



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
MEDICAL UNIVERSITY - SOFIA

СБОРНИК

Резюмета на изследователски проекти
2016-2017

Бюджетно финансирани проекти на
медицински научни изследвания

Медицински Университет – София

**НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ ОТ
ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ
ФИНАНСИРАНИ ОТ МЕДИЦИНСКИ
УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**Наредба за условията и реда за оценката, планирането, разпределението и
разходването на средствата от държавния бюджет за финансиране на присъщата на
държавните висши училища научна или художественотворческа дейност**

Издадена от Министерство на образованието и науката
(Обн. - ДВ, бр. 73 от 16.09.2016 г., в сила от 01.01.2017 г.)

Данните, представени от изследователските екипи, към датата на отчитане на договора, се публикуват редактирани.
Технически редактор: Проф. д-р И. Николова, секретар на СМН.

**СЪСТАВ НА
СЪВЕТА ПО МЕДИЦИНСКА НАУКА
В МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**ОПРЕДЕЛЕН СЪС ЗАПОВЕД № РК 36-1270/30.06.2016 Г., ВЪЗ ОСНОВА НА
РЕШЕНИЕ НА АКАДЕМИЧНИЯ СЪВЕТ ОТ 28.06.2016 Г.**

с мандат 01 юли 2016 – 01 юли 2020 г.:

Председател:

1. Проф. Валентина Боянова Петкова-Димитрова, дфн - Зам.-ректор по наука и акредитация на МУ-София

Секретар с право на глас:

2. Проф. д-р Ирина Николова Николова, дм

Членове:

3. Проф. д-р Димка Вълчанова Хинова-Палова, дм
4. Проф. д-р Радослав Александров Гърчев, дмн
5. Проф. д-р Сабина Захаријева Захаријева, дмн
6. Проф. д-р Боряна Петрова Делийска, дмн
7. Проф. д-р Милена Димитрова Пенева, дмн
8. Доц. д-р Илиана Павлова Йончева-Недкова, дм
9. Проф. Пламен Тодоров Пейков, дф
10. Проф. д-р Анжелика Спасова Велкова-Монова, дмн
11. Проф. Захарина Ангелова Савова, дп
12. Акад. д-р Радомир Георгиев Радомиров, дмн
13. Проф. Мариела Константинова Оджакова-Байтошева, дб
14. Проф. Албена Борисова Момчилова, дбн
15. Проф. д-р Златко Николов Кълвачев, дмн
16. Доц. д-р Дора Николова Попова, дм
17. Валентина Любенова Пейчева, дб

СЪСТАВ НА
КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ
В МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
(КЕНИМУС),

ОПРЕДЕЛЕН СЪС ЗАПОВЕД № РК 36-1262/29.06.2016 Г., ВЪЗ ОСНОВА НА
РЕШЕНИЕ НА АКАДЕМИЧНИЯ СЪВЕТ ОТ 28.06.2016 г.

с мандат 01 юли 2016 – 01 юли 2020 г.:

Председател:

1. Проф. д-р Сашка Попова, дм

Членове:

2. Чл.-кор. проф. д-р Мила Власковска, дмн
3. Проф. д-р Румяна Търновска, дм
4. Проф. д-р Ангелина Киселова, дмн
5. Доц. д-р Гриша Матеев, дм
6. Доц. д-р Весела Стоянова, дм
7. Проф. Илиана Йонкова, дфн
8. Проф. Радка Кънева, дб
9. Емилия Николова
10. Кристиан Пройчев

Секретар:

