



**Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски”  
Биологически факултет**



**Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология”**

---

**Татяна Миладинова Кичукова**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане на  
образователна и научна степен „доктор“**

**Сравнителен експресионен анализ на не кодиращи-  
микро РНК молекули в периферна кръв и серум при  
деца с разстройство от аутистичния спектър**

<b>Област на висше образование:</b>	<b>4. Природни науки, математика и информатика</b>
<b>Професионално направление:</b>	<b>4.3. Биологически науки</b>
<b>Докторска програма:</b>	<b>Молекулярна биология</b>

**Научни ръководители:  
Доц. дсн Самир Наимов  
Доц. дбн Тихомир Въчев**

**Пловдив, 2022**



Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ към Биологически факултет на Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“.

Публичната защита ще се състои на .....2023г., от ..... часа в ..... на Биологически факултет, ул. „Тодор Самодумов“, № 2, гр.Пловдив.

Научно жури в състав:

Вътрешни членове:

Доц. дсн Самир Изетов Наимов

Доц. д-р Еленка Стоилова Георгиева

Външни членове:

Проф. дмн Мария Анастасова Семерджиева

Проф. д-р Нася Борисова Томлекова

Доц. д-р Мирослава Константинова Жипонова

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Пловдивски Университет “Паисий Хилендарски” и са публикувани на интернет страницата на университета

## Съдържание

1.	Въведение.....	3
2.	Цел и задачи.....	4
3.	Материали и методи.....	5
3.1	Материали.....	5
3.1.1	Дизайн на проучването и участници.....	5
3.2	Методи.....	5
3.2.1	Вземане на венозна кръв.....	5
3.2.2	Засекретяване на пробите.....	6
3.2.3	Екстракция на тотална РНК от периферна кръв с помощта PAXgene Blood miRNA Kit... 6	6
3.2.4	Качествен и количествен анализ на изолираната РНК.....	6
3.2.5	Създаване на сборни (пул) проби, преципитация на РНК и подготовка на получените проби за анализ (Small RNA sequencing).....	6
3.2.6	Секвениране на малки РНК молекули (Small RNA sequencing).....	7
3.2.7	Анализ на данните от секвенирането на малки РНК молекули.....	7
	Филтриране на данни.....	7
3.2.8	Stem-loop RT-qPCR анализ.....	8
3.2.9	Предварителна амплификация (преамплификация) на получените миРНК специфични комплементарни ДНК последователности.....	9
3.2.10	Количествен PCR експресионен анализ на миРНК молекули.....	9
3.2.11	Анализ на получените данни от проведения RT-qPCR анализ.....	9
4.	Резултати.....	11
4.1	Резултати от секвениране на малки РНК молекули.....	11
4.2	Предикторен биоинформатичен анализ за търсене на таргетни белтък кодиращи гени на диференциално експресираниите микроРНК.....	13
4.3	Диференциално експресирани миРНК молекули при РАС в периферна кръв.....	13
4.4	Изследване на експресията на 42 миРНК молекули, които бяха избрани като кандидат биомаркери с помощта на stem-loop qRT-PCR анализ на пул проби от серум при пациенти с РАС 14	14
4.5	Индивидуално валидиране на идентифицираните осем серумни миРНКи с помощта на RT-qPCR.....	15
4.6	Резултати от проведените изследвания на кандидат миРНК биомаркерни молекули в периферна кръв при деца с диагноза РАС.....	17
4.7	Разработване на предикторен панел свързан с РАС, използвайки четирите изследвани серумни миРНК.....	17
4.8	ROC анализ (receiver operating characteristic) за определяне на диагностична точност на изследваните миРНК биомаркери в образци от периферна кръв при РАС.....	19
4.9	Участие на диференциално експресираниите миРНК молекули в ключови регулаторни пътища и мрежи.....	20
5.	Дискусия.....	22
5.1	Тенденция за ранна диагноза на РАС.....	22
5.2	Дискусия върху ролята на миРНК молекулите, като потенциални биомаркери.....	22
5.3	Дискусия на резултати от проведения от нас цялостен транскриптомен анализ.....	23
5.4	Дискусия на резултати от индивидуалната експресия на диференциално експресираниите миРНК.....	24
5.4.1	миРНК-500a-5p.....	24
5.4.2	миРНК-197-5p.....	24
5.4.3	миРНК-424-5p.....	25
5.4.4	миРНК-664a-3p.....	25
5.4.5	Дискусия на участието на диференциално експресираниите миРНК молекули в ключови регулаторни пътища и мрежи.....	25
6.	Заклучение.....	26
7.	Изводи.....	27
8.	Приноси.....	28
9.	Публикации.....	29
10.	Литература.....	30

## 1. Въведение

Разстройството от аутистичния спектър (РАС) представлява хетерогенна група от разстройства на неврологичното развитие, характеризиращи се със стереотипно повтарящо се поведение, фиксирани интереси и дефицит на социални взаимодействия и комуникация. Поради социалната значимост на РАС, огромни усилия са насочени към подобряване на бързината и точността на диагнозата. За съжаление, съвременните методи за идентифициране на РАС зависят от поведенчески наблюдения и психометрични инструменти, които не могат да бъдат приложени изцяло в периода на ранна диагностика между 18 и 24-месечна възраст и не са достатъчно специфични. Освен това комплексната етиология на това нарушение, допълнително се усложнява от появата на коморбидност, което затруднява точността на диагностиката. Необходими са нови и лесно възпроизводими молекулярни тестове, които да допълват стандартните диагностични процедури и/или да осигуряват по-надеждни резултати преди проявата на симптомите на РАС.

През последните години се проучва алтернативен механизъм за патогенезата на РАС, който включва епигенетика. Този вид регулация повлиява генната експресия без това да е свързано с промени в ДНК секвенцията и вече е доказано, че може да повлияе на цели генни мрежи, включително тези, които модулират невrogenезата и развитието на мозъка. В упражняване на този тип регулаторен механизъм, участват микроРНК молекулите (миРНК), които са малки (с дължина 22-25 нуклеотида), некодиращи, регулаторни РНК молекули. Те функционират чрез маркиране на специфични информационни РНК (иРНК) за деградация или репресия на транслацията. МиРНК молекулите притежават забележителен потенциал, тъй като всяка от тях може да има множество таргетни молекули и по този начин да повлиява фината настройка на генната експресия. Все повече данни показват, че дисрегулацията на тези малки РНК е свързана с патогенезата на някои психиатрични разстройства като шизофрения, биполарно разстройство, големи депресивни разстройства и болест на Алцхаймер. В случаите на РАС също са идентифицирани диференциално експресирани миРНК, като миРНК с повишени нива на експресия потискат гени, които са свързани със синаптични и невронни нарушения, докато понижените експресионни нива на миРНК водят до абнормно активиране на гени, които са в основата на възпалителни и компенсаторни процеси.

МиРНК молекулите са атрактивни кандидати за потенциални молекулярни биомаркери при РАС, поради участието им в ключови процеси, като клетъчна пролиферация и диференциация, невронна пластичност и развитие, както и тяхното наличие в нервната тъкан и директното им идентифициране и количествено определяне чрез методи, като секвениране на малки РНК молекули и stem-loop RT-qPCR анализ. Специфични за мозъка миРНК, показателни за патофизиологични процеси, могат да преминават през кръвно-мозъчната бариера и да останат за дълго в телесни течности като кръв, урина, серум, плазма и слюнка, където се характеризират със забележителна стабилност. Тези изследвания дават основание да се счита, че циркулиращите миРНК могат да бъдат ефективни неинвазивни биомаркери при РАС, които са относително лесно достъпни и обективно измерими.

## 2. Цел и задачи

**Цел:** Провеждане на сравнителен експресионен анализ на некодирани – микро РНК молекули в периферна кръв и серум при деца с разстройство от аутистичния спектър

### **Задачи**

1. Изготвяне на комплексни РНК (пул) проби от периферна кръв и от серум на деца с РАС и здрави контроли.
2. Провеждане на сравнителен експресионен анализ на малки РНК молекули в периферна кръв (Small RNA sequencing) при РАС.
3. Провеждане на сравнителен експресионен (RT-qPCR) анализ на миРНК молекули в периферна кръв при РАС.
4. Провеждане на сравнителен експресионен (RT-qPCR) анализ на миРНК молекули в серум при РАС.
5. Извършване на статистически анализ на експресионните данни получени от RT-qPCR изследванията с помощта на SPSS софтуер.
6. Провеждане на ROC анализ (receiver operating characteristic) на диференциално експресирани миРНК молекули при РАС.
7. Провеждане на KEGG анализ на биологични пътища и връзката им със съответните диференциално експресирани миРНК молекули.

### **3. Материали и методи**

#### **3.1 Материали**

##### **3.1.1 Дизайн на проучването и участници**

Настоящото проучване включва 30 деца (24 момчета и 6 момичета) клинично диагностицирани с генерализирано разстройство на развитието, на възраст от 3 до 11 години (средна възраст на извадката 6,86 години) и 30 здрави контроли, съответстващи на възрастта и пола на групата на пациентите (средна възраст на извадката е 6,43).

В първия етап на научната работа бяха направени комплексни (пул) РНК проби при вземането на венозна кръв от 30 пациента с аутизъм и 30 здрави контроли (два комплексни пула за всяка група от проучването) за провеждане на мултиплексен анализ с използването на платформата за секвениране на малки РНК молекули (Illumina HiSeq платформа, BGI), която прави възможно идентифицирането на пълният микро РНК профил с висока степен на точност.

Проучването беше разработено за да се оценят и идентифицират потенциални циркулиращи миРНК, които могат да послужат като обещаващи биомаркери свързани с патогенезата на РАС.

Следващия етап включваше провеждането на допълнителен количествен real-time PCR (RT-qPCR) анализ за профилиране на миРНК, които показаха най-голяма разлика в експресионните нива между тестваните сборни (пул) серумни проби от 30 деца с диагноза РАС и 30 здрави контроли.

За да потвърдим допълнително тези резултати, беше проведен индивидуален анализ на по-голяма група от субекти, при които всяка проба беше оценявана индивидуално. Общо 66 деца бяха включени в този етап от проучването. Те бяха набирани на случаен принцип от семейни лекарски практики. Кохортата от участници беше разделена на групи от деца с РАС (30 момчета и 8 момичета) и нормално развиващите се деца (22 момчета и 6 момичета). Първата група включва 38 пациенти, диагностицирани с РАС след интервюта с родителите, проведени от сертифицирани психиатри и клиничен преглед: ADI-R, CARS и GARS, следвайки диагностичните критерии на DSM V.

Контролната група включва 28 деца, които съответстват по възраст и пол на децата с РАС, като отсъствието на симптоми на РАС се определя след клиничен преглед и CARS. Участниците не са били подлагани на медикаментозни лечения преди вземане на кръвните проби. Деца с известни инфекциозни, метаболитни или генетични състояния също бяха изключени от изследването.

Комисията по научна етика към Медицински университет- Пловдив одобри методологията на изследването и формулярите за информирано съгласие (ICFs). Писменото информирано съгласие беше получено от родителите на участниците, включени в изследването (пробанти) след запознаване с основните цели и гарантиране на поверителност. Университетският съвет одобри събирането и използването на периферни кръвни проби за целите на тази работа.

Основната част от пациентите включени в настоящото изследване са набрани в рамките на проект: “Аутизъм и специфично нарушение на развитието на речта – сравнителни геномни изследвания за идентифицирането на обща патогенетична основа” №ДФНИ-Б01/21 и 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.

#### **3.2 Методи**

##### **3.2.1 Вземане на венозна кръв**

Вземането на кръв и плазма/серум трябва да се извърши съгласно стандартните клинични техники за венепункция. При вземането на венозна кръв от пациентите участващи в настоящото проучване се използва PAXgene RNA моновета. Тъй като PAXgene RNA колонката е пълна с течен реагент, е важно тя да остане изправена по време на вземане на кръвната проба, за да се предотврати обратното движение на реагента. За да се подсуши това

условие, пробата трябва да се изтегли с помощта на комплект за събиране на кръв с тънка игла – венкат, „бътерфлайка”, като същевременно моноветата трябва да остане във вертикално положение, като течашката кръв на донора не трябва да се стича по стените ѝ.

### 3.2.2 Засекретяване на пробите

След вземането на кръвта, пробите бяха засекретени в съответствие с изискванията на стандартите на етичната комисия, като последните получиха съответно буквен код на пациента и пореден номер. Достъп до информацията имаха единствено лицата, включени в провеждането на проучването, а конфиденциалността беше спазена спрямо изискванията на ИС и етичните норми (Въчев, 2020).

### 3.2.3 Екстракция на тотална РНК от периферна кръв с помощта PAXgene Blood miRNA Kit

Системата PAXgene Blood miRNA се състои от PAXgene РНК моновети за събиране, стабилизиране и транспортиране на кръв, и PAXgene Blood miRNA Kit за пречистване на висококачествена тотална РНК >18 нуклеотида (включително микроРНК), използвайки утвърдена PAXgene силициево-мембранна технология. Пречистената тотална РНК включва, както информационни РНК молекули, така и ниско молекулна РНК фракция, включително микро РНК молекули за експресионен анализ.

Протокола за изолиране на тотална РНК от периферна кръв беше проведен в съответствие с препоръката на производителя, описана в PAXgene Blood miRNA Kit Handbook (PreAnalytiX).

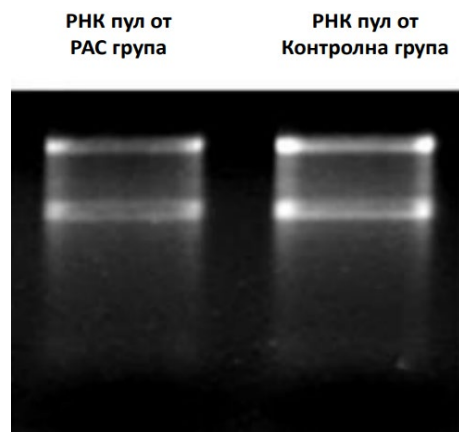
След изолиране на тотална РНК от проби от периферна кръв, процедурата беше повторена със серум. Изолирането на тотална РНК от серум беше проведено в съответствие с препоръката на производителя, описано в PAXgene Blood miRNA Kit Handbook (PreAnalytiX) с някои модификации, като започване на пречистването на стъпка четири и елюиране на РНК, като се използва 30 µl BR5 буфер.

