

СТАНОВИЩЕ

от проф. д.т.н. **Алберт Иванов Кръстанов**, Ръководител катедра "Биотехнология"
Университет по хранителни технологии (УХТ) - Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на научна 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 Въчев** - Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“.
Тема на дисертационният труд: „Сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невроразвитийни разстройства„

1. Общо представяне на процедурата и дисертанта

Тихомир Илиев Въчев е роден през 1981г. в гр. Кърджали. През 1999 г. завършва средното си образование в природо-математическа гимназия СОУ „Отец Паисий“ - Кърджали. Придобива диплома за висше образование бакалавър по „Биология“ през 2004 г. в Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски, след което и диплома за магистър по „молекулярна биология и биотехнологии“.

През 2007 г. постъпва на работа като биолог младши експерт в ПУ „Паисий Хилендарски“ катедра "Физиология на растенията и молекулярна биология. Започва работа като асистент през 2011 г. През 2011 г, успешно защитава дисертация в докторска програма молекулярна биология - Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

През 2013, кандидата печели конкурс за главен асистент към катедра "Физиология на растенията и молекулярна биология "ПУ "Паисий Хилендарски. През 2016 г. защитава и докторска степен по „Генетика“ в Медицински Университет – Пловдив. Като университетски преподавател извежда лекции по въведение в молекулярната биология в бакалавърска специалност „молекулярна биология“, и практически занятия по регулация на генната експресия, молекулярна вирусология и молекулярна генетика както и лекции по молекулярна медицинска диагностика в магистърска специалност приложна молекулярна биология.

Гл. ас. д-р Тихомир Въчев е участвал, представяйки Пловдивския университет и по специално Биологическият му факултет, в десетки научни форуми у нас и в чужбина. Гл. ас. Тихомир Въчев е участник в научните колективи на десетки университетски и национални проекта. Към настоящият момент е автор на 38 научни публикации, с *h*-индекс - 8. Автор е на 2 учебни пособия за студенти.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен Катедрен съвет (Протокол №10/29.11.2019) на „Катедра Физиология на растенията и молекулярна биология“ към Биологическия факултет на ПУ - „Паисий Хилендарски“.

Изследванията включени в дисертационния труд са финансирани в рамките на следните проекти:

- „Анализ на експресионния профил на небелтък кодиращи – микро РНК гени при шизофрения“ № НО-4/2011;

- „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;
- „Изследване на метилационния статус на кандидат гени асоциирани с разстройството от аутистичният спектър с цел изясняване на епигенетичните механизми участващи в патогенезата му “№ НО-09/2014“
- “Аутизъм и специфично нарушение на развитието на речта – сравнителни геномни изследвания за идентифицирането на обща патогенетична основа” № ДФНИ-Б01/21

Представеният от гл. ас. д-р 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“);
- заповед за зачисляване в докторантура;
- 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 спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;

2. Актуалност на тематиката

Според данни на Световната Здравна Организация (СЗО) стотици милиони хора по света страдат от психични заболявания. Това включва инвалидизиращи заболявания като шизофрения, разстройство от аутистичния спектър (РАС), специфично нарушение на развитието на речта (СНРР) и др., които нанасят огромна тежест, загуба на продуктивност на засегнатите пациенти, роднините и здравната система. С термина „разстройства от аутистичния спектър“ (РАС) (Autism Spectrum Disorders – ASD) се означават широк спектър от нарушения на развитието, които се характеризират със сложна и неясна етиология.

Шизофренията е друго тежко мултифакторно психиатрично заболяване с 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 заболявания, което затруднява точното диагностициране. Причините за развитието на шизофренията все още остават неясни, макар да се знае, че тя 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.

Съвременния напредък в областта на молекулярната генетика и биотехнологиите, развитието и прилагането през последните години на нови технологии за секвениране от

следващо поколение като и развитието на аналитичните техники за протеомни анализи, позволи откриването на голям брой молекулярни кандидат биомаркери.

Поради наличието на стандартизирани методики за характеризирани 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 подходът за идентифициране на иРНК и миРНК като потенциални биомаркери от тяхното първоначално идентифициране до индивидуалното им валидиране биха били дори по ефективни в сравнение с подходите за валидиране на традиционалните белтъчни биомаркери.