Натали Димитрова

СЪДЪРЖАНИЕ

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ	1
MEDICAL UNIVERSITY - SOFIA	1
МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „ГРАНТ’ 2016”	34
Договор 1/2016 Въвеждане на молекулярно-генетичен подход за диагностика на миотония конгенита тип Бекер в България	34
Договор 2/2016 Ефекти на Лептин върху терморегулацията у плъхове с модел на затлъстяване: роля на GABA _B -рецепторни механизми	34
Договор 3/2016 Серопревалиране на <i>Helicobacter pylori</i> инфекцията при деца и проучване на пробиотици с потенциал за контрол на инфекцията	36
Договор 4/2016 Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към карбапенеми на проблемни клинични изолати <i>Acinetobacter baumannii</i> от четири университетски болници в България	37
Договор 5/2016 Постоперативна болка при стрептозотицин-индуциран диабет: фармакологично модулиране.....	38
Договор 6/2016 Антиангиогенен ефект и цитотоксични механизми на хидроксиантрахинона алое-емодин в човешки мозъчни микроваскуларни ендотелни клетки	39
Договор 7/2016 Скриниране на новосинтезирани кумаринови и хроменови съединения (фаза II и III) с определяне на ED50 и TD50 и прилагане на 6 Hz модел на фармакорезистентна епилепсия	40
Договор 8/2016 Изследвания върху гените за токсигенност на първите български изолати на ентерохеморагични <i>Escherichia coli</i> (EHEC, STEC)	41
Договор 10/2016 Прилагане на високоразделителни мас спектрометрични методи за изследване на участието на протеин киназа CK2 в хетеро-олигомерните VMPPRs комплекси от нормални човешки първични дентални пулпни клетки.....	42
Договор 11/2016 Изследване на ролята на Wnt3a върху експресията на стволовоклетъчни и апоптотични маркери в човешки мезенхимни стволови клетки от апикална папила	43
Договор 12/2016 Взаимодействие между серотонинергичната и GABA-ергичната невромедиаторни системи в ретината на нисши гръбначни.....	44
Договор 13/2016 Проучване на факторите на вирулентност при клинично-значими щамове <i>E.coli</i> и <i>K.pneumoniae</i> , продуциращи карбапенемази и/или широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) в пет болници в София, Варна и Плевен	45

Договор 14/2016 Изследване ролята на ангиотензин АТ1 рецепторите в механизмите регулиращи мозъчната реактивност при каинатен модел на епилепсия у спонтанно хипертензивни и нормотензивни W1STAR плъхове	46
Договор 15/2016 Роля на канабиноидната и катехол-аминергичната невротрансмитерни системи върху ноцицепцията и поведенческите отговори след стрес на плъх	47
Договор 16/2016 Модел на депресия: Участие в поведенчески реакции на ангиотензин II микроинжектиран в амигдала на плъхове	48
Договор 17/2016 Роля на хормоните лептин, адипонектин и грелин в механизмите на инсулинова резистентност при хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза.....	49
Договор 18/2016 Роля на киоторфина в поведенческите и хистологични изменения предизвикани от експериментален модел на Болестта на Алцхаймер.....	50
Договор 19/2016 Роля и разпределение на матриксни металопротеинази 2 и 9 в епилигамента на колатералните връзки на колянната става при плъх в норма и експеримент	52
Договор 20/2016 Участие на ангиотензинови АТ1 рецептори в механизма на поведенческите промени при захарен диабет тип 2 у спонтанно хипертензивни плъхове	53
Договор 21/2016 Участие на аденозин А ₁ рецепторите и азотния оксид, синтезиран от невроналната форма на азотен оксид синтазата в регулацията на бързите колебания на бъбречния кръвоток у плъхове	54
Договор 23/2016 Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху апоптотичната сигнална каскада при нормални човешки кератиноцити	55
Договор 24/2016 Анализ на соматични мутации при основните хистологични типове белодробни карциноми: ПК, АК, НЕТ (КТ, ДКБД и ЕКНЕК) в група български пациенти чрез секвениране от ново поколение на панел от тумор-асоциирани гени.....	56
Договор 25/2016 Изследване на качеството на овогенезата in vivo и in vitro в овоцити на мишки с експериментално предизвикан системен лупус	57
Договор 26/2016 Асоциативен анализ на полиморфни маркери в или в близост до подбрани кандидат - гени, свързани с предразположението към артериална хипертония, при българи....	58
Договор 27/2016 Анализ на соматични мутации при български пациенти с колоректални и стомашни карциноми чрез секвениране от ново поколение на панел от тумор-асоциирани гени	59
Договор 29/2016 Молекулярни маркери с диагностична и прогностична стойност при лечение на солидни тумори в детска възраст	60
Договор 30/2016 Генетично профилиране на ларингеален карцином чрез секвениране от ново поколение	61
Договор 31/2016 Определяне на глутаматен транспортер EAAT2 в мозък на плъхове с неонатална епилепсия и плъхове с фетален алкохол синдром	62