### 3.2.4. Качествен и количествен анализ на изолираната РНК

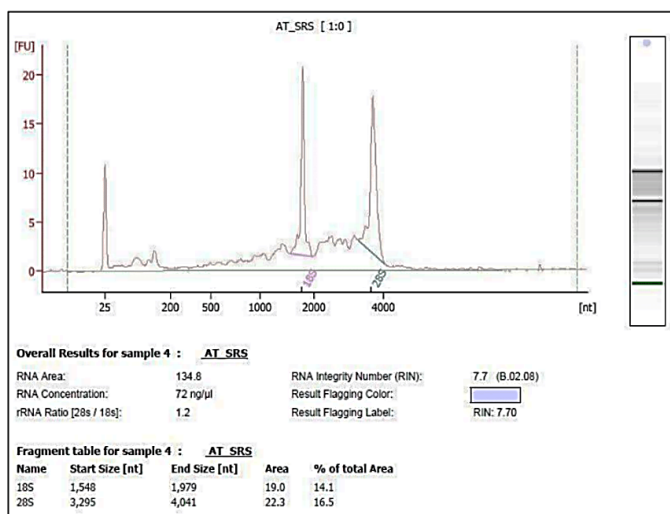
За оценка на чистотата и количеството на изолираната РНК беше проведена хоризонтална агарозна гел-електрофореза в 1% агарозен гел с етидиев бромид, както и спектрофотометричен анализ на Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioТек) (Фигура 1).

### 3.2.5. Създаване на сборни (пул) проби, преципитация на РНК и подготовка на получените проби за анализ (Small RNA sequencing)

При приготвянето на РНК пуловете беше важно да се определи точната концентрация на РНК във всички проби, които участват в пула. След определяне на концентрациите на всички изолирани проби беше изчислено необходимото количество от всяка една от тях за получаването на общ пул от всички проби на деца с поставена диагноза разстройство от аутистичния спектър и съответно от контролната група деца.



Фигура 1. Визуализация на получените комплексни РНК проби от изследваните групи за провеждане на секвениране на малки РНК молекули, проведена върху 1% агарозна гел електрофореза



Фигура 2. Анализ на комплексния РНК пул за определяне на качеството на сборната проба с Agilent 2100 Bioanalyzer необходима за провеждане на секвениране на малки РНК молекули (Small RNA-Seq) от образци от аутистичния спектър.

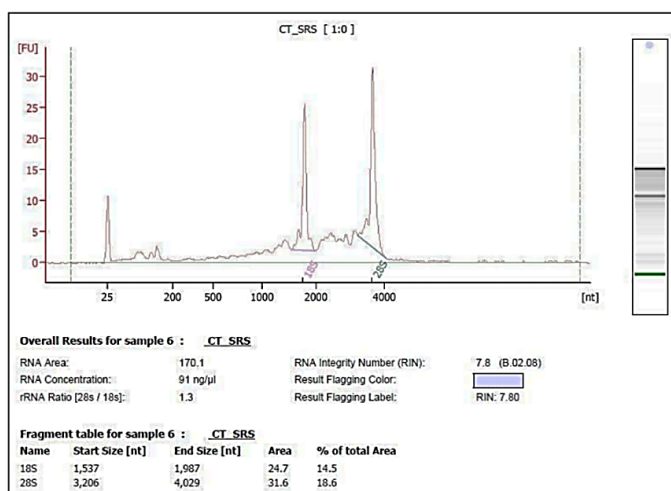


Първоначално РНК образците бяха разредени до концентрация 100 ng/μl. След това бяха смесени равни количества РНК от предварително разредените до тази концентрация РНК пулове.

Резултатите от анализа показват висок интеграционен индекс на РНК. RIN= 7.70 (Фигура 2)

Резултатите от проведените анализ показват високия интеграционен индекс на РНК. RIN = 7.80 (Фигура 3).

Аликвотни части от комплексните РНК образци от всеки от пуловете бяха замразени при - 80°C и изпратени на сух лед до BGI - Китай (Beijing Genomics Institute, Shenzhen, China), където беше проведен транскриптомен анализ на малки РНК молекули (Small RNA Sequencing). Изборът на подходяща платформа за количествен анализ на малки РНК молекули беше продиктуван от добрата възпроизводимост на резултатите от платформата на BGI за транскриптомен анализ, както и от ниският лимит на детекция (чувствителност).



**Фигура 3.** Анализ на комплексния РНК пул за определяне на интегритета на комплексната проба с Agilent 2100 Bioanalyzer необходима за провеждане на секвениране на малки РНК молекули (Small RNA-Seq) от контролни образци.

### 3.2.6. Секвениране на малки РНК молекули (Small RNA sequencing)

Използването на HiSeq високопроизводителните технологии за секвениране на малки РНК молекули дава възможност да бъде получена информация за почти всеки вид малки РНКи, включително микро РНК, малки интерфериращи РНК, PIWI- взаимодействащи РНК, рибозомни РНК, транспортни РНК, малки ядрени РНК, малки ядръцеви РНК (miRNA, siRNA, piRNA, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA). Чрез сравняването на интересуващите ни секвенции с тези в базите данни и изследване на препокриването на малки РНК последователности по геномната локализация, малките РНКи могат да бъдат анотирани в различни категории. Тези, които не могат да бъдат анотирани са използвани за предвиждане на нови микро РНК последователности с помощта на разработения софтуер MiRear от неанотирани секвенции с малки РНКи. Въз основа на резултата от секвенирането на малки РНК молекули (Small RNA sequencing) и особеностите на пробите може да се направи анализ, както на характерния за индивида миРНК профил, така и специфичния за заболяването профил. МиРНК профила служи като високо специфичен маркер за диагностициране, прогнозиране, проследяване на развитието на болестта и предвиждане на терапевтичния отговор.

Диференциалния експресионен анализ на изследваните миРНК молекули е последван от идентифициране на техните таргетни сайтове, GO (генно онтологична) анотация и KEGG анализ на микро РНКи. Въз основа на широко-машабното секвениране на малки РНК молекули може да получим информация за микро РНКи, които регулират много ключови биологични процеси.

### 3.2.7. Анализ на данните от секвенирането на малки РНК молекули

#### Филтриране на данни

Анализът на данните от секвенирането на комплексните РНК проби от деца с PAC и здрави деца от контролната група беше проведен върху получените от BGI fastq файлове. Fastq файловете съдържат последователностите на секвенираните фрагменти (reads).

Поради наличието на адапторни последователности и/или секвенирани фрагменти (reads) с ниско качество, които присъстват в необработените данни (raw data), се извършва филтриране на данните за получаване на секвенирани фрагменти с високо качество (чисти данни).

### **Стандартен биоинформатичен анализ**

Стандартният биоинформатичен анализ беше проведен въз основа на получените данни от профилирането на малки РНК молекули като включваше следните стъпки:

- 1) Изследване на разпределението на малките РНК последователности по геномна локализация;
- 2) Идентифициране на рРНК молекули, тРНК молекули, малки ядрени РНК молекули и др., чрез алаймънт към Rfam 10.1 и Genebank базите данни;
- 3) Идентифициране на известни микро РНК молекули чрез сравнение към секвенции от miRbase;
- 4) Идентифициране на деградационни фрагменти от иРНК молекули;
- 5) Аотиране на малките РНК молекули в приоритетни категории;
- 6) Предвиждане на нови микро РНК молекули и техните вторични структури с помоща на Mgear от неанотирани секвенции с малки РНК молекули;
- 7) Извършване на анализ на известните микро РНК молекули по семейства.

Анализирането на резултатите от миРНК профилирането позволява детекцията на специфични промени в генната експресия при патологични промени, като спомага за функционалното разграничаване на ключови регулаторни пътища и мрежи.

### **3.2.8. Stem-loop RT-qPCR анализ**

#### **Принцип**

Stem-loop RT-qPCR метода е разработен за специфично и ефективно количествено определяне на малки РНК молекули и се превърна в широко използвана техника предимно за канонични, добре характеризирани малки РНКи (включителни микро РНКи).

При този анализ всеки от реагентите, включително stem-loop RT праймера, правите и обратните PCR праймери и хидролизащата сонда, съдържат конструктивни характеристики, които заедно оптимизират специфичността и чувствителността на миРНК анализа. RT праймера има много стабилна stem-loop (фуркетна) структура, която удължава таргетната копиДНК. Правия (forward) праймер дава допълнителна дължина, което оптимизира температурата на топене ( $T_m$ ) на матрицата и подобрява специфичността на анализа. Специфичността на анализа допълнително се оптимизира от поставянето на сондата върху голяма част от оригиналната миРНК последователност (Kramer, 2011).

Предимството на stem-loop RT-qPCR метода е, че позволява специфичното откриване на зрелите миРНКи дори от нанограмове тотална РНК. Тази техника включва две стъпки: (1) обратна транскрипция на базата на stem-loop праймери и (2) количествено определяне на RT продукта с помощта на конвенционален TaqMan анализ.

#### **Провеждане на обратна транскрипция на миРНК молекули и дизайн на праймери**

За провеждане на обратна транскрипция на миРНК молекулите, бяха конструирани специфични за всяка отделна миРНК stem-loop праймери. Дизайнът на праймери е осъществен чрез използването на консенсусна секвенция на праймера за копиране на миРНК молекулите (SL миРНК праймер), където последните 8 нуклеотида на праймера комплементират с 3' края на всяка една таргетна миРНК секвенция.

Количественото определяне на миРНК беше извършено чрез Real-Time RT-qPCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR), използвайки стандартен Maxima SYBR Green протокол (Thermo Fisher Scientific). Рекациите се извършиха на апарат ABI PRISM 7500 Real-time PCR machine (Applied Biosystems, USA).

За провеждане на обратна транскрипция на миРНК молекули беше използван кит Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit на "Thermo scientific" и реакцията беше проведена съгласно изискванията на производителя. Първоначалното количество РНК беше 1  $\mu$ g на реакция, докато копиДНК stem-loop праймерната смес по 100  $\mu$ M крайна концентрация всяка.

За провеждането на реакциите беше използван PCR апарат 2720 на Applied Biosystems. В ензимната смес (Maxima Enzyme Mix) е включена подобрена обратна транскриптаза (Maxima Reverse Transcriptase), получена след in vitro оптимизиране на ензима M-MuLV RT. Модифицираният ензим притежава висока термостабилност, ефективност и повишена скорост

на синтез на копиДНК в сравнение с дивия тип M-MuLV RT. В ензимната смес се съдържа още рекомбинантен инхибитор RiboLock™ RNase inhibitor, който ефективно защитава РНК от разграждане от РНК-азите А, В и С, при температура до 55°C. Oligo(dT)<sub>18</sub> праймерите се свързват към поли(А) опашката на 3' края на информационните РНК. Случайните хексамерни праймери се свързват неспецифично към РНК и служат за синтез на копиДНК от всички РНК молекули.

### **3.2.9. Предварителна амплификация (преамплификация) на получените миРНК специфични комплементарни ДНК последователности**

Непосредствено преди провеждането на RT-qPCR анализа, 5 µl от всяка миРНК-специфична копиДНК се подлагат на предварителна амплификация с reqGOLD Taq ДНК полимеразата (VWR, Radnor, PA, USA) с цел повишаване чувствителността на анализа.

### **3.2.10. Количествен PCR експресионен анализ на миРНК молекули**

Методът на полимеразна верижна реакция в реално време Real-Time RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR) може да бъде използван за количествен, полуколичествен и качествен анализ. Той позволява надеждна детекция и измерване на синтезираните PCR продукти при всеки цикъл от процеса на полимеразна верижна реакция.

В настоящата работа е използван вариант със свързващо се към ДНК зелено флуоресцентно багрило SYBR Green I. SYBR Green I е интеркалиращ агент, който се свързва към малката бразда на двойно верижна ДНК молекула. В разтвор флуоресцира слабо, но започва да излъчва силен флуоресцентен сигнал след свързване с двойноверижна ДНК. Чрез отчитане на повишена флуоресцентна емисия по време на всеки цикъл е възможно да се проследи PCR реакцията през експоненциалната фаза, при която количеството на синтезираните PCR ампликони не зависи от изчерпването на компонентите на реакцията, а само от началното количество на изследваната ДНК молекула. За да се измери това начално количество, предварително се задава определен праг на флуоресценция, след което в хода на анализа се измерва параметърът Ct - броят цикли, за които флуоресцентното излъчване достига предварително фиксираният праг.

В настоящата изследователска работа беше използван методът на относителния количествен анализ (Livak and Schmittgen, 2001), при който се генерират данни за степента на промяна в генната експресия на изследваните елементи в сравнение с референтен ген актин В. При този тип анализ беше извършена съпоставка на експресията на миРНК специфична копиДНК спрямо референтна екзогенна контрола за миРНК *C. elegans cel-miR-39*, чиято експресия е постоянна.

Тъй като багрилото SYBR Green I може да се свърже към всички двойноверижни PCR продукти, включително към неспецифични такива (например праймерни димери) количествения PCR анализ беше извършен с помощта на Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase.

### **Процедура по провеждане на RT-qPCR анализа**

Количествения RT-PCR беше извършен с помощта на Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) със система ABI 7500 (Applied Biosystems). Пробите бяха нормализирани спрямо референтна екзогенна контрола за миРНК *C. elegans cel-miR-39*. Тези измервания бяха извършени в двукратно техническо повторение. Накрая, относителните нива на експресия бяха количествено определени (RQ) с помощта на метод  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  по Ливак 2001 (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen et al., 2008). Ампликоните бяха потвърдени чрез проследяване на кривите на денатурация (анализ на кривите на топене) и чрез електрофореза на агарозен гел.

### **3.2.11. Анализ на получените данни от проведения RT-qPCR анализ**

#### **3.2.11.1. Анализ на кривите на амплификация**

Специфичните копиДНК последователности се намножават експоненциално с всеки цикъл на полимеразната верижна реакция. В резултат на това нараства количеството на двойноверижна ДНК в реакционната смес, а заедно с него и количеството на интеркалиралото багрило. В резултат се повишава интензитета на флуоресцентния сигнал, по който може да се

съди за натрупването на PCR продукта. Кривата на амплификация е графичният израз на промяната на флуоресцентната емисия и количеството на ДНК като функция от времето и PCR циклите. RT-qPCR анализа за всяка проба копи ДНК е добре да бъде извършен поне в двукратни повторения. Високата Ct стойност е показателна за малко количество НК в изследваните образци в пробата. Ако Ct стойността е ниска, то количеството на НК в изследваните образци, съответно е по високо. Такава негативна корелация между Ct стойността и количеството се обяснява с физичния смисъл на Ct стойността – това е броят цикли, за които амплификацията достига предварително определен праг. Когато началното количество е голямо, то този праг се достига по-бързо и Ct стойността е по-ниска.

#### **3.2.11.2. Анализ на кривите на денатурация (Melting Curve Analysis)**

Когато всички реакции на амплификация приключат, апаратът започва режим на снемане на криви на денатурация. Постепенно се повишава температурата на реакционните смеси, като при това се отчита и флуоресцентната емисия. С повишаването на температурата става дисоцииране на интеркалиращото багрило от ДНК молекулите. При достигане точката на денатурация на PCR продукта, интеркалиращото багрило дисоциира, тъй като се разрушава двойноверижната структура на ДНК продукта. Багрилото има слаб афинитет към едноверижна ДНК. Данните, получени в хода на експеримента са достоверни, само когато са получени специфични продукти. Всеки пик в кривите на денатурация съответства на един продукт.

