

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Нася Борисова Томлекова

Ръководител на лаборатория по молекулярна биология при Институт по зеленчукови култури „Марица“, Селскостопанска академия

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

по: област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

професионално направление: 4.3 Биологически науки

докторска програма: Молекулярна биология

Автор: Татяна Миладинова Кичукова

Тема: „Сравнителен експресионен анализ на некодирани-микро РНК молекули в периферна кръв и серум при деца с разстройство от аутистичния спектър“

Научни ръководители: доц. д.с.н. Самир Изетов Наимов, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и доц. д.б.н. Тихомир Илиев Въчев, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

1. Общо описание на представените материали

Описание:

Със заповед № Р21-2186 от 22.12.2022 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Сравнителен експресионен анализ на некодирани микро-РНК молекули в периферна кръв и серум при деца с разстройство от аутистичния спектър“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма „Молекулярна биология“. Автор на дисертационния труд е Татяна Миладинова Кичукова – докторант в редовна форма на обучение към катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ на Биологическия факултет, с научни ръководители доц. д.с.н. Самир Изетов Наимов и доц. д.б.н. Тихомир Илиев Въчев от Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Татяна Миладинова Кичукова комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- протокол от катедрения съвет, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- 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 (само за зачислените до 04.05.2018 г. докторанти);

Приложени са 3 броя публикации от докторанта.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Татяна Кичукова се дипломира като бакалавър през 2005 г. със специалност Молекулярна биология в Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“. Има завършен курс на обучение във Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg в Съединените американски щати. Следва магистратура по специалност „Молекулярни биотехнологии“ от 2005 до 2008 г. в Биологическия факултет на Пловдивския университет. Защищава успешно магистратурата с дипломна работа на тема: „Проучване на стабилността на pSK1015 инсърта в активационни мутанти на *Arabidopsis thaliana* (L.), устойчиви срещу паразитни растения от групата на синята китка“. От 2006 г. до сега Татяна Кичукова работи като професионален медицински представител в различни фирми за продажба на медикаменти.

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

Актуалността на разработената тема трябва да се разглежда в теоретичен и в практичен аспект. Актуалността на разработения в дисертационния труд проблем се определя на първо място от неговата значимост за човечеството. Тенденцията на нарастване на разпространението достига до тревожни нива и тя се изразява в 1/100 деца, които са диагностицирани с РАС. Налице са вариации, между социално-демографските групи, преобладава при мъже и др., но никак не е за пренебрегване фактът, че 33% от пациентите с аутизъм са със съпътстващо интелектуално увреждане.

Успоредно с това засегнатите от психиатричното разстройство се увеличават в световен мащаб, включвайки нови региони на разпространението му. Заболяването, описано като спектър, се характеризира с широки вариации на симптомите, създаващи големи затруднения в диагностиката и лечението, което обуславя необходимостта от нови по-задълбочени изследвания. Идентифицирани са няколко важни фактора за подпомагане изясняването епидемиологията на това разстройство на неврологичното развитие. Казано най-общо те са отнасят до разпознаване кои гени участват и как техните променени експресионни профили допринасят за това състояние.

Поради особеностите на развитието на човешкия мозък, най-добрите резултати от ранната интервенция се постигат до 5-годишна възраст, необходими са валидни и надеждни инструменти за ранни изследвания и бърза диагностика.

4. Познаване на проблема

Татяна Кичукова описва последователно, целенасочено и логично свързани частите на литературния преглед. Текстът е без излишни подробности, кратък и стегнат, в същото време и изчерпателен, насочващ към следващите раздели на дисертацията. Граматически изказът е много издържан. Литературната справка се състои от 141 източника на латиница, от които 75, около половината са от последните 10 години, включително от 2022 г. При това, тя е описала заболяването РАС исторически от регистрирането му за първи път от австрийските лекари Kanner и Asperger през 1943 и 1944 г. за деца с нормален (или с по висок) интелект, които показват трудности в общуването и страдат от дефицити в невербалната комуникация. Богатата, добре онагледена и систематизирана информация в представената литература ми дава основание да считам, че докторантката е много добре осведомена по основните постижения по темата, над която работи в дисертационния си труд.