Договор 32/2016 Сравнителни проучвания на ефектите на рисперидон и пробиотик върху молекулярни и поведенчески параметри на мъжки плъхове в експериментални модели на аутизъм и фетален алкохол синдром.....	62
Договор 33/2016 Влияние на Pentoxifylline върху промените в кожата на хипотиреоидни плъхове	64
Договор 34/2016 Изследване антидепресивния ефект от комбинираното прилагане на escitalopram и физическа активност при експериментални модели на депресия	65
Договор 35/2016 Потвърдителен анализ на потенциално патогенни варианти в гени свързани с Болест на Паркинсон, открити при секвениране от ново поколение	66
Договор 36/2016 Продукцията на флавоноиди в ин витро култури на <i>Astragalus vesicarius</i> L. и тяхната потенциална антиоксидантна активност.....	66
Договор 38/2016 Включване на бромпроизводни хидразони в полимерни частици и ин витро оценка на антиоксидантната им активност	67
Договор 40/2016 Мултифакторен анализ на екстракция, комбиниран с течно-хроматографско - мас спектрометрично определяне на биологичноактивни вещества в <i>Portulaca oleracea</i> L. (тученица)	68
Договор 41/2016 <i>Gypsophila glomerata</i> Pall ex M.B. (Caryophyllaceae): потенциален източник на биологичноактивни вещества.....	69
Договор 44/2016 <i>Geigeria alata</i> : източник на кафеилхинни киселини с потенциален антиоксидантен, антихипертензивен и антидиабетен ефект	70
Договор 45/2016 Фитохимично и фармакологично проучване на флавоноидния състав на <i>Astragalus spruneri</i>	71
Договор 46/2016 Антиоксидантна и цитопротективна активност на биологично активни лантанидни комплекси.....	72
Договор 47/2016 Оценка на химическата стабилност и биологична активност на антимикробни пептиди тип alfa-defensin 2.....	73
Договор 48/2016 Изследване на НСПВс за in vitro антитуморна/антипролиферативна активност в експериментални моделни системи	74
Договор 49/2016 Синтез и охарактеризиране на нови метокси-производни на салицилалдехидбензоил хидразона и техни Ga(III) метални комплекси с потенциална биологична активност.....	75
Договор 50/2016 Проучване на възможностите за приготвяне на лекарствени форми с изменено освобождаване с теофилин чрез едностепенна и многостепенна екструзия	77
Договор 51/2016 Платинови комплекси със смесени аминокиселини лиганди. Дизайн, синтез, спектрално охарактеризиране, теоретично предсказване и фармакологично изследване.....	77

Договор 52/2016 Физиологично охарактеризиране на новосинтезирани производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина.....	79
Договор 53/2016 Флавоноиди от надземната част на <i>Chenopodium bonus-henricus</i> L. – изолиране, идентифициране и фармакологично проучване за наличие на радикал-свързваща/антиоксидантна активност и невропротективен ефект при модели на индуцирана невротоксичност <i>in vitro</i>	80
Договор 54/2016 Дизайн и охарактеризиране на термо-чувствителни наноразмерни лекарство-доставящи системи на основата на поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид) съполимери	81
Договор 55/2016 Изследване влиянието на растежния фактор Vascular endothelial growth factor (VEGF) върху производството на колаген и остеогенната диференциация на стволови клетки от периодонтален лигамент <i>in vitro</i>	82
Договор 56/2016 Наноструктурни покрития с приложение в денталната медицина.....	83
Договор 58/2016 Определяне на концентрациите на някои маркери на възпаление и деструкция в слюнка и гингивален ексудат за диагноза на пародонталните заболявания.....	84
Договор 63/2016 Изследване ролята на фармакогенетични фактори при прецизиране лекарствената терапия с такролимус при пациенти с бъбречна трансплантация в България	85
Договор 67/2016 Изследване на връзката между полиморфизма <i>IL-17 rs2275913</i> и серумните нива на <i>IL-17</i> – фактори за развитието на дерматомиозит у възрастни.....	86
Договор 81/2016 Епигенетични биомаркери при български пациенти с езофагеални тумори .	87
Договор 90/2016 Анализ на експресията на микроРНКи в плазма при пациенти с не-дребноклетъчни белодробни карциноми и обструктивни белодробни болести	88
Договор 96/2016 Съхранение на тъкани за доразширяване на тъканна, плазмена и ДНК банка от пациенти с рак на гърдата	89
Договор 97/2016 Разширяване на биобанката от пациенти с овариален карцином и оптимизиране на условията за съхранение на биологични материали	90
МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ КОНКУРС „ГРАНТ’ 2017”	92
Договор Д-55/02.05.2017 Ефекти на 5-HT ₂ антагонисти върху хипертермията при модел на серотонинов синдром.....	92
Договор Д-56/02.05.2017 Проучване токсигенността и макролидната резистентност при клинично значими пиогенни коки <i>Streptococcus pyogenes</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>	92
Договор Д-57/02.05.2017 Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към гликопептидни антибиотици на клинични изолати <i>Enterococcus spp.</i>	93
Договор Д-58/02.05.2017 Молекулярно-генетична диагностика при пациенти с неизяснен тип невромускулни заболявания чрез секвениране от ново поколение	95