#### **3.2.11.3. Статистически анализи**

Статистическите оценки са извършени с използване на версия 20.0 от пакета SPSS (IBM Corp. Released 2011). Непараметричният тест на Mann-Whitney U с делта Ct стойности се използва за изследване на разликите в нивата на експресия, като се вземат предвид критериите на Kolmogorov-Smirnov за нормалност. Последващ анализ на ROC (receiver operating characteristic) кривата е извършен от статистическия софтуерен пакет MedCalc за определяне на диагностична точност и чувствителност на анализирани циркулиращи биомаркерни миРНК молекули.

#### **3.2.11.4. Предикторен анализ на диференциално експресирани миРНКи**

Всички до момента валидирани таргетни гени на изследваните миРНК са получени от базата данни miRWalk 2.0. Тъй като този ресурс предлага удобна опция за търсене на предполагаеми прицелни гени, но не и за валидирани такива, ние разработихме собствен скрипт, който използва списък на валидирани прицелни гени и след това ги отнася към биологични пътища, открити в базата данни на KEGG. На следващ етап, броя на прицелните гени за всяка миРНК молекула се свързат със специфични им биологични пътища.

## 4. Резултати

### 4.1 Резултати от секвениране на малки РНК молекули

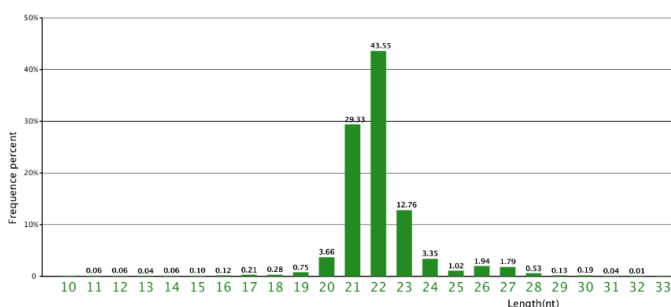
С цел идентифицирането на специфичните експресионни профили на миРНК молекули, свързани с РАС беше проведено паралелно секвениране на малки РНКи, сравняващо таргетните миРНК профили на здрави контроли и аутистично болни деца.

Резултатите от прилагането на Illumina HiSeq високопроизводителните технологии за секвениране на двата комплексни пула от малки РНК молекули показаха наличието на 38 458 155 броя необработени секвенции в контролната група от здрави деца и 32 024 011 от групата с РАС.

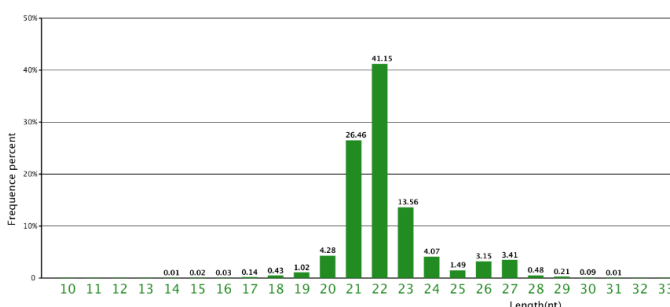
След изключването на секвенираните фрагменти с ниско качество, фрагментите с 5' праймерни вторични структури, рийдовете без 3' праймери и без инсертирани маркери, както и секвенираните фрагменти покъси от 18 нд и без Poly A, бяха получени 37 356 544 (97,63%) фрагменти с високо качество от контролната група и съответно 31 287 802 (98,24%) фрагмента от групата на деца с диагноза РАС.

Получените фрагменти бяха подложени на допълнителен анализ в зависимост от дължината и броя на молекулите. Така получените резултати показаха, че значителна част от малките РНК последователности са с дължина 21-22 нд, което съответства на 72,88% от общия брой фрагменти в контролната група и съответно 67,61% в групата с деца с разстройство от аутистичния спектър (Фигура 4, Фигура 5).

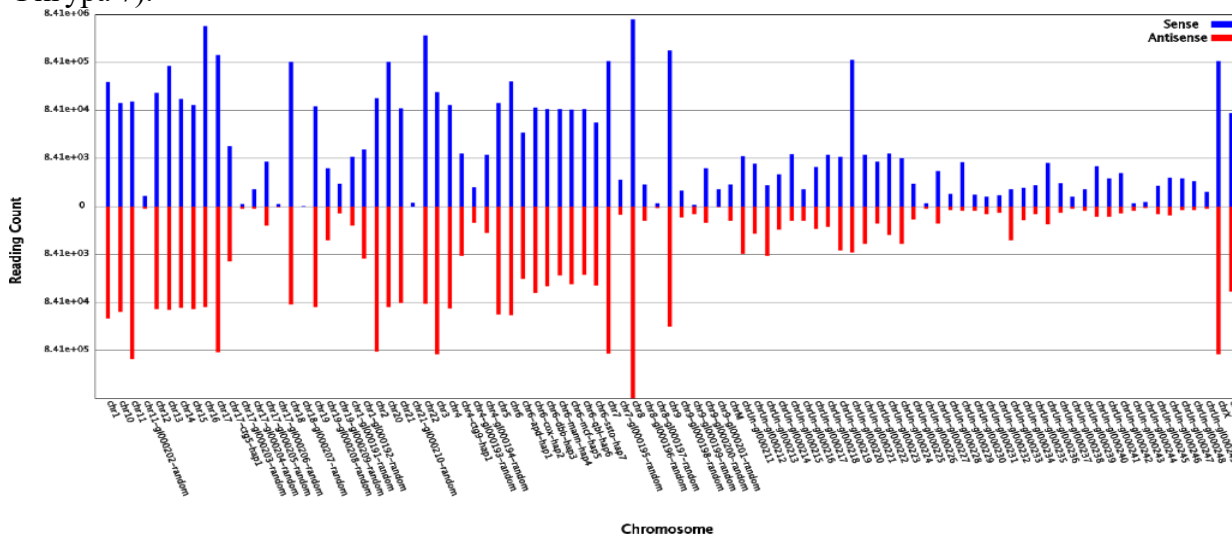
От получените фрагментите с високо качество, 29 796 994 (79,76%) от секвенциите в контролната група и 25 239 779 (80,67%) секвенирани фрагмента в групата с РАС показаха пълно припокриване при картиране към референтния човешки геном в Genbank (Фигура 6, Фигура 7).



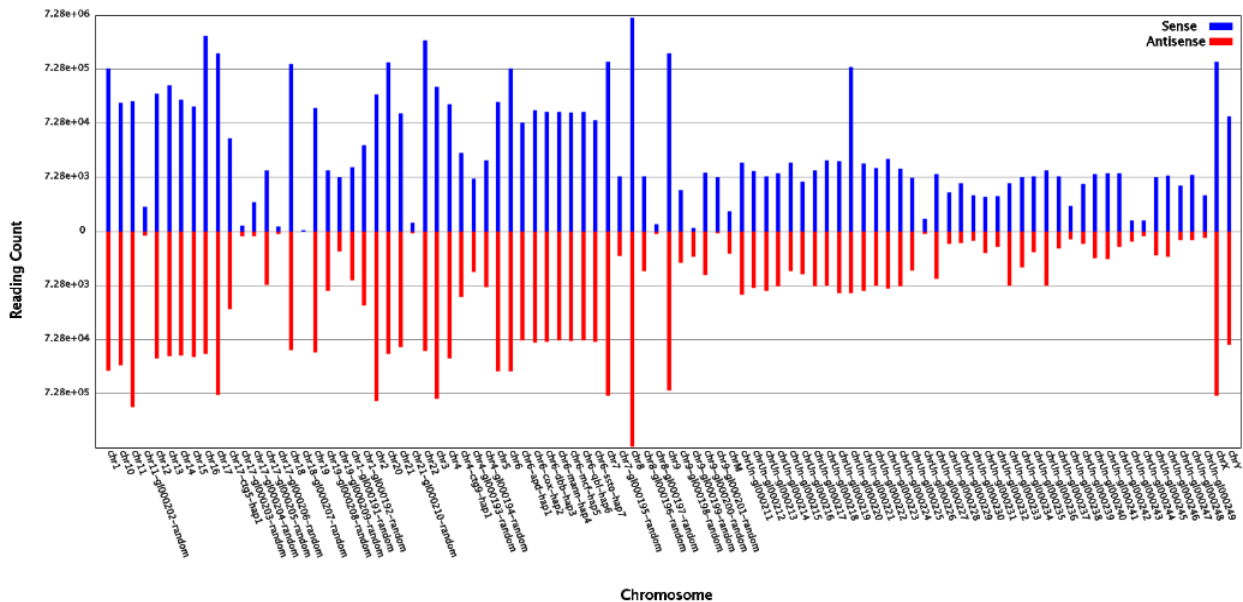
Фигура 4. Разпределение по размери на малките РНК в контролната група.



Фигура 5. Разпределение по размери на малките РНК в групата с РАС



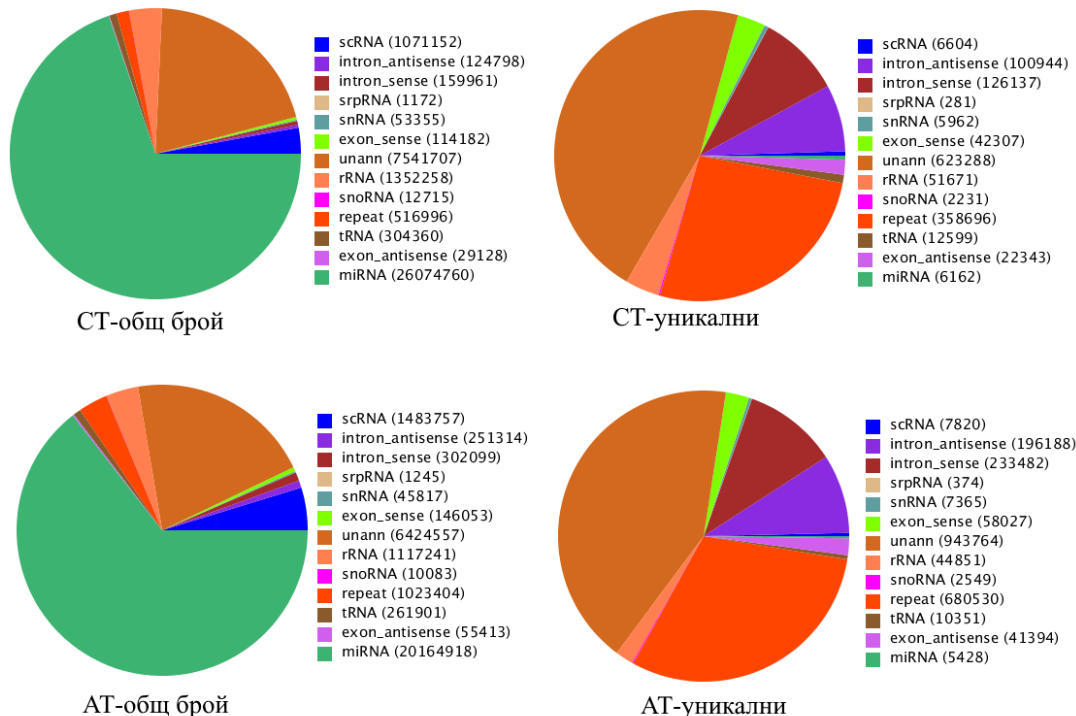
Фигура 6. Разпределение при контролна група на секвенираните фрагменти по хромозоми в сравнение с човешкия референтен геном съответно в кодираща и не кодираща вериги.



**Фигура 7.** Разпределение при РАС групата на секвенираните фрагменти по хромозоми в сравнение с човешкия референтен геном съответно в кодираща и некодираща вериги.

Броя на уникалните микро РНК последователности 6162 (0,45%) и общия брой микро РНК образци 26 074 760 (69,8%) са застъпени в по голяма степен в групата със здрави деца в сравнение с пациентите с РАС (съответно 5428 (0,24%) и 20 164 918 (64,45%)). Въпреки, че уникалните микро РНК молекули представляват сравнително малка част от общия брой секвенции на малки РНК, експресионните нива на някои отделни миРНК образци бяха относително високи (Фигура 8).

### Анотирани малкиРНК



**Фигура 8.** Обобщена кръгова диаграма на анотираните малките РНК молекули по референтния геном (общ брой и уникални).

За анотиране на микро РНК молекули беше използвана miRbase 14.0 базата данни, съдържаща всички зрели микро РНК секвенции. От общо 829 зрели микро РНКи чрез Illumina

HiSeq 2000 платформата за секвениране бяха детектирани общо 246 зрели миРНК в комплексния пул от здрави контроли и 238 зрели миРНК при групата от деца с диагноза РАС.

#### 4.2 Предикторен биоинформатичен анализ за търсене на таргетни белтък кодиращи гени на диференциално експресирани микроРНК

Биоинформатичният анализ за търсене на таргетни гени се извърши чрез web-базиран бази данни съдържащи всички възможни таргетни секвенции на белтък кодиращите гени. Базата данни <http://www.mirwalk.com> ни позволи да покажем валидираните вече таргети на диференциално експресирани миРНК при групата с поставена диагноза РАС.

Списъкът с предсказаните протеин кодиращи гени на диференциално експресирани микро РНК при групата с РАС срещу контролната група включваше 30,895 гена.

#### 4.3 Диференциално експресирани миРНК молекули при РАС в периферна кръв

Изследването на сигнатурата от малки РНК молекули (експресионния профил) при РАС в сравнение с контролна група деца в периферна кръв показва наличието на специфични промени характерни за разстройството от аутистичния спектър.

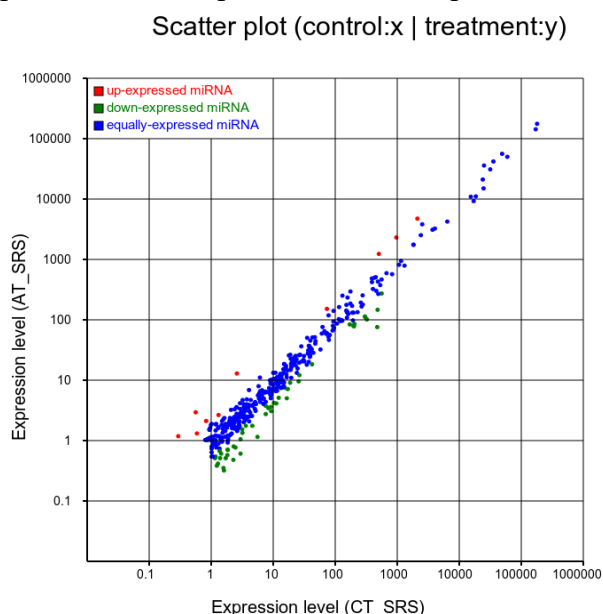
За идентифицирането на диференциално експресирани микро РНК е използвана р-стойността (p-value), като показател за статистическата значимост на диференциалната експресия на миРНК молекулите между пробите и fold-change стойността (абсолютната стойност на съотношението  $\log_2$ ), като праг за преценка на разликата в нивото на тяхната експресия.