Прегледът на литературата е насочен към променената генетична и епигенетична регулация от аутистичния спектър – фокусът на изследването. Идентифицирани са 102 гена, свързани с регулацията и имунната система. РАС може да бъде причинено от дисрегулация на различни фактори.

Обяснено е използването на обобщаващия термин „разстройство от аутистичния спектър“ (РАС) чрез широките вариации в признаци и симптоми. Добре представена е мултифакторната етиология на РАС. Сложността в изследванията на разстройството произтича от неговата проява след период на типично развитие и не се характеризира с типични и постоянни генетични аномалии, въпреки че са известни няколко единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) свързани с болестта.

В литературния преглед са изброени схематично известните методи за изследване на миРНК като биомаркери, секреция, изолиране, детекция. Схематично са представяни биогенезата, функцията и механизмите на секреция на миРНК.

Т. Кичукова дефинира много добре проблема в диагностиката и терапията на нови изследвания на нарушенията в ЦНС. Тя мотивира необходимостта от определяне връзката между конкретни циркулиращи миРНК и РАС. Комбинирането на различни миРНК-специфични панели от биомаркери и оптимизиране изследването ще подобри точността и ефективността им за ранно диагностициране.

Избрана е конкретна цел – изследване на експресионния профил на миРНК, за да се допринесе в клиничните случаи за откриване на чувствителни и надеждни биомаркери, както и за диагностиката и пренасочване на лечението на РАС.

5. Методика на изследването

Изборът за изследване на миРНК сигнални молекули за междуклетъчна комуникация - нов клас потенциални диагностични биомаркери, е правилен, поради стабилността и специфичността им (тъканна/клетъчна). Благодарение на циркулирането им в различни телесни течности дисертантът се е насочил към най-лесните за изолиране – периферна кръв и серум. Макар и да не кодират протеини, миРНК отговарят за пост-транскрипционната регулация на генната експресия, установено в 60-70% от човешките иРНК, вкл. регулирането на основните биологични процеси, като синаптичната пластичност и развитието, също и диференциацията на ЦНС. Така те имат пряко значение при РАС, тъй като експресията им е тъканно или клетъчно специфична и се променя по време на патологичните процеси.

Избраните изследователски подходи са правилни и методически са издържани. Анализите са усвоени и успешно приложени от докторанта с добре описаните методи, като някои от работните протоколи са оптимизирани. Дори съотношението на изследвани момчета: момичета е съобразено с разпространението на заболяването. Подробно е описано пробовземането, отделянето на венозна кръв и работа със серум, изолирането на РНК и проверка на чистотата ѝ, онагледено много добре. С прецизност е описано и създаването на сборни (пул) проби. Приемам броя на пациентите с РАС, които са включени в изследването, за разлика от здравите пациенти, за получаване на достоверни резултати, доказано по-късно от валидирането на анализите.

Известно е, че при РАС се прилагат различни подходи, респ. методи за установяване профила на миРНК - дълбоко секвениране (секвениране от следващо поколение), (NGS), скъпо струващ анализ за откриване на неизвестни миРНК, както и миРНК майкроарей анализ и количествена полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция (RT-qPCR), вкл. droplet digital PCR (ddPCR) от 2013 г., които детектират вече известни миРНК.

Приложена е Illumina HiSeq платформа, BGI (след лигиране с два адаптора), за идентифициране на пълния микро РНК профил за установяване на нови миРНК и обогатяване базата данни на миРНК. В следствие тези данни са ценни за асоциирането им като биомаркери. Измежду описаните от докторанта налични, като основен е избран методът за съставяне и валидиране на панел от комплексно експресирани (пул) миРНК, получени от избраните две телесни течности, свързани с изследваното патологично състояние.

Количествената оценка на разликата в експресионните нива между сборните серумни проби от 30 здрави и 30 деца с РАС е постигната с помощта на полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция (RT-qPCR) - най-достъпният и сравнително евтин метод за доказването им, като анализирани експресионни профили на вече известни миРНК са обвързвани с патогенезата на болни от РАС.