Протеомиката е друг потенциален подход, който може да генерира нови хипотези от съществено значение при патогенезата и диагностиката на заболяванията чрез идентифициране на кандидат белтъчни биомаркери. Протеомните подходи допълват генетичните и геномните изследвания и така да фокусират вниманието върху белтъчните продукти.

Представените от дисертанта технологии притежават потенциала да поставят основата за началото на ранното диагностично тестване, откриване и оценка на развитието на заболяванията като генерират сведения за патогенезата на разстройствата, всички от които са от съществено значение за успешната диагностика и разработване на бъдещи терапии, особено при пациенти, където навременните терапевтични интервенции са изключително критични.

3. Познаване на проблема

От представената ми за рецензиране дисертация мнението ми относно познаването на проблема е отлично. Дисертанта познава в детайли проблема за което мога да съдя по представената библиография която е изключително подробна. Обзора и дискусиата са написани професионално и подробно като позволяват по етапно навлизане в детайлите на тематиката. В дисертацията се цитират и дискутират съвременни хипотези и мнения по въпроса свързани с етиологията и патогенезата на невроразвитийните разстройства, съвременното им ниво на изследвания както и насоките за бъдещи изследвания. Допълнителен фокус е направен и относно нивото на съвременните молекулярно-генетични изследвания в областта. С всичко казано до тук считам, че дисертанта познава в детайли проблема което ми дава правото да го определя като специалист в областта.

4. Методика на изследването

За да отговори на заложените в научната разработка цели, дисертанта поставя следните задачи, зад изпълнението на които стоят методиките използвани в настоящата работа.

1. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на белтък-кодиращи гени (RNA Sequencing) при PAC.

2. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на малки РНК молекули (Small RNA sequencing) при PAC.

3. Провеждане на сравнителен протеомен анализ – Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification (ITRAQ) при PAC.

4. Провеждане на мащабно екзомно секвениране (Whole Exome Sequencing) при PAC.

5. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на белтък-кодиращи гени (Digital Gene Expression) при шизофрения.

6. Провеждане на сравнителен експресионен (qRT-PCR) анализ на белтък-кодиращи гени при РАС.
7. Провеждане на сравнителен експресионен (qRT-PCR) анализ на миРНК при РАС.
8. Провеждане на сравнителен експресионен (qRT-PCR) анализ на белтък-кодиращи гени при шизофрения.
9. Провеждане на ROC (Receiver Operating Characteristic) анализ на диференциално експресирани белтък-кодиращи гени и миРНК молекули при РАС и шизофрения.

В представеният дисертационен труд авторът подробно описва методът на вземане на кръв, начина на засекретяване на пробите, методите за екстракция на тотална РНК от периферната кръв и метода за екстракция на тотална ДНК от периферната кръв. Принципът на процедурата и отделните етапи са последователно и пълно описани в подробни за целта протоколи, а резултатите представя в таблици. Авторът осъществява секвениране на РНК (Транскриптомен анализ - Методика) като извършва качествена оценка и филтриране на данните от секвенирането, количествен анализ на генната експресия и изследване на генното покритие, както и нивата на генната експресия на кандидат гени.

За допълнително валидиране на получените резултати авторът използва методът на полимеразна верижна реакция в реално време Real-Time qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR) за количествен анализ на получените данни. Методът позволява надеждна детекция и измерване на генерираните PCR продукти при всеки цикъл от процеса на полимеразна верижна реакция. Етапите от осъществяването им, както и приложената методика и апаратура са прецизно подбрани и подробно описани. Получените резултати са представени в нагледни фигури.

За анализ на белтъчния профил при РАС дисертанта използва количествен протеомен анализ – Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ), посочва принципа на провеждане на количествения протеомен анализ (iTRAQ) анализ, като изтъква предимствата на iTRAQ метода за целите на проведеното от него изследване.

Авторът прилага и подход за пълно геномно секвениране на всички белтък-кодиращи области. Според дисертанта, 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 средство за идентифициране 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. Използваното от дисертанта мащабно екзомно секвениране бързо се превръща в техника на първи 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, РАС и др.