В настоящата работа е използвана статистически значима промяна  $p\text{-value} < 0.01$  и  $\text{fold\_change} (\log_2) > 1$  или  $< -1$  между двете проби. Съгласно тези критерии и след проведеното широко-машабно профилиране на микро РНК експресията от периферна кръв при деца с РАС бяха идентифицирани 42 миРНК молекули със статистически значима диференциална експресия между анализирани групи както следва: миРНК-let-7i-3p, миРНК-106b-5p, миРНК-128-3p, миРНК-134-5p, миРНК-142-3p, миРНК-145-5p, миРНК-15a-5p, миРНК-18b-3p, миРНК-193b-3p, миРНК-197-5p, миРНК-20b-3p, миРНК-210-5p, миРНК-29c-5p, миРНК-301a-3p, миРНК-3064-5p, миРНК-3620-3p, миРНК-365a-3p, миРНК-374b-5p, миРНК-487b-3p, миРНК-3909, миРНК-424-5p, миРНК-486-3p, миРНК-500a-5p, миРНК-584-3p, миРНК-589-3p, миРНК-619-5p, миРНК-664a-3p, миРНК-664b-3p, миРНК-671-3p, миРНК-6799-3p, миРНК-96-5p, миРНК-183-5p, миРНК-199a-5p, миРНК-6849-3p, миРНК-3135a, миРНК-328-3p, миРНК-3674, миРНК-3687, миРНК-4489, миРНК-504-5p, миРНК-576-5p, миРНК-8052.

Настоящото изследване свидетелства, че периферната кръв е подходяща и лесно достъпна тъкан (материал) за изучаване на промените в експресията на кандидат биомаркери при РАС.

Идентифицирането на диференциално експресирани аотирани миРНК молекули в анализирани групи чрез секвениране от ново поколение (Small RNA-Seq) е представено на Фигура 9.

Скатър плот диаграмата (Фигура 9) представя експресионните нива на миРНК молекулите в двете проби (РАС и Контролна група). Отбелязани са позиции показващи промени между анализирани



**Фигура 9.** Експресионни нива на миРНК молекулите в двете проби (РАС и Контролна група).



групи с червено и зелено (съответно с повишена (Up regulated) и понижена (Down regulated) експресия), докато транскриптите, които не показват диференциална експресия са показани в синьо.

Потенциала на метода на секвениране от ново поколение позволи *de novo* идентифициране на микро РНК молекули и последващото им експресионно профилиране в анализирани групи. Неанотираните секвенции, които не намират съвпадение в miRbase или Rfam бяха групирани, като неизвестни последователности.

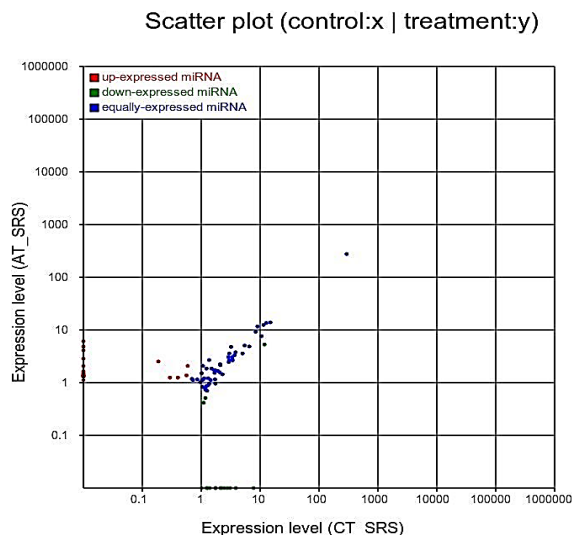
Скатър плот диаграмата (Фигура 10) представя експресията на ново идентифицираните миРНК молекулите в двете проби (РАС и Контролна група). Отбелязани са позиции показващи промени между анализирани групи с червено и зелено (съответно с повишена (Up regulated) и понижена (Down regulated) експресия), докато транскриптите, които не показват диференциална експресия са показани в синьо.

#### 4.4 Изследване на експресията на 42 миРНК молекули, които бяха избрани като кандидат биомаркери с помощта на stem-loop qRT-PCR анализ на пул проби от серум при пациенти с РАС

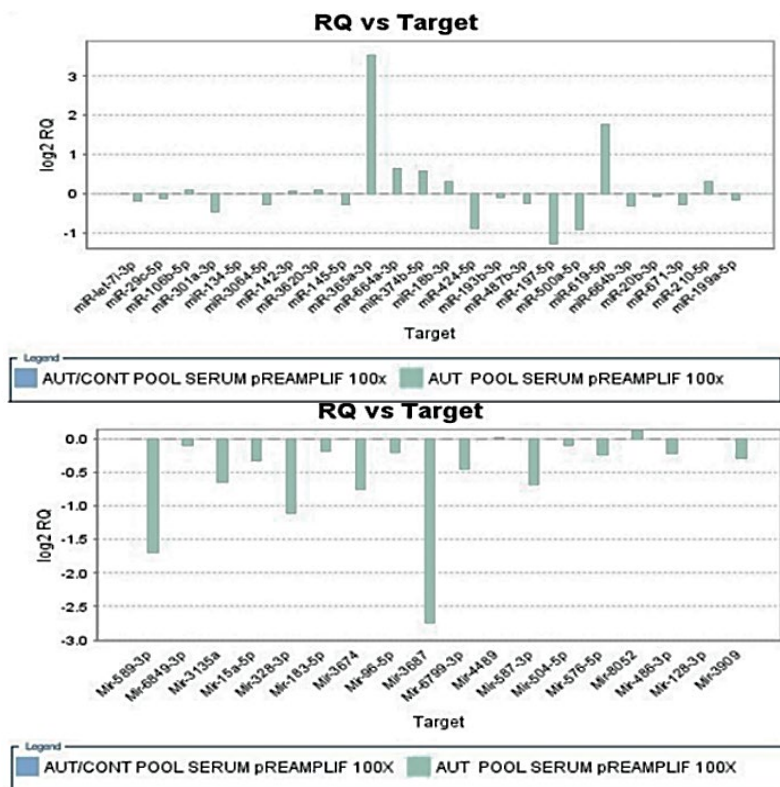
Секвенирането на малки РНК молекули беше последвано от stem-loop RT-qPCR анализ за идентифициране на потенциалните кандидат биомаркери в пул пробите от серум от същите групи от пациенти (Kichukova et al., 2017).

Относителните нива на експресия на миРНК молекулите бяха определени използвайки, Cel-miR-39 като екзогенна контрола, приложена за изчисляване на промените в миРНК експресията с помощта на 2- $\Delta\Delta C_t$  метод. От анализирани общо 42 миРНК, бяха установени 29 миРНК с понижено ниво на експресия при пациенти с РАС, а 11 миРНК показваха повишена експресия, като 2 от изследваните 42 миРНК молекули не показваха промени в експресионния профил при сравняването на аутистично болни деца и здрави контроли (Фигура 11).

Получените резултати ясно демонстрират тенденция към понижаване на експресията на



Фигура 10. Експресията на ново идентифицираните миРНК молекулите в двете проби (РАС и Контролна група).



Фигура 11. Резултати от проведените експресионни анализи. Експресионните нива на 42 селектирани индивидуални миРНК бяха определени с помощта на stem-loop RT-qPCR в комплексните пул проби от деца с поставена диагноза разстройство от аутистичния спектър и съответна контролна група от здрави деца.



микро РНК в анализираната група с РАС, докато много по-малка част от диференциално експресираните микро РНКи показаха повишена експресия.

Всички PCR реакции бяха проведени в две технически повторения (средните стойности бяха използвани за анализа) в присъствието на *Spike-in* Cel-miR-39 екзогенна контрола с оглед на постоянната ѝ експресия, която не се влияе от разликите в здравословното състояние на изследваните групи (РАС и здрави контроли).

Проведени бяха допълнителни експресионни изследвания на 8 от серумните миРНКи, показали най-големи промени между изследваните пул проби, използвайки RT-qPCR анализ. Резултатите

показаха, че относителните нива на само три серумни микро РНКи (миРНК-365а-3р, миРНК-619-5р, миРНК-664а-3р) при аутистично болни пациенти са значително по-високи от тези в контролната група, и

че относителните нива на други пет серумни микро РНКи (миРНК-3135а, миРНК-328-3р, миРНК-197-5р, миРНК-500а-5р, и миРНК-424-5р) са значително по-ниски в сравнение с извадката от здрави контроли (Фигура 12).

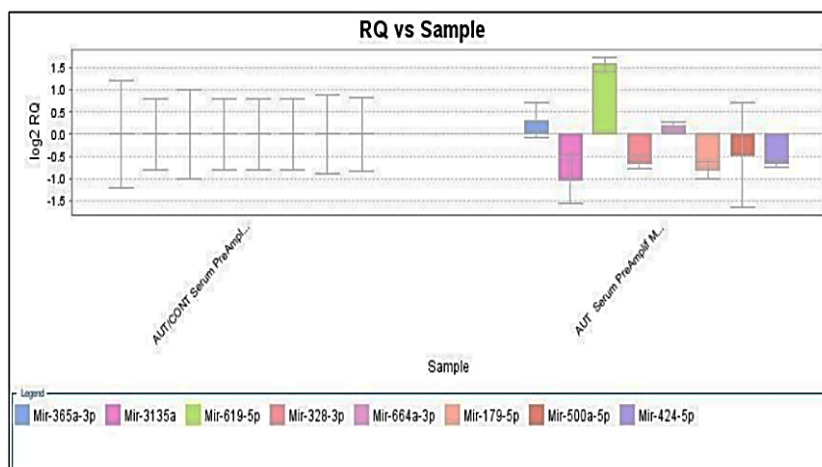
RT-qPCR амплификацията на специфични единични PCR продукти, съответстващи на всеки миРНК ампликон беше потвърдено, чрез наблюдаване кривата на денатурация (Melting curve analysis). Продуктите от всяка от проведените RT-qPCR реакции показват единичен специфичен пик в кривите на денатурация, което ясно показва високата специфичност на получените продукти. Висока специфичност на амплификацията е необходима предпоставка получените при експеримента данни да бъдат приети за достоверни.

#### 4.5 Индивидуално валидиране на идентифицираните осем серумни миРНКи с помощта на RT-qPCR

Създаването на пул пробите, може значително да намали чувствителността на подхода и да предостави информация само за средната стойност за всички проби от представената извадка, която да маскира промяната в експресията. Поради това е препоръчително потвърждение, което включва оценка на експресията на индивидуални проби от отделни пациенти. Четирите от серумните миРНКи, показали най-големи промени между изследваните пул проби, а именно миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р, миРНК-424-5р и миРНК-664а-3р, бяха селектирани за индивидуален анализ. Експресията им беше измерена при 38 деца, диагностицирани с РАС и 28 клинично здрави деца с помощта на количествен PCR в реално време (RT-qPCR). Бокс плот диаграма на делта Ct-стойностите на молекулите съпоставени с екзогенна контрола са представени на Фигура 13.

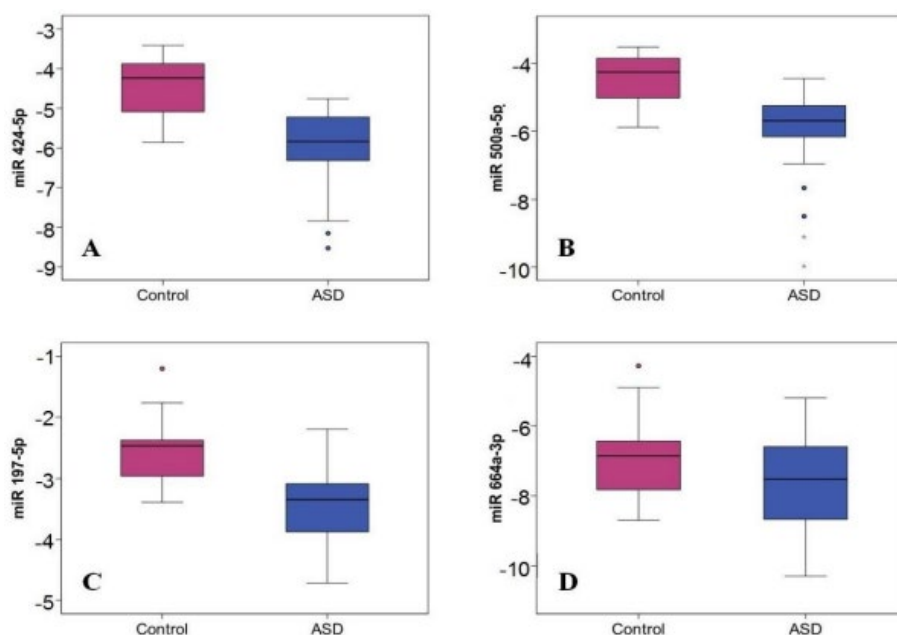
Статистическата значимост е установена чрез прилагането на непараметричен Kolmogorov–Smirnov тест. Нивата на експресия бяха нормализирани спрямо екзогенна контрола Cel-miR-39. Бокс плот диаграмите визуализиращи експресията на съответните миРНК молекули, показват понижена експресия на изследваните миРНК при деца с диагноза РАС. Стойностите показали отклонения са показани като отделни точки.

Налице е тенденция към промяна в експресионния профил свързана с РАС при изследваните кандидат миРНК молекули, както може да се види на Фиг.13. Приложеният



**Фигура 12.** Експресията на осемте миРНК молекули, показали най-големи промени между изследваните пул проби, използвайки RT-qPCR анализ. Експресионните нива на анализираните миРНК молекули са анализирани, използвайки екзогенна контрола Cel-miR-39 и съпоставени с експресионните нива на здрави контроли.