За да се потвърдят допълнително резултатите от пул-анализа, е проведен един трети етап с помощта на Real-time qRT-PCR анализ на индивидуални проби чрез стандартен Maxima SYBR Green протокол.

Характеризиран е малкият транскриптом, малките РНК са анотирани в различни категории, а неанотираниите - за предвиждане на нови микро РНК чрез MiRear софтуер. Проведени на микро РНК са - идентифициране на таргетните сайтове, генно онтологична анотация и KEGG анализ. Проведен е анализ на данните от секвенирането на малки РНК молекули. А стандартният биоинформатичен анализ (SPSS) е проведен с получените данни от профилирането на малки РНК молекули. Извършен е анализ на известни и нови миРНК, Stem-loop RT-qPCR анализ. За проведения предикторен анализ на диференциално експресирани миРНК в рамките на този дисертационен труд е разработен собствен скрипт на прицелни гени, отнесени към биологични пътища в базата данни на KEGG.

В заключение, със задачите се постига поставената цел. Включен е новаторски и рутинен подход, като всеки един се постига със съответните методи, които са добре подбрани, някои с оптимизирани протоколи и приложени в правилна последователност.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Описаните жизненоважни миРНК за нормалното развитие на мозъка и промените в експресионните им нива се свързват със заболявания на неврологичното развитие, както са и посочени източниците за информация, свързана с проблема РАС. Изчерпателно и от съвременен научно ниво са описани факторите и причините за неврологичното разстройство.

Поставената цел и задачи изцяло съответстват на идентифицирания проблем в съвременното ни общество, както и необходимостта от постигането ѝ. Решаването на този проблем трябва да привлича огромни средства, за да се ускори ранната диагностика, лечението и профилактиката за предотвратяването на появата му, за което има научни и практически подходи, както ясно е посочено в дисертацията.

Внедрените и разработваните на нови стандартизирани методи за количествено определяне на циркулиращи миРНК, в леснодостъпни телесни течности, както и детектирането на нови, са описани и добре подредени. Изборът им е добре обоснован с тяхната значимост за науката и практиката. Приложеният комплексен подход в дисертационния труд е добър пример за цялостното организиране и изпълнение на изследванията за РАС.

Резултатите установят миРНК, като в някои случаи са в състояние да отразят РАС. Натрупани са нови данни, които да послужат за биомаркери. Анализът на панел от няколко миРНК, повиши чувствителността и специфичността на поставяната диагноза. От друга страна, изследването на пул от миРНК е проверено с това на единични миРНК. Изследванията до установяването на пълния набор от миРНК в този смисъл е напълно обосновано, както и правилният избор на контроли. Проведено е нормализиране на получените данни.

Резултатите, онагледени с 41 фигури и 8 таблици, умело са интерпретирани и са дискутирани във връзка с постиженията на други автори по проблема.

Дискусията е свързана с предизвикателствата, които трябва да бъдат преодолени, за може миРНК да бъдат използвани успешно в клиничната диагностика. Връзката между единична миРНК и патогенен протеин е сложна, поради таргетирането на много протеини от една миРНК или регулирането на един протеин от много миРНК. Научните изводи съответстват на целите, резултатите и дискусията и отразяват комплексното разстройство на неврологичното развитие.

Дисертацията е правилно структурирана по раздели, терминологията е издържана.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Предложени са достъпни подходи за установяване на неизвестни и количествена оценка на известни миРНК. Приложени са стандартизирани методи за количествено определяне на циркулиращи миРНК във венозна кръв и кръвен серум. Методите са съобразени с наличната апаратура и достъпни технологии. Оптимизирани са протоколи за приложението им. Изпитани и систематизирани са всички етапи от подготовката до провеждането на изследванията, включително и обработката на данните. Акуратно са описани приложените протоколи. Това е принос за прилагането им с практическата работа с пациенти. В този смисъл дисертационният труд има методически принос.

Идентифицирани за първи път са: кандидат миРНК, четири микро РНК в кръв и серум, а също и две микро РНК в серум с роля при РАС. Установените миРНК, формулирани в три приноса, са със значимост за науката и диагностиката, тъй като те могат да се разработят като биомаркери за РАС.