Една основна характеристика на идентифицирането на специфични ДНК варианти (SNPs, и др.) при РАС чрез използването на технологиите за секвениране от следващо поколение (NGS) 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, което, разбира се, налага необходимостта те да бъдат допълнително валидирани експериментално.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертантът познава в детайли съвременното състояние на проблема и обширната литература по въпроса. В увода на дисертационния труд той навлиза в проблемите, към които представената научна разработка е насочена, като изтъква тяхната важност и необходимостта от разработване на дисертационната тема. В текста присъстват многобройни таблици и графики, които създават прегледност и информативност на данните от изследването. Проучването на литературата изминава пътя от базисните към конкретните аспекти на научната проблематика по темата на дисертацията. Компетентно са разгледани въпроси, включващи важна информация по отношение на засегнатата проблематика в представения дисертационен труд.

По отношение на формулираните приноси от дисертанта искам да изразя мнението си, че приносите с научно-фундаментален характер са с оригинален характер но също така остават отворени за провеждане на допълнителни изследвания в областта. Тоест предоставят възможност работата да продължи и се развива в различни по специфични насоки от извършените изследвания което считам за допълнителна положителна страна в представената дисертация.

По отношение на формулираните приноси с научно-методологичен характер, използваните методични подходи се вписват много точно в контекста на научната разработка и спецификата на изследваните невроразвитийни разстройства. Считам, за значими приносите с научно-методологичен характер тъй като практически те разкриват определени търсения формулирани от дисертанта като различни цели в направленията в които са проведени изследванията, а именно **геномни** - „Успешно е приложена технологията за секвениране от ново поколение *“Whole-Exome Sequencing“* за анализ на генетичната вариабилност в кодиращите области на гените при пациенти с РАС“; **транскриптомни** - „Успешно е приложена технологията за секвениране от ново поколение *“RNA-Sequencing“* и *“Small RNA-Sequencing“* за идентифициране на диференциално експресирани белтък-кодиращи и миРНК гени при пациенти с диагноза РАС, както и *“Digital Gene Expression Tag Profiling (DGE)“* за идентифициране на диференциално експресирани белтък-кодиращи гени при пациенти с диагноза шизофрения. А така също и прилагането на **протеомни** анализи *„Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification (ITRAQ)“* за проучване на протеомния профил при пациенти с диагноза РАС.

6. Преценка на публикациите и личния принос на дисертанта

Списъкът на публикациите приложени към процедура за придобиване на научна степен **„доктор на науките“** включва 9 публикации, в български и международни списания. Квартилите на публикациите са отчетени съответно метриката на научните издания реферирани във Scopus Scimago Journal Rank (SJR) <https://www.scimagojr.com/journalrank.php>., където две от публикациите представени от дисертанта са със Q2, четири със Q3 и две с Q4. Едно от списанията (Biodiscovery) в което дисертанта има публикация не притежава квартал но поради връзката си с темата на дисертационния труд публикацията е представена в списъка с публикации. Считам за основен личният принос на дисертанта съдейки по факта, че във всички от посочените публикации дисертанта е водещ автор. Следователно основна част от приносите на дисертанта са негово лично дело.

7. Автореферат

Авторефератите със своето съдържание отразяват точно и разкриват основните моменти и идеи в дисертационният труд. В представените автореферати на български и на английски език са представени най важните резултати от проведеното изследване. Представените автореферати са изготвени според съответните изискванията на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Дисертационният труд на гл. ас. Тихомир Въчев е едно действително мащабно научно изследване, което притежава безспорни и значими за теорията и научни достойнства. Авторът би могъл да помисли този дисертационен труд, да бъде издаден под формата на книга на базата на защитен дисертационен труд. Бъдещите изследвания в областта биха могли да се фокусират към изследването на множеството гени (и биологични пътища в които те участват), обект на регулация от изследваните в проучванията миРНК молекули, които имат участие в неврологични заболявания и психични разстройства. 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-мащабни генетични проучвания в съответното направление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на тема „Сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невроразвитийни разстройства“ е задълбочено и оригинално научно изследване с фундаментален и иновативен характер. Научният труд притежава много висок научен и познавателен ефект с безспорни приноси и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Поради гореизложеното, както и поради личните ми впечатления и изследователски качества на дисертанта давам своята положителна оценка за проведеното изследване в представеният дисертационен труд. С убеденост предлагам на специализираното научно жури да присъди на гл. ас. **Тихомир Илиев Въчев**, 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“.

10. 01. 2021 г.

Изготвил становището:

Проф. д.т.н. Алберт Кръстанов