статистически анализ използвайки непараметричен тест на Kolmogorov–Smirnov демонстрира, че наблюдаваната промяна в експресията е статистически значима за всички изследвани миРНК молекули, със съответните р-стойности, както следва:  $p < 0,001$  за миРНК-424-5p;  $p < 0,001$  за миРНК-197-5p;  $p < 0,001$  за миРНК-500a-5p и  $p < 0,001$  за миРНК-

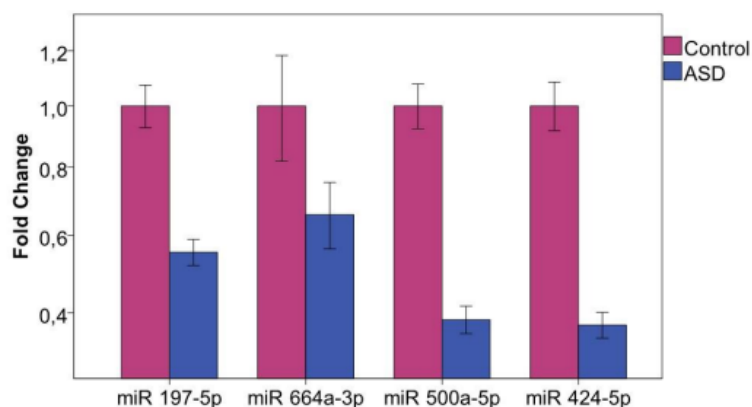


**Фигура 13.** Разлика в нивото на експресия на миРНК-424-5p, миРНК-500a-5p, миРНК-197-5p и миРНК-664a-3p в серумни образци при пациенти с РАС спрямо контролната група от здрави деца.

664a-3p. Същият експериментален подход беше приложен и за миРНК-365a-3p, която беше една от миРНК молекулите с повишени нива на експресия в предишните ни тестове със сборни проби (Kichukova et al., 2017). В случая на миРНК-365a-3p първоначалните резултати не бяха възпроизведени, поради което миРНК-365a-3p не беше подложена на допълнителни анализи. От четирите останали миРНК молекули, миРНК 197-5p и миРНК-664a-3p се характеризират с най-висока стойност на понижена експресия при пациенти с РАС.(Фигура 13).

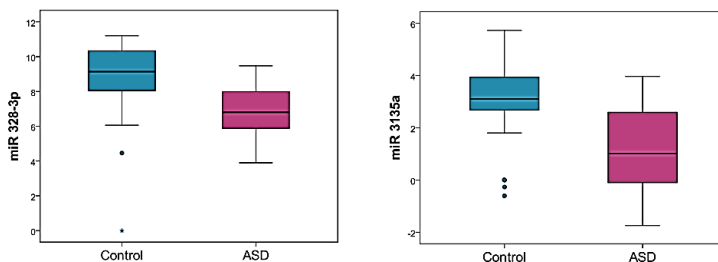
Наблюдаваните промени в нивото на експресия на анализирания серумни миРНК молекули (миРНК-197-5p, миРНК-424-5p, миРНК-664a-3p и миРНК-500a-5p) между групите от пациенти с диагноза РАС и контролна група от здрави деца са представени на Фигура 14. Данните са представени, като пъти разлика на средната стойност на  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  за всяка миРНК, след като е извършена нормализация с екзогенна (spike-in) контрола Cel-miR-39. Измерванията са извършени в две технически повторения  $\pm$  SD (грешка в стандартното отклонение).

Така получените резултати за експресията на миРНК молекулите от интерес в изследваните групи представляват тяхната разлика в пъти спрямо контролната група (fold-change). Отчетените разлики в пъти за всеки от изследваните миРНК ампликони са показани в логаритмична скала. Установеният експресионен модел се оказва доста стабилен при различните индивиди, както се вижда от малката вариабилност на данните (грешка в стандартното отклонение). По-широк диапазон на относителното ниво на експресия се наблюдава само в случай на миРНК-197-5p.



**Фигура 14.** Промени в нивото на експресия на анализирания серумни миРНК молекули (миРНК-197-5p, миРНК-424-5p, миРНК-664a-3p и миРНК-500a-5p) между групите от пациенти с диагноза РАС и контролна група от здрави деца.

В последващи изследвания на експресионен анализ бяха подложени други три серумни миРНК молекули, показали диференциална експресия, от данни получени посредством техники за секвениране от ново поколение (Small RNA-Seq.). Това са миРНК-3135а, миРНК-328-3р и миРНК-619-5р. Експресионният анализ на изброените серумни миРНК молекули беше извършен с помощта на миРНК специфичен stem-loop RT-qPCR метод. Получените данни показват промени в относителните нива на експресия на миРНК-3135а и миРНК-328-3р, които са значително по-ниски при пациенти с РАС, в сравнение с контролната група от здрави деца (Фигура 15).

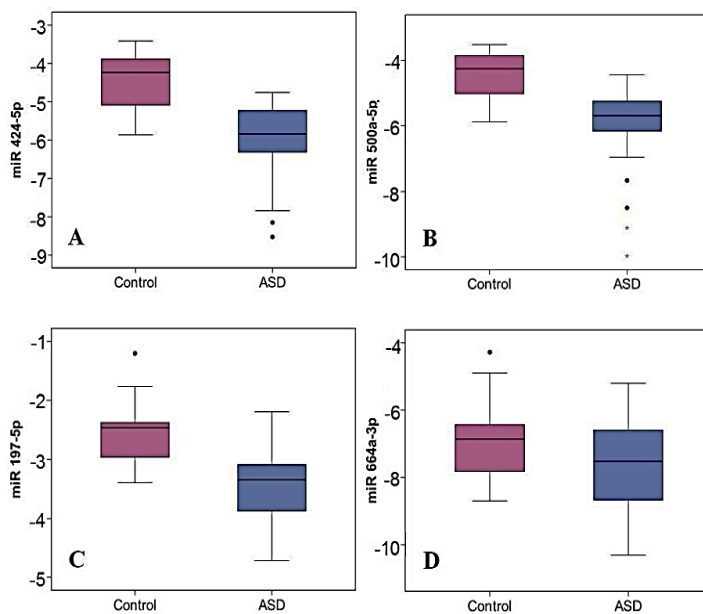


**Фигура 15.** Диференциална експресия на серумни миРНК молекули при пациенти с РАС в сравнение с контролна група от здрави деца. Представен е резултат от stem-loop RT-qPCR анализ на нивата на миРНК-3135а и миРНК-328-3р.

#### 4.6 Резултати от проведените изследвания на кандидат миРНК биомаркерни молекули в периферна кръв при деца с диагноза РАС

За изследване на експресията на кандидат миРНК молекулите в образци от периферна кръв при РАС, също беше използван миРНК специфичен stem-loop RT-qPCR анализ. Относителните нива на експресия бяха определени с помощта на ендогенна контрола U6, използвана за изчисляване на промените в миРНК експресията с помощта на  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  метод. U6 snRNA е една от най-често използваните ендогенни контроли при изследването на миРНК чрез прилагане на RT-qPCR анализ. Статистически значима промяна в експресията в периферна кръв беше установена за миРНК-424-5р и миРНК-500а-5р (Фигура 16).

Разликата в нивото на експресия на миРНК-424-5р, миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р и миРНК-664а-3р в проби от периферна кръв при пациенти с РАС спрямо контролната група от здрави деца е представена на Фигура 16. Бокс плот диаграмите, които представят експресията на съответните миРНК молекули, показват понижена експресия на миРНК-424-5р и миРНК-500а-5р при деца с диагноза РАС.



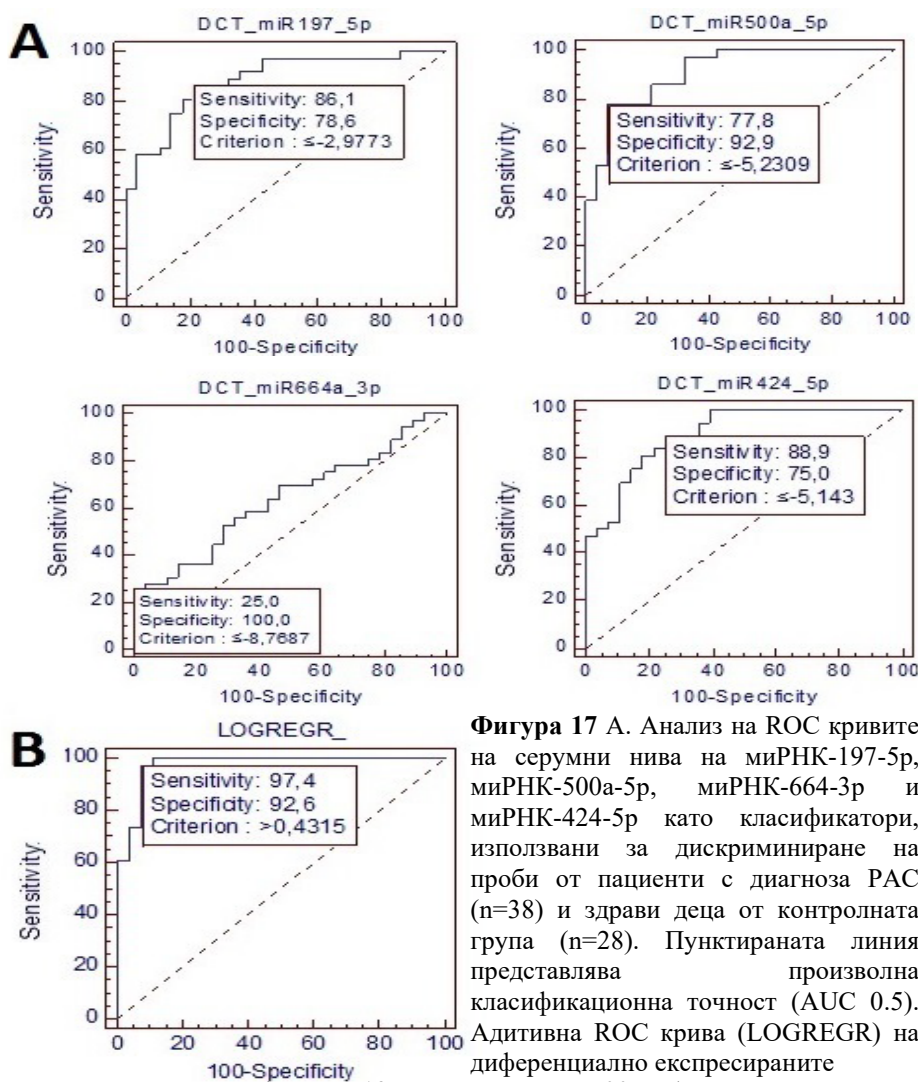
**Фигура 16.** Разлика в нивото на експресия на миРНК-424-5р, миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р и миРНК-664а-3р в проби от периферна кръв при пациенти с РАС спрямо контролната група от здрави деца.

#### 4.7 Разработване на предикторен панел свързан с РАС, използвайки четирите изследвани серумни миРНК

За да се оцени потенциала на миРНК-424-5р, миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р и миРНК-664-3р, като серумни биомаркери за РАС, беше извършен анализ на ROC кривите за определяне на диагностичната точност на изследваните миРНКи с данни от пробите анализирани с RT-qPCR. Впоследствие площта под ROC кривата (AUC), както и диагностичната чувствителност и специфичност на всяка серумна миРНК са изчислени и представени на Фигура 17А. В допълнение, точността на прогнозиране на миРНК панела, базиран на всичките четири миРНКи беше оценена чрез изготвяне на комбинирана ROC-крива (Фигура 17В).

Както е представено на Фигура 17А, когато се изчислява отделно за всяка серумна миРНК, диагностичната чувствителност е както следва: 86,1% за миРНК-197-5р; 77,8% за миРНК-500а-5р; 25% за миРНК-664-3р и 88,9% за миРНК-424-5р. От своя страна специфичността е оценена на 78,6%, 92,9%, 100% и 75%. Параметрите на AUC за миРНК-197-5р, миРНК-500а-5р и миРНК-424-5р са съответно 0.825, 0.796 и 0.756, докато за миРНК-664-3р AUC е под 0.7.

Според тези резултати, миРНК-197-5р, миРНК-500а-5р и миРНК-424-5р могат да бъдат добри прогностични биомаркери за РАС, с диагностична чувствителност (т.е. процент на истински положителни нива) близо или над 80%, и съответната висока специфичност (т.е. процент на истински отрицателни нива) и AUC стойности (т.е. точност). МиРНК-664-3р се характеризира с по-ниска диагностична ефективност, тъй като има много по-малка вероятност за откриване в проби от пациенти с РАС - само 25% чувствителност и AUC <0.7.



**Фигура 17 А.** Анализ на ROC кривите на серумни нива на миРНК-197-5р, миРНК-500а-5р, миРНК-664-3р и миРНК-424-5р като класификатори, използвани за дискриминиране на проби от пациенти с диагноза РАС (n=38) и здрави деца от контролната група (n=28). Пунктираната линия представлява произволна класификационна точност (AUC 0.5). Адитивна ROC крива (LOGREGR) на диференциално експресираниите

миРНК молекули (миРНК-197-5р и миРНК-500а-5р) в серум показва диагностична чувствителност на комбинираните класификатори от 97,4% със съответна специфичност от 92,6%. Получената ROC крива е с изчислена площ под кривата (AUC = 0,975). Представените резултати бяха получени при ниво на значимост  $p < 0,0001$ .

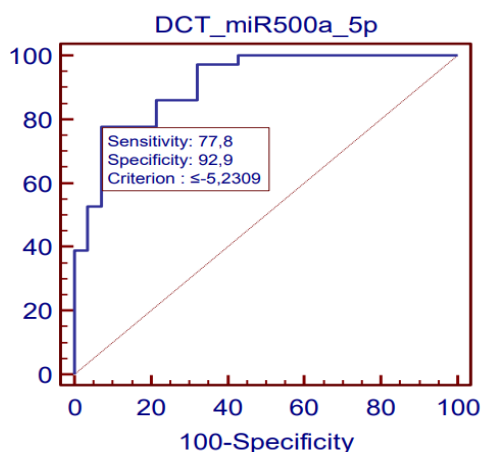
се разглеждат самостоятелно, три от избраните серумни миРНК, а именно миРНК-197-5р, миРНК-500а-5р и миРНК-424-5р, могат да дискриминират случаите на аутистично болни деца и здрави контроли с достатъчно висока точност. Най-висока диагностична точност за анализиране на пациенти с РАС се постига чрез панела, който е изграден въз основа на данни за експресионните нива на миРНК-197-5р и миРНК-500а-5р.