Изпитан и приложен на десетки пациенти е комплексен и цялостен подход, който би решил в ранна възраст проблема с диагностиката на неврологичното разстройство, наличен, поради съществуването на неговите много варианти и комплексността му. Постигнат е реален тласък в бъдещото установяване на биомаркери за РАС. Приносите са напредък и предотвратяват загубата на време за провеждане на подходящото лечение в краткия 5-годишен период на развитие на човешкия мозък.

РАС е представено като комбинация от генетични фактори, но и фактори на околната среда, като дялът им е почти равен. Контролирането на последните може да допринесе в подходите за решаване проблема. Нарастването честотата на РАС се дължи на наличието на множество генетични, епигенетични причини, заедно със замърсяването на околната среда, действието на съвременния начин на живот, комбиниращи се в различни патогенетични механизми.

Перспективи

Идентифицираните в дисертацията кандидат миРНК, могат да се разработят като биомаркери при РАС.

Перспективите са дефинирани в дисертацията. Анализирани и интерпретирани на големия набор от данни, получени от секвенирането на малки РНК молекули. Проверяване на резултатите за взаимодействие на миРНК с прицелните гени на РАС в *in vitro* или *in vivo* модели, с което ще се провери биологичното им значение.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Публикувани са 3 броя статии в списания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus). Трите статии са с SJR – Scientific Journal Ranking. Статията “Identification of serum microRNA signatures associated with autism spectrum disorder as promising candidate biomarkers“ има Q1 ранкиране и импакт-фактор 2.85. Другите две статии са с Q3 ранк. Всички статии са на английски език, като и в трите статии Татяна Кичукова е първи автор. Статиите са с трима и повече съавтори. Значимостта на научния труд се изразява в броя цитирания на статиите в списания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация. Общият брой на цитиранията е 31. От тях 23 статии са в списания с импакт фактор, като най-ниският импакт фактор е 2,027, а най-високият е 8,911. Осем от цитиранията са в списания с SJR. В трите колективни публикации приносът на докторантката като първи автор е очевиден.

9. Лично участие на докторанта(ката)

Постиженията в тази дисертация са дело на докторантката, положила усилия за разработването на тази трудна тема. Получени резултати, постигнатите приноси са нейна лична заслуга. Проведеното дисертационно изследване от Татяна Кичукова, под умело научно ръководство обогатява тематичната насоченост и постиженията на катедрата по физиология на растенията и молекулярна биология.

10. Автореферат

Авторефератът е оформен с добро качество, съгласно изискванията и съответства на представените в дисертацията резултати и изводи.

11. Критични забележки и препоръки

Научната стойност на дисертационния труд насочва вниманието към продължаване на работата по идентифициране на нови миРНК и тяхното асоцииране с РАС, въвеждането на възможно най-пълния набор от биомаркери и внедряване в клиничната диагностика и лечението. Тази необходимост се подсилва от нарастващия брой пациенти с комплексното разстройство на неврологичното развитие.

12. Лични впечатления

Нямам

Въпроси към докторанта:

1. Има ли други проучвания, които свързват идентифицираните от вас четири миРНК молекули с етиопатогенезата на РАС?

2. Защо сте се насочили именно към миРНК молекулите като потенциални биомаркери при РАС при наличието на толкова много други класове биомолекули?

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Научната стойност на дисертационния труд насочва вниманието към продължаване на работата по идентифициране на нови миРНК и тяхното асоцииране с РАС, въвеждането на възможно най-пълния набор от биомаркери и внедряване в клиничната диагностика и лечението. Тази необходимост се подсилва от нарастващия брой пациенти с комплексното разстройство на неврологичното развитие.

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“.

Дисертационният труд показва, че докторантката Татяна Миладинова Кичукова **при- тежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна биология, като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

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 образователната и научна степен „доктор“** в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма „Молекулярна биология“.

12.03.2023 г.

Рецензент:

(подпис)

/Проф. д-р Нася Томлекова/