разграничаване на различни подтипове психиатрични разстройства. Съвременните разбирания относно транскриптомното профилиране, базирано на RNA-Seq подхода, както и технологията за секвениране от ново поколение “Whole-Exome Sequencing“ разкрива полезността си при идентифицирането на генетични варианти при РАС. МиРНК несъмнено се оказват обещаващи при диагностиката на нарушения на ЦНС както и за оценката на свързаната с тях терапия. Ролята на миРНК при психиатричните разстройства е интензивно поради непрекъснатото подобряващи се подходи за изследване.

Бих допълнила, че при шизофренното разстройство участват не стотици, а хиляди гени. Генетичните механизми на шизофренията десетилетия наред са били загадка и въпреки новите открития те продължават да са пълна загадка. За учените е почти невъзможно да обяснят механизмите на гените - кое ги отключва и защо са толкова упорити, след като болните рядко оставят поколение. Учените засега са установили, че една от причините за разстройство на психиката се дължи на загубата или дублирането на множество гени. При деленето на клетките, понякога хромозомите обменят идентични участъци - плюс-минус няколко гена. Това, което е интересно за тези специфични делеции и дупликации, е, че голяма част от тях всъщност не са наследствени. Те се причиняват поради нови мутации, т.е. родителите им ги нямат и се причиняват мутации в детето. И напълно е възможно, някои от промените да са обратими. Не случайно психиатрите са наблюдавали шизофренни пациенти само с един единствен пристъп през целия си живот. Така, че е доста странно, тези огромни делеции и дупликации всъщност теоретически да са податливи на терапия. Многобройните изследвания показват, че едни и същи мутации са причина за възникването не само на шизофренията, но и за други заболявания като аутизма и различни нарушения в умствената дейност.

Положителното е, че дисертантът отваря врата за бъдещи проучвания в тази насока с цел доизясняване патогенезата на децата с РАС. В тази насока, бъдещите изследвания в областта биха могли да се фокусират по отношение на Множество гени, обект на регулация от изследвани в предходни проучвания миРНК молекули, които имат участие в неврологични заболявания и психични разстройства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Кандидатът Гл ас. д-р Тихомир Въчев след подробна литературна справка надгражда това, което е било постигнато до момента. От разработката на материала проличава, че той притежава задълбочени теоретични и практически познания по съответната специалност и е пример за модерно интердисциплинарно проучване. Ангажирането на специалисти от различни области показва уменията и способността му за добри организаторски способности и работа в екип. Тези негови качества несъмнено говорят за задълбоченост и самостоятелност при разработването на дисертацията. Проведените с помощта на съвременни методики и най-модерни технологии изследвания са довели до получаването на резултати с подчертан принос за медицината, генетика и психиатрията, част от които са публикувани в престижни международни списания. Целите и задачите, които си е поставил са ясно формулирани и постигнати. Особено съм удовлетворена от факта, че авторът не се задоволява с постигнатото и дава насоки за бъдещи проучвания, на които би могъл да бъде ръководител.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „доктор на науките“ на Тихомир Илиев Въчев, гл. асистент към ПУ – „Паисий Хилендарски“, Пловдив, Биологически факултет, Катедра Физиология на растенията и молекулярната биология в област на висше образование: 4., Природни науки, математика и информатика” Професионално направление: 4.3. „Биологически науки” Научна специалност: „Молекулярна биология”.

23. 12. 2020 г.
Пловдив
дмн

Изготвил рецензията:
Проф. д-р Н. Маджирова,