Данните за експресионните профили на четирите серумни миРНК, описани в това проучване, бяха едновременно взети под внимание за провеждане на комбиниран ROC анализ (Фигура 17В). Интегрирането на резултатите за миРНК-197-5р и миРНК-500а-5р биомаркерите повиши стойността на AUC до 0.975. Оценката на данните за чувствителност и специфичност на получения нов панел също бяха впечатляващи, тъй като и при двете миРНКи надминаха 90%. Експресионните нива на миРНК-424-5р и миРНК-664-3р не показаха промени, които биха могли да ги отнесат към този панел и по този начин те бяха изключени от него. Взети заедно всички тези данни демонстрират, че когато

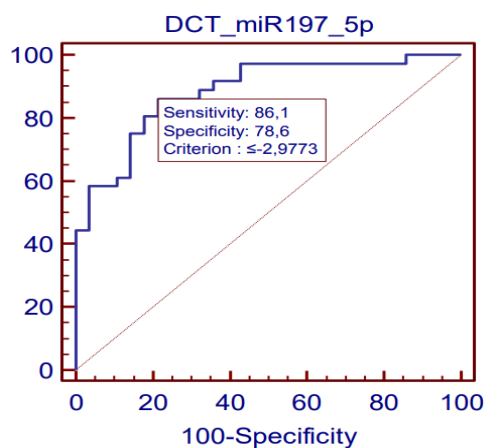


#### 4.8 ROC анализ (receiver operating characteristic) за определяне на диагностична точност на изследваните миРНК биомаркери в образци от периферна кръв при РАС

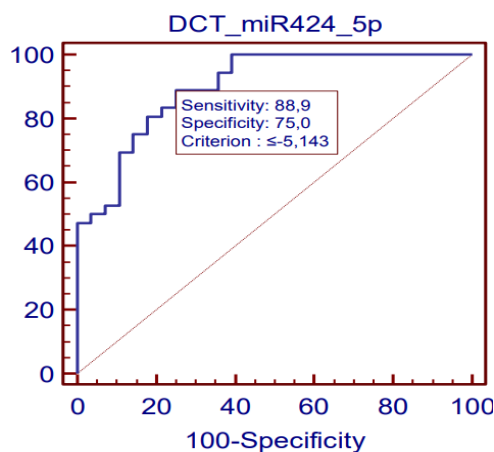
За оценка на потенциала на миРНК молекулите от интерес в алтернативен образец (периферна кръв) при РАС, беше извършен ROC (receiver operating characteristic) анализ, който имаше за цел да определи диагностичната чувствителност и специфичност на всяка от изследваните миРНК молекули, а именно миРНК-424-5p, миРНК-500a-5p, миРНК-197-5p и миРНК-664a-3p.



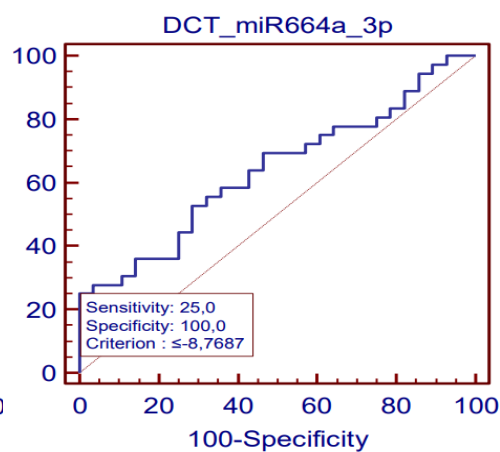
**Фигура 18.** Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с диагноза РАС от здрави контроли на база на миРНК-500a-5p като класификатор. Получена беше ROC крива с изчислена площ под кривата за миРНК-500a-5p (AUC = 0.912).



**Фигура 19.** Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с диагноза РАС от здрави контроли на база на миРНК-197-5p като класификатор. Получена беше ROC крива с изчислена площ под кривата за миРНК-197-5p (AUC = 0.884).



**Фигура 20.** Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с диагноза РАС от здрави контроли на база на миРНК-424-5p, като класификатор. Получена беше ROC крива с изчислена площ под кривата за миРНК-424-5p (AUC = 0.900).



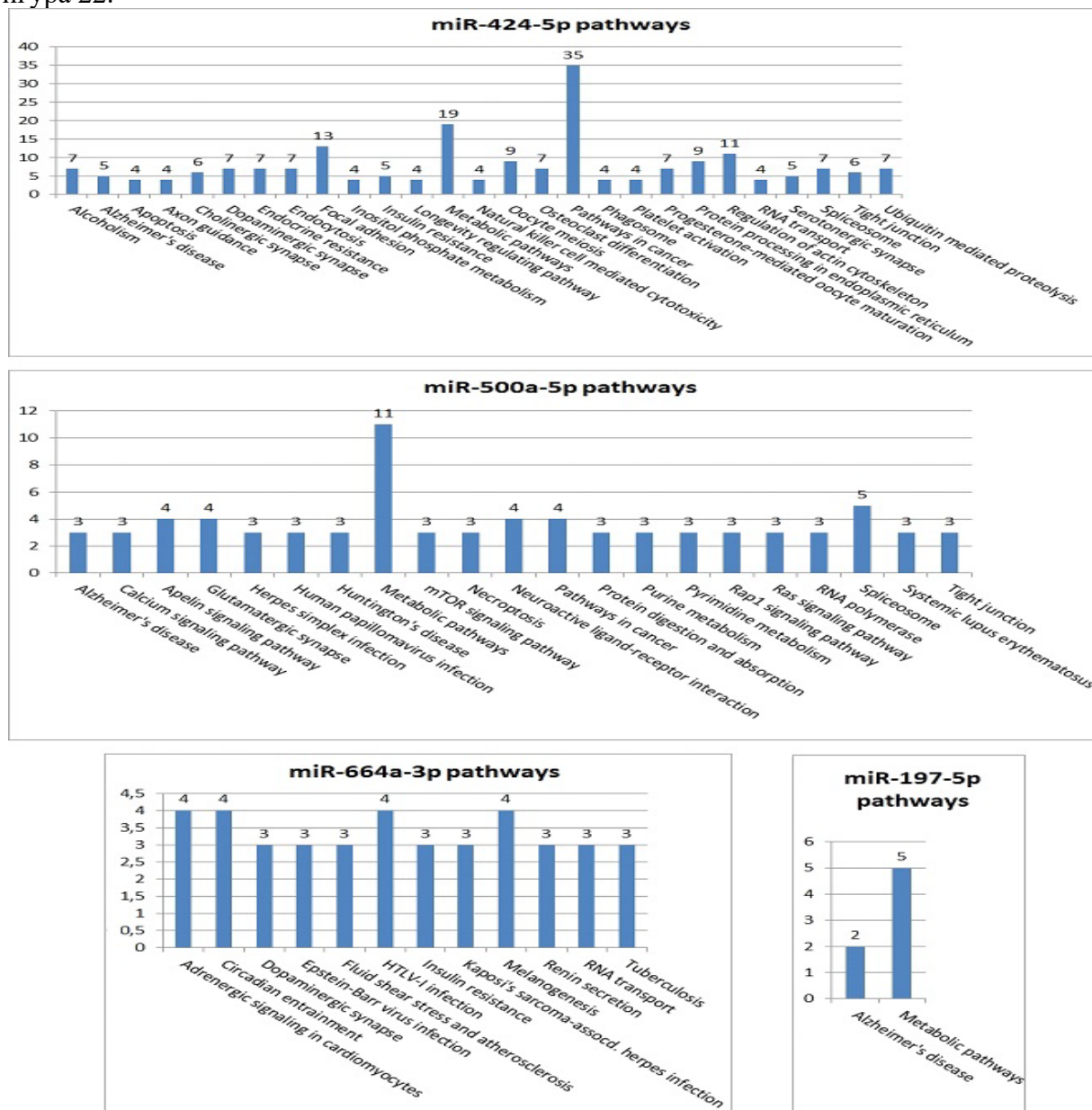
**Фигура 21.** Анализ на ROC кривите за разграничаване на пациенти с диагноза РАС от здрави контроли на база на миРНК-664a-3p като класификатор. Получена беше ROC крива с изчислена площ под кривата за миРНК-664a-3p (AUC = 0.638).

Анализът на получените резултати позволява детекцията на специфични промени в генната експресия на микро РНК молекули при РАС, като спомага за функционалното идентифициране на ключови регулаторни пътища и мрежи с участието проучваните микро РНК молекули. Резултатите от проведеното изследване ясно демонстрират наличието на диференциално експресирани микро РНК молекули, които могат да бъдат използвани като

потенциални диагностични биомаркери с цел създаване на платформа за целите на молекулярно-генетичната диагностика на аутистично болни пациенти.

#### 4.9 Участие на диференциално експресирани миРНК молекули в ключови регулаторни пътища и мрежи

Таргетните иРНК молекули на диференциално експресирани серумни миРНКи, съответно миРНК-424-5р, миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р и миРНК-664-3р са получени от базата данни miRWalk и връзката им със съответните биологични пътища е представена на Фигура 22.



**Фигура 22.** Представяне на биологичните пътища съдържащи таргетни гени на диференциално експресирани миРНК: миРНК-424-5р; миРНК-500а-5р; миРНК-664-3р и миРНК-197-5р.

Търсенето в базата данни на MirWalk идентифицира 671 уникални валидирани прицелни гени за всичките четири диференциално експресирани миРНК (35 от които са регулирани от повече от една миРНК). Установено е, че 287 от тези валидирани таргети участват в 478 различни биологични пътища, описани в базата данни на Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Това даде възможност за по задълбочено разбиране на биологичната функция на изследваните четири диференциално експресирани миРНК молекули. Повечето от проучените миРНК молекули са свързани с биологични процеси, като сигнална трансдукция, метаболизъм и ракови заболявания. Показано е, че 19 валидирани

таргетни гена участват в синаптични пътища (в холинергични, допаминергични, ГАВАергични или глутаматергични синапси).

Въпреки, че миРНК-664а-3р има множество валидирани таргетни гени, функционалният им профил е разпределен в голям набор от биологични процеси, които не са пряко свързани с ЦНС и с известни ключови аспекти от поведението при РАС.

Донякъде подобна е ситуацията с миРНК -197-5р, с тази разлика, че панелът на известните засегнати иРНКи е по-малък. Освен това миРНК -197-5р действително има 2 попадения в категория на болестта на Алцхаймер. За разлика от тях, миРНК -424-5р и миРНК -500а-5р имат много по-изразено участие в специфични за нервната тъкан биологични пътища, включително на таргетни гени, засягащи различни видове синапси, насочване на аксони, взаимодействия на невроактивни лиганди и рецептори и някои патологии (Фигура 22).

## 5. Дискусия

### 5.1 Тенденция за ранна диагноза на РАС

Към днешна дата диагностиката на разстройството от аутистичния спектър (РАС) се базира на основния диагностичен инструмент, който включва субективни наблюдения и поведенчески признаци.

Ранното разпознаване на това разстройство на неврологичното развитие дава възможност за по-добра прогноза и резултати по отношение, както на когнитивното, така и на социо-комуникативното функциониране и общите адаптивни възможности. Успоредно с неоспоримите ползи за подобряване качеството на живота на хората с РАС, ранната диагностика дава възможност за изследване патогенезата на това болестно състояние. Средната възраст на клиничната диагноза е установена около 4-5 години (Brett et al., 2016). Както при почти всички психиатрични разстройства, и при РАС липсват утвърдени физиологични или молекулярни биомаркери. Множество подходи включително неврообразна диагностика, генетични тестове, транскриптомни и протеомни изследвания се използват за разработването на нови панели от потенциални биомаркери за РАС, като вече се отчита значителен напредък в тази област.

Понастоящем има все по-голям интерес към идентифицирането на молекулярни биомаркери, които могат лесно да бъдат приложени в клиничната практика чрез използването на конвенционални лабораторни подходи, каквито са рутинното вземане на телесни течности като кръв, урина или слюнка (Heunis et al., 2018).

Следователно за подобряване диагностиката на РАС са необходими неинвазивни, лесно достъпни и икономически изгодни биомаркери. Тъй като миРНК молекулите играят важна роля в неврологичното развитие и регулирането на основните биологични процеси, те са обект на все по-интензивни изследвания, включително и в качеството им на потенциални биомаркери. Наскоро миРНК бяха предложени, като потенциални биомаркери за няколко заболявания, включително и на централната нервна система (ЦНС) (Tan et al., 2014; Gandhi et al., 2013; Shtilbans and Henchcliffe, 2012).

### 5.2 Дискусия върху ролята на миРНК молекулите, като потенциални биомаркери

През последните години все по-голям брой доказателства подкрепят хипотезата, че дисрегулацията на миРНК молекулите, като част от епигенетичния апарат може да допринесе значително за започването и развитието на невро-психиатрични нарушения. (Abdolmalek, Zhou and Thiagalingam, 2015).

Тъй като миРНК могат да бъдат включени в екзозоми и микровезикули и по този начин да бъдат освобождавани извън клетките, те могат да циркулират в телесни течности и да се транспортират до отдалечени тъкани. Този процес позволява изследването на миРНК образци, получени от ЦНС, чрез анализ на достъпен материал, като например кръв или дори слюнка (Grasso et al., 2014; Hicks et al., 2016).

Специално за РАС са идентифицирани миРНК с промяна в експресията в проби от различен произход, като мозъчна кора и малък мозък (Ander et al., 2015; Schumann et al., 2017), периферна кръв (Huang et al., 2015), серум (Kichukova et al., 2017; Mundalil Vasu et al., 2014), слюнка (Hicks et al., 2016), стволови клетки на обонятелни лигавици (Nguyen et al., 2016), моноцити (Juonouchi et al., 2017) и лимфобластни клетъчни линии (Sarachana et al., 2010).

Интересът на научната общност към разработването на диагностични тестове, базирани на циркулиращи миРНК, се поддържа от множеството предимства, които този подход може да предложи: достъпност на тъканите за тестване, ниска степен на сложност и висока стабилност на таргетните молекули, устойчивост и бързина на експерименталната процедура, сравнително ниска цена, потенциал за автоматизация, напредък в техниката за детекция и количествено определяне, специфичен експресионен профил, общи особености в експресията сред индивидите и др. (Larrea et al., 2016; Weiland et al., 2012).

Въпреки това, трябва да бъдат взети под внимание някои особености при разработването на биомаркери, базирани на миРНК. Първо, миРНК регулаторната мрежа е



изключително сложна, тъй като единична миРНК молекула е способна да регулира експресията на стотици гени, докато един ген може да бъде регулиран от множество миРНК (Hashimoto, Akiyama and Yuasa, 2013).

Следователно отнасянето на променения експресионен профил на определена миРНК към определени процеси в мозъка е голямо предизвикателство. Освен това, пластичността и изобилието на миРНК апарата правят доста малко вероятно да съществуват главни миРНК образци, чиято нормална функция ще бъде нарушена във всички или почти всички случаи на патологично състояние. В тази връзка анализирането на профил от много миРНК молекули в сравнение с единични миРНК, може значително да повиши чувствителността и специфичността на диагностичният подход.

Друго едно предизвикателство може да бъде ниското количество на циркулиращи миРНК в телесните течности, което от една страна може да повлияе на възпроизводимостта на получените резултати, а от друга страна изисква много внимателно извличане с помощта на високоефективни методи за екстракция. И накрая, от голямо значение за количественото определяне на циркулиращите миРНК в клиничната практика е необходимостта от разработване на общоприети методи за нормализиране и стандартизация. Наскоро беше публикувана референтна процедура, която е важна стъпка към постигането на тази цел (Marzi et al., 2016). Въпреки гореспоменатите предизвикателства, диагностиката на миРНК молекулите е бързо развиваща се област която тепърва предстои развитие.

Развитието на високопроизводителните технологии за секвениране даде значителен тласък на изследването на миРНК молекулите, като биомаркери за различни патологични състояния.

В настоящото проучване първоначално беше извършено профилиране на експресията на миРНК образци в периферна кръв от пациенти с РАС. Проведеното паралелно секвениране на малки РНК молекули посредством техниките за секвениране от ново поколение разкри наличието на диференциално експресирани миРНК молекулите при пациенти с РАС в сравнение със здрави контроли. След двуетапно валидиране чрез RT-qPCR, бяха идентифицирани четири миРНК, които показаха най-големи промени между изследваните пул проби в периферна кръв и в серума на пациенти с РАС, а именно миРНК-500a-5p, миРНК-197-5p, миРНК-424-5p и миРНК-664a-3p. Сред тях, миРНК-197-5p, миРНК-500a-5p и миРНК-424-5p показаха добри характеристики като прогностични биомаркери при РАС, с диагностична чувствителност близо или над 80%, и съответно сравнително висока специфичност. Докато, миРНК-664-3p се характеризира с по-ниска диагностична ефективност.

### **5.3 Дискусия на резултати от проведения от нас цялостен транскриптомен анализ**

В настоящето проучване бяха селектирани 60 проби от периферна кръв, от които 30 деца с диагноза РАС и 30 здрави контроли. Установена беше промяна в експресионния профил на 40 миРНК, от които съответно 11 миРНК с повишена и 29 с понижена експресия. Получените резултати ясно демонстрират очертана тенденция към понижаване на експресията на миРНК в анализираната група с деца с диагноза РАС. От предварително идентифицираните миРНК молекули беше изследван експресионния профил на пет серумни миРНК в индивидуални проби, като потенциални биомаркери свързани с РАС. За една от тях, миРНК-365a-3p, не беше открита статистически значима разлика в експресията между пациентите с РАС и клинично здрави деца от контролна група. За останалите четири: миРНК-500a-5p, миРНК-197-5p, миРНК-424-5p и миРНК-664a-3p, свързаният с РАС профил на понижена експресия, по-рано докладван в пул проби (Kichukova et al., 2017), беше също потвърден. Трябва да се отбележи, че миРНК-424-5p и миРНК-500a-5p медираната регулация притежава потенциала да оказва значително влияние върху ЦНС, тъй като голяма част от валидираните им иРНК таргетни молекули участват в процеси, протичащи в мозъка. За разлика от тях, няма видима връзка между други две, миРНК-197-5p, миРНК-664a-3p и ЦНС, което от части би могло да се обясни с по-малкия брой засегнати прицелни иРНК и липсата на достатъчно данни за по специфични биологични пътища в KEGG базата данни..

## **5.4 Дискусия на резултати от индивидуалната експресия на диференциално експресираниите миРНК**

### **5.4.1 миРНК-500a-5p**

МиРНК-500a-5p е най-известна с участието си в различни злокачествени заболявания и по специфично рак на черния дроб. През 2009 г. тази миРНК беше предложена като силен диагностичен маркер за хепатоцелуларен карцином (НСС) след откриването на значително високи нива на експресия в чернодробни ракови клетъчните линии, НСС тъкан и серум. Интересен факт е, че експресионните нива на серумната миРНК-500a-5p се възстановяват до нормални при трима пациенти с НСС след хирургическа интервенция (Yamamoto et al., 2009).

Следват няколко други съобщения, които свързват абнормни количества на миРНК-500a-5p с туморна патология. Например, това е една от десетте миРНКи, свързани с общата преживяемост в случаи на недребноклетъчен рак на белия дроб (NSCLC) (Joerger et al., 2014).

По същия начин, високите нива на експресия на миРНК-500a-5p се свързват с повишена клетъчна пролиферация и лоша прогноза при рак на простатата (Cai et al., 2017) и стомаха (Zhang et al., 2015) Наскоро миРНК-500a-5p беше изследвана в контекста на рака на гърдата и авторите откриха повишено количество на прицелни иРНК молекули в отговор на оксидативен стрес, което може да повлияе на развитието на тумора, както и на преживяемостта (Degli Esopsti et al., 2017). Но тази миРНК взема участие и в биологични процеси свързани с ЦНС. По време на ембриогенезата на мишки тя се открива в главния мозък, гръбначния мозък и показва особен асиметричен модел на поведение в ембрионални структури, свързани с развитието на крайниците (Wheeler et al., 2006).

През 2016 г. беше демонстрирано, че миРНК-500a-5p е фактор за невропатна болка при модели на гризачи чрез механизъм, включващ понижаване на изоформата на глутамат декарбоксилаза GAD67, което нарушава функцията на ГАВАергичните синапси (Huang et al., 2016). Нещо повече, миРНК-500a-5p е сред миРНК молекулите, които са с повишена експресия в мозъка на пациенти с ХИВ-асоциирани неврокогнитивни нарушения (HAND) и допринасят за загубата на пероксизоми и промени в тяхната морфология, като се насочват към пероксизомните фактори на биогенеза (Xu et al., 2017). Тук потвърждаваме променен експресионен профил на миРНК-500a-5p в серума на пациенти с РАС, но за разлика от ХИВ-асоциираните неврокогнитивни нарушения (HAND), в този случай, миРНК молекулите са с понижена експресия. Информационни РНК молекули, обект на посттранскрипционна регулация от миРНК-500a-5p, които са показателни за патологията на РАС, понастоящем не са известни.

### **5.4.2 миРНК-197-5p**

Две от проучванията, разглеждат конкретно миРНК-197-5p, като разкриват нейната роля при неврологичните разстройства. В първото проучване ролята на тази миРНК се свързва с болестта на Алцхаймер с късно начало (LOAD). В проучването се представят данни, демонстриращи повишена експресия на миРНК-197-5p в мозъка на пациенти, засегнати от LOAD (Roy and Mallick, 2017). Авторите описват SNP, свързани с LOAD, един от които води до загуба на мястото на свързване на миРНК в 3'UTR на транскрипционния фактор CP2. В друго изследване е показано, че миРНК-197-5p е със значително понижена експресия в плазмените екзосоми от мезиалния темпорален лоб при епилептици, с темпорална епилепсия и медиална темпорална склероза, което я превръща в един от потенциалните биомаркери за диагностициране на състоянието (Yan et al., 2017). Резултатите от тематичния преглед на публикации от 2016 до 2021 година, включително върху оригинални проучвания върху животински модел, както и с участието на пациенти потвърждават тези заключения (Yakovleva et al., 2022).

Освен това миРНК-197, от чиято 5p-верига произлиза миРНК-197-5p се счита за една от основните човешки онкомиРНКи, играещи роля или като туморен промотор или супресор, чрез таргетиране на положителни или отрицателни онкогени (Mavridis et al., 2015; Wang et al., 2016).

В своето изследване Jain, Roy и Das (2019) също съобщават, че миРНК-197 играе жизненоважна роля, като онкоген или туморен супресор при различни видове рак. Преходната свръхекспресия на миРНК-197-5p причинява значително понижаване на жизнеспособността и пролиферацията на клетките на фибросаркома чрез таргетна регулация на KIAA0101, която може да се използва за разработване на РНК-базирани терапевтични стратегии за лечението на това злокачествено заболяване.

В своето проучване Liu et al. (2018) установяват, че миРНК-197-5p е циркулираща миРНК, която корелира с миокардна фиброза и отразява честотата на нежелани сърдечни събития при пациенти със сърдечна недостатъчност на възраст под 50 години със стадии С и D.

МиРНК-197-5p показва диференциална експресия в мононуклеарни клетки на периферна кръв на пациенти с коронарна артериална болест (CAD) спрямо пациенти от контролната група (Bhansali et al., 2022).

#### **5.4.3 миРНК-424-5p**

Wu et al. (2016) селектират 56 *post mortem* тъканни проби от кората на малкия мозък при пациенти с РАС и идентифицират 37 миРНК с нарушена регулация, сред които е и миРНК-424-5p, която показва повишени нива на експресия (Wu et al., 2016). Това демонстрира, че тази миРНК може да се разглежда, като кандидат биомаркер, асоцииран с РАС. Има много съобщения, че тази миРНК се открива при различни онкологични заболявания. В някои случаи, като аденокарцином на дебелото черво в ранен стадий (Liu et al., 2017), рак на стомаха (Wei et al., 2016) и рак на устната кухина (Zeljic et al., 2018), тази миРНК е с повишена секреция. В други, например, аденокарцином на шийката на матката (Zhou et al., 2017) и рак на яйчниците (Liu et al., 2018), миРНК-424-5p действа, като типичен туморен супресор и по този начин експресията на тази миРНК се понижава в засегнатите тъкани, което е свързано с абнормна клетъчна пролиферация. Очевидното участие на миРНК-424-5p в регулацията на скоростта на клетъчното делене в различни тъкани може да има роля и в развитието на патологията на РАС. Наскоро Wu et al. (2016) излагат хипотезата, че еволюционната роля на някои миРНКи в мозъка на приматите е свързана с инхибиране на прекомерната клетъчна пролиферация, явление, наблюдавано при деца с диагноза РАС. Следователно, понижената експресия на миРНК-424-5p в РАС проби може да отразява недостатъчна способност за ограничаване на ранния постнатален мозъчен растеж.

#### **5.4.4 миРНК-664a-3p**

Най-забележителната връзка на миРНК-664a-3p с невропсихиатричните заболявания в литературата е представена в доклад, посветен на болестта на Алцхаймер и голямото депресивно разстройство (Mendes-Silva et al., 2016). В своя доклад авторите извършват систематичен преглед на миРНК, които са с нарушена регулация при двете състояния, като установяват, че само седем са общи и за двете състояния, една от които е миРНК-664a-3p. В представеното в дисертацията изследване, въпреки че понижената експресия на тази миРНК при пациенти с РАС е статистически значима, тя показва най-ниската промяна в нивата на експресия и най-слабата прогностична сила.

#### **5.4.5 Дискусия на участието на диференциално експресирани миРНК молекули в ключови регулаторни пътища и мрежи**

В заключение, представените данни показват, че четири миРНК: миРНК-500a-5p, миРНК-197-5p, миРНК-424-5p и миРНК-664a-3p, са с постоянно понижена експресия в серума на деца, с диагноза РАС, което предполага, че те биха могли да се използват, като лесно достъпни и обективно измерими потенциални биомаркери за това разстройство. Диагностичната точност на молекулярния тест, базиран на миРНК-500a-5p и миРНК-197-5p, ще бъде най-висока, ако тези миРНК се оценяват обединени в един панел. Естествено, ще са необходими допълнителни подкрепящи доказателства от по-големи независими проучвания преди въвеждането им в клиничната практика.

## 6. Заключение

Разстройството от аутистичния спектър е комплексно разстройство на неврологичното развитие с различна степен и тежест на симптоматиката. Настоящата клинична оценка на РАС се основава на субективни преценки на клиницистите. Това може да бъде преодоляно чрез използването на лесни за идентифициране, циркулиращи миРНК биомаркери, което дава възможност за по-надеждна диагностика и оценка на различни патологични състояния. Всяка миРНК има стотици потенциални прицелни иРНК молекули и по този начин може да упражнява контрол върху различни генни мрежи. Освен това, миРНК молекулите са стабилни и се откриват в биологични течности, където могат да циркулират в микровезикули, екзосоми, апоптотични тела или в комплекси с РНК-свързващи протеини. В настоящия дисертационен труд са изследвани четири диференциално експресирани циркулиращи миРНК в проби от периферна кръв и серум на пациенти с РАС, които имат потенциала да бъдат обещаващи биомаркери за това разстройството на неврологичното развитие. Циркулиращите миРНК, както в периферна кръв, така и в серум са с нарушена регулация при лица с диагноза РАС, но към момента няма установена повторяемост на резултатите сред проучванията. Освен това е важно да се оцени, че получените резултати от миРНК експресионните изследвания, които водят до статистически значими разлики, изискват голям размер на извадката.

В допълнение, тези проучвания са използвали различни методи за количествен анализ. За разлика от микрочиповете и RT-qPCR анализа, само високопроизводителните технологии за секвениране позволяват откриването на нови малки некодиращи РНК молекули, както и количественото определяне на всички миРНК.

Секвенирането на малки РНК молекули се превърна в революционна техника от последно поколение, която значително ще допринесе за откриването на нови потенциални биомаркери. Въпреки това, биологичното значение зад огромното количество генерирани данни трябва да бъде анализирано, интерпретирано и проверено, като се използват не само биоинформатични инструменти, но също така и *in vitro* или *in vivo* модели за детайлно интерпретиране на всяко взаимодействие на миРНК с прицелните гени на РАС.

Взаимодействията между предполагаемите миРНК кандидат биомаркери се основават на алгоритми и аналитични инструменти, което прави тези доклади основно описателни. Необходими са последващи функционални проучвания за оценка на молекулярните механизми, които стоят зад взаимодействието между миРНК и техните прицелни иРНК, и съответно техния принос към РАС.

Необходими са допълнителни проучвания, за да се установи как потенциалните миРНК могат да предскажат риска от развитието на РАС преди появата на поведенчески аномалии, подобрявайки ранната диагностика на това разстройство на неврологичното развитие. Да предположат посоката на развитие на децата и да предскажат отговора на терапията и лечението.

## 7. Изводи

1. Изследването на профила от малки РНК молекули при РАС в сравнение с контролната група деца с прилагането на NGS показва наличието на специфични промени, характерни за РАС.
2. Резултатите от миРНК профилирането посредством използването на NGS технологии за секвениране на малки РНК молекули позволи детекцията на 42 диференциално експресирани миРНК молекули в групата на децата с диагноза РАС спрямо контролната група. Анализът на данните от NGS в РАС групата определи с висока степен на достоверност 40 диференциално експресирани миРНК (11 от които с повишено ниво и 29 с понижено ниво на експресия) в сравнение с контролната група.
3. Проведеният количествен RT-qPCR анализ демонстрира, че осем от изследваните миРНК, показват най-големи промени в експресията между изследваните пул проби. Резултатите показаха, статистически значима промяна в нивата на експресия на три серумни миРНК (миРНК-365а-3р, миРНК-619-5р, миРНК-664а-3р) при аутистично болни пациенти. Те показаха по-високи експресионни нива от тези в контролната група, докато другите пет серумни миРНК (миРНК-3135а, миРНК-328-3р, миРНК-197-5р, миРНК-500а-5р, и миРНК-424-5р) са с по-ниски нива на експресия в сравнение с извадката от здрави деца от контролната група. Получените резултати ясно демонстрират тенденция към понижаване на експресията на миРНК в анализираната група с РАС.
4. Индивидуалното валидиране на идентифицираните осем серумни миРНК с помощта на RT-qPCR потвърди, че четири от изследваните миРНК показват най-големи промени между изследваните пул проби, а именно миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р, миРНК-424-5р и миРНК-664а-3р.
5. Разликите в експресионните нива на четирите миРНК молекули в периферна кръв и в серум могат обективно да разграничат лицата с диагноза РАС от контролната група деца, което е видно от проведените ROC анализи, поради което тези миРНК (миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р, миРНК-424-5р и миРНК-664а-3р) могат да се разгледат като потенциални биомаркерни молекули при РАС.
6. Диагностичната точност на молекулярния тест, базиран на миРНК-500а-5р и миРНК-197-5р, ще бъде най-висока, ако тези миРНК се оценяват обединени в общ панел.

## 8. Приноси

1. В настоящия дисертационен труд за първи път се описват четири микро РНК в проби от периферна кръв и серум, съответно, миРНК-500а-5р, миРНК-197-5р, миРНК-424-5р и миРНК-664а-3р, като кандидат биомаркери, асоциирани с РАС.
2. В настоящата дисертация за първи път беше установен променен експресионен профил на миРНК-500а-5р и миРНК-197-5р в серума на пациенти с РАС и потвърдихме, че тези миРНК взимат участие в биологични процеси свързани с ЦНС и играят роля при неврологични разстройства.
3. Идентифицирани са обещаващи кандидат миРНК, които могат да се използват, като лесно достъпни и обективно измерими биомаркери при РАС.

## 9. Публикации

Във връзка с дисертационния труд:

1. Kichukova T, Petrov V, Popov N, Minchev D, Naimov S, Minkov I, Vachev T. Identification of serum microRNA signatures associated with autism spectrum disorder as promising candidate biomarkers. *Heliyon*. 2021 Jul 3;7(7):e07462. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07462. PMID: 34286132; PMCID: PMC8278430.
2. Kichukova TM, Popov NT, Ivanov IS, Vachev TI. Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder using Stem-loop qRT-PCR Assay. *Folia Med (Plovdiv)*. 2017 Mar 1;59(1):43-52. doi: 10.1515/folmed-2017-0009. PMID: 28384108.
3. Kichukova TM, Popov NT, Ivanov HY, Vachev TI. Circulating microRNAs as a Novel Class of Potential Diagnostic Biomarkers in Neuropsychiatric Disorders. *Folia Med (Plovdiv)*. 2015 Jul-Dec;57(3-4):159-72. doi: 10.1515/folmed-2015-0035. PMID: 27180342.

Участия в конференции:

1. ДНИ НА МЕДИЦИНСКАТА НАУКА, 13.05.2016 – Проектна сесия, Проект НО-12/2013 – Изследване на серумните нива на микро рнк биомаркерни молекули при деца с аутизъм с цел създаване на неинвазивната молекулярна диагностика на аутистично болни. Ръководител: проф. Иван Иванов

## 10. Литература

1. Abdolmaleky, H.M., Zhou, J.-R., Thiagalingam, S. (2015). An update on the epigenetics of psychotic diseases and autism. *Epigenomics*. 2015;7(3):427–449
2. Ander, B.P., Barger, N., Stamova, B., Sharp, F.R., Schumann, C.M. (2015). Atypical miRNA expression in temporal cortex associated with dysregulation of immune, cell cycle, and other pathways in autism spectrum disorders. *Mol. Autism*. 2015, 6, 1–13
3. Bhansali, S., Yadav, A. K., Bakshi, C., Dhawan, V. (2022). Interleukin-35 Mitigates ox-LDL-Induced Proatherogenic Effects via Modulating miRNAs Associated with Coronary Artery Disease (CAD). *Cardiovasc Drugs Ther*. 2022 Apr 18
4. Brett, D., Warnell, F., McConachie, H., Parr, J.R. (2016). Factors affecting age at PAC diagnosis in UK: no evidence that diagnosis age has decreased between 2004 and 2014. *J Autism Dev Disord* 46:1974–1984
5. Cai, B., Chen, W., Pan, Y., Chen, H., Zhang, Y., Weng, Z., & Li, Y. (2017). Inhibition of microRNA500 has anti-cancer effect through its conditional downstream target of TFPI in human prostate cancer. *Prostate*, 77(10), 1057–1065
6. Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J., Zhou Z., Lee D. H., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179. DOI: 10.1093/nar/gni178
7. Degli Esopsti, D., Aushev, V. N., Lee, E., Cros, M.-P., Zhu, J., Herceg, Z., Hernandez-Vargas, H. (2017). miR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival. *Scientific Reports*, 7(1), 15966
8. Gandhi, R. et al. (2013). Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 73, 729–740
9. Grasso, M., Piscopo, P., Confaloni, A., Denti, M.A. (2014). Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *TL - 19. Molecules*. 2014;19 VN-r(5):6891–6910. (Basel, Switzerland)
10. Hashimoto, Y., Akiyama, Y., & Yuasa, Y. (2013). Multiple-to-Multiple Relationships between MicroRNAs and Target Genes in Gastric Cancer. *PLoS ONE*, 8(5)
11. Heunis, T., Aldrich, C., Peters, J.M., Jeste, S.S., Sahin, M., Scheffer, C. et al. (2018). Recurrence quantification analysis of resting state EEG signals in autism spectrum disorder—a systematic methodological exploration of technical and demographic confounders in the search for biomarkers. *BMC Med* 16:101
12. Hicks, S.D., Ignacio, C., Gentile, K., Middleton, F.A. (2016). Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. *BMC Pediatr*. 2016;16(1)
13. Huang, F., Long, Z., Chen, Z., Li, J., Hu, Z., Qiu, R., Zhuang, W., Tang, B., Xia, K., Jiang, H. (2015). Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. *PLoS ONE* 2015, 10, e0129052
14. Huang, Z.-Z., Wei, J.-Y., Ou-Yang, H.-D., Li, D., Xu, T., Wu, S.-L., Xin, W.-J. (2016). mir-500- Mediated GAD67 Downregulation Contributes to Neuropathic Pain. *Journal of Neuroscience*, 36(23), 6321–6331
15. IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
16. Jain, N., Roy, J., Das, B., Mallick, B. (2019). miR-197-5p inhibits sarcomagenesis and induces cellular senescence via repression of KIAA0101. *Mol Carcinog*. 2019 Aug;58(8):1376-1388. doi: 10.1002/mc.23021. Epub 2019 Apr 18
17. Joerger, M., Baty, F., Früh, M., Droege, C., Stahel, R. A., Betticher, D. C., Brutsche, M. (2014). Circulating microRNA profiling in patients with advanced non-squamous NSCLC receiving bevacizumab/erlotinib followed by platinum-based chemotherapy at progression (SAKK 19/05). *Lung Cancer*, 85(2), 306–313
18. Jyonouchi, H., Geng, L., Streck, D.L., Dermody, J.J., Toruner, G.A. (2017). MicroRNA expression changes in association with changes in interleukin-1 $\beta$ /interleukin10 ratios produced by monocytes in autism spectrum disorders: their association with neuropsychiatric symptoms and comorbid conditions (observational study) *J. Neuroinflammation*. 2017;14(1)
19. Kichukova, T. M., Popov, N. T., Ivanov, I. S., and Vachev, T. I. (2017). Profiling of circulating serum microRNAs in children with autism spectrum disorder using stem-loop qRT-PCR assay. *Folia Med*. 59, 43–52. doi: 10.1515/folmed2017-0009
20. Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol*. 2011 Jul,Chapter 15:Unit 15.10. doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95. PMID: 21732315, PMCID: PMC3152947
21. Larrea, E., Sole, C., Manterola, L., Goicoechea, I., Armesto, M., Arestin, M., Lawrie, C. H. (2016). New concepts in cancer biomarkers: Circulating miRNAs in liquid biopsies. *International Journal of Molecular Sciences*



22. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
23. Liu, W., Zheng, J., Dong, J., Bai, R., Song, D., Ma, X., Zhao, L., Yao, Y., Zhang, H., Liu, T. (2018). Association of miR-197-5p, a Circulating Biomarker for Heart Failure, with Myocardial Fibrosis and Adverse Cardiovascular Events among Patients with Stage C or D Heart Failure. *Cardiology*. 2018;141(4):212-225
24. Liu, J., Liu, F., Li, X., Song, X., Zhou, L., Jie, J. (2017). Screening key genes and miRNAs in early-stage colon adenocarcinoma by RNA-sequencing. *Tumour Biol*. 2017 Jul;39(7):1010428317714899. doi: 10.1177/1010428317714899. PMID: 28714374
25. Marzi, M. J., Montani, F., Carletti, R. M., Dezi, F., Dama, E., Bonizzi, G., Nicasmio, F. (2016). Optimization and standardization of circulating MicroRNA detection for clinical application: The miRtest case. *Clinical Chemistry*, 62(5), 743–754.
26. Mavridis, K., Gueugnon, F., Petit-Courty, A., Courty, Y., Barascu, A., Guyetant, S., Scorilas, A. (2015). The oncomiR miR-197 is a novel prognostic indicator for non-small cell lung cancer patients. *Br. J. Canc*. 2015;112(9):1527–1535
27. Mendes-Silva, A. P., Pereira, K. S., Tolentino-Araujo, G. T., Nicolau, E. de S., Silva-Ferreira, C. M., Teixeira, A. L., & Diniz, B. S. (2016). Shared Biologic Pathways Between Alzheimer Disease and Major Depression: A Systematic Review of MicroRNA Expression Studies. *The American Journal of Geriatric Psychiatry : Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 24(10), 903–912
28. miRWalk 2.0: Available at: <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/> (Accessed: November 7, 2022).
29. Mundalil Vasu, M., Anitha, A., Thanseem, I., Suzuki, K., Yamada, K., Takahashi, T., Wakuda, T., Iwata, K., Tsujii, M., Sugiyama, T. (2014). Serum microRNA profiles in children with autism. *Mol. Autism*, 5, 1–9
30. Nguyen, L.S., Lepleux, M., Makhoulouf, M., Martin, C., Fregeac, J., Siquier-Pernet, K....Colleaux, L. (2016). Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Mol. Autism*. 2016, 7, 1–13
31. Roy, J., Mallick, B. (2017). Altered gene expression in late-onset Alzheimer’s disease due to SNPs within 3’UTR microRNA response elements. *Genomics*. 2017;109(3–4):177–185
32. Sarachana, T., Zhou, R., Chen, G., Manji, H. K., Hu, V. W. (2010). Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med*. 2010;2(4)
33. Shtilbans, A. & Henchcliffe, C. (2012). Biomarkers in Parkinson’s disease: an update. *Curr Opin Neurol* 25, 460–465
34. Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006>
35. Schumann, C.M., Sharp, F.R., Ander, B.P., Stamova, B. (2017). Possible sexually dimorphic role of miRNA and other sncRNA in ASD brain. *Mol. Autism*. 2017;8(1)
36. Tan, L. et al. (2014). Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 40, 1017–1027 (2014)
37. Wang, D. D., Chen, X., Yu, D. D., Yang, S. J., Shen, H. Y., Sha, H. H., Zhong, S. L., Zhao, J. H., & Tang, J. H. (2016). miR-197: A novel biomarker for cancers. *Gene*, 591(2), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.035>
38. Wang, J., Robinson, J. F., Khan, H. M. R., Carter, D. E., McKinney, J. (2004). Optimizing RNA extraction yield from whole blood for microarray gene expression analysis. *Clinical Biochemistry*. 2004, 37:741-4
39. Wei, S., Li, Q., Li, Z., Wang, L., Zhang, L., & Xu, Z. (2016). MiR-424-5p promotes proliferation of gastric cancer by targeting Smad3 through TGF-β signaling pathway. *Oncotarget*, 7(46)
40. Weiland, M., Gao, X.-H., Zhou, L., & Mi, Q.-S. (2012). Small RNAs have a large impact: Circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. *RNA Biology*
41. Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Granda, B., Rathjen, T., & Dalmay, T. (2006). Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs. *FEBS Letters*, 580(9), 2195–2200
42. Wu, Y. E., Parikshak, N. N., Belgard, T. G., & Geschwind, D. H. (2016). Genome-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience* 2016, 19, 1463–1476
43. Xu, Z., Asahchop, E. L., Branton, W. G., Gelman, B. B., Power, C., & Hobman, T. C. (2017). MicroRNAs upregulated during HIV infection target peroxisome biogenesis factors: Implications for virus biology, disease mechanisms and neuropathology. *PLoS Pathogens*, 13(6)

44. Yakovleva, K.D., Dmitrenko, D.V., Panina, I.S., Usoltseva, A.A., Gazenkampf, K.A., Konovalenko, O.V., Kantimirova, E.A., Novitsky, M.A., Nasyrova, R.F., Shnayder, N.A. (2022). Expression Profile of miRs in Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 16;23(2):951
45. Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y., Mizutani, T., Ochiya, T. (2009). MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 14(7), 529–538
46. Yan, S., Zhang, H., Xie, W., Meng, F., Zhang, K., Jiang, Y....Zhang, J. (2017). Altered microRNA profiles in plasma exosomes from mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Oncotarget.* 2017;8(3)
47. Zeljic, K., Jovanovic, I., Jovanovic, J., Magic, Z., Stankovic, A., & Supic, G. (2018). MicroRNA meta-signature of oral cancer: evidence from a meta-analysis. *UPSALA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 123(1), 43–49
48. Zhang, L., Ding, Y., Yuan, Z., Liu, J., Sun, J., Lei, F., Zhang, D. (2015). MicroRNA-500 sustains nuclear factor- $\kappa$ B activation and induces gastric cancer cell proliferation and resistance to apoptosis. *Oncotarget*, 6(4), 2483–2495
49. Zhou, Y., An, Q., Guo, R. xia, Qiao, Y. huan, Li, L. xia, Zhang, X. yan, & Zhao, X. lan. (2017). miR424-5p functions as an anti-oncogene in cervical cancer cell growth by targeting KDM5B via the Notch mignaling pathway. *Life Sciences*, 171, 9–15
50. Въчев, Т. (2022). Сравнителни геномни, транскриптомни и протеомни изследвания при невноразвитийни разстройства. Дисертация за присъждане на научна степен "доктор на науките", област на висше образование Природни науки, математика и информатика, шифър 4.3. професионално направление Биологически науки, научна специалност Молекулярна биология. ПУ Паисий Хилендарски. Биол. фак. Кат. Физиология на растенията и молекулярна биология, Защитен пред Науч. жури / 26.02.2021

## **Благодаря сърдечно:**

- ❑ На научните си ръководители доц. д.б.н. Тихомир Върчев и доц. д.с.н. Самир Наимов за помощта в изработването, написването и оформянето на настоящия дисертационен труд!
- ❑ На всички колеги от Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ за разбирането, споделяния опит и ценните съвети!
- ❑ На д-р Данаил Минчев за помощта при изготвянето на статията за публикация!
- ❑ На д-р Стефан Христов за съветите, идеите, безпрекословната помощ и подкрепа през целия процес на изготвяне на дисертационния труд!
- ❑ На семейството ми за оказаната подкрепа, житейските съвети, търпението и вярата в мен!