Договор Д-59/02.05.2017 Проучване на основни механизми на резистентност към бета-лактами и хинолони при резистентни на цефалоспорини трета генерация и/или карбапенеми клинично-значими изолати <i>Enterobacter spp</i> в университетска болница “Света Марина” Варна	96
Договор Д-61/02.05.2017 Генетични изследвания при ултразвукови данни за вродени сърдечни аномалии, DiGeorge синдром и синдром на хипопластично ляво сърце	97
Договор Д-62/02.05.2017 г. Секвениране от ново поколение на пациенти с наследствена невросензорна слухова загуба за изясняване на генетичната причина за слуховата увреда	98
Договор Д-63/02.05.2017 г. Експресионен профил на фактори на ангиогенезата при спонтанни аборти.....	99
Договор Д-64/02.05.2017 Клонирание гените за токсигенност на шигатоксин продуциращи изолати <i>Escherichia coli</i> и проучване тяхното взаимодействие с клетъчния рецептор CD77	99
Договор Д-65/02.05.2017 г. Изследване ефекта на третиране с агомелатин през епилептичен статус индуциран с каинова киселина върху механизмите регулиращи мозъчната реактивност при модел на темпорална епилепсия	100
Договор Д-66/02.05.2017 Image-based high content screening анализи на участието на протеин киназа СК2 в сигнализацията, обуславяща TGFβ2-индуцирания епително-мезенхимен преход на човешки епителни лещни клетки (LECs), изолирани от anterioren субкапсуларен катаракт	102
Договор Д-67/02.05.2017 Роля на канабиноидната и серотонинергичната невротрансмитерни системи върху ноцицепцията, предизвикана от студов стрес при плъх	103
Договор Д-68/02.05.2017 г. Модулиране на паметовите процеси от ангиотензин II и лосартан въведени в амигдала на плъхове с модел на депресия.....	104
Договор Д-69/02.05.2017 Пост-ваксинален ефект на 10-валентната пневмококова конюгирана ваксина (PHiD-PCV10) върху етиологията на заболяването остър среден отит (АОМ) и носителство на отопатогенни бактерии при деца с АОМ през 2015-2016 г.	106
Договор Д-70/02.05.2017 Влияние на промоторния полиморфизъм rs266729 върху транскрипционната регулация на адипонектиновия ген (ADIPOQ) при нормално протичаща бременност и гестационен диабет	107
Договор Д-71/02.05.2017 Проучване на ефекти на мезембринови алкалоиди, медиранни от серотонин и цАМФ, върху поведението на плъхове при експериментален модел на захарен диабет тип 1	108
Договор Д-72/02.05.2017 Фармакологично проучване на ефекти на пиоглитазон в експериментален модел на аутизъм	109
Договор Д-73/02.05.2017 Сравнително изследване на антидепресивните и имуномодулиращите ефекти на Escitalopram в условия на обогатена и изолирана среда за живот	110
Договор Д-74/02.05.2017 Сравнителна оценка на ефекти на 2Н-хромен- и кумарин-субституирани хидразид-хидразони върху нивата на експресия на провъзпалителни цитокини	

при гърчов модел с максимален електрошок (MES test) и при тест за ноцицепция с формалин при мишки	111
Договор Д-75/02.05.2017 Изясняване ролята на подобрени полиморфни варианти в гени, асоциирани със стойностите на артериалното налягане, по отношение на риска за развитие на исхемична болест на сърцето	112
Договор Д-77/02.05.2017 Изследване на копийни варианти при пациенти с болест на Паркинсон	113
Договор Д-78/02.05.2017 <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> изследвания на новосинтезирано производно на галантамина с мощна антихолинестеразна активност	114
Договор Д-79/02.05.2017 Елицитиране продукцията на арилтетралинови лигнани в клетъчни системи <i>in vitro</i>	115
Договор Д-80/02.05.2017 Възможности за продукция на флавоноиди от <i>in vitro</i> култури на <i>Astragalus monspessulanus</i> L. и изследване на тяхната биологична активност	116
Договор Д-81/02.05.2017 Проучвания на близкородствени и редки за българската флора видове от род <i>Astragalus</i> L.	116
Договор Д-83/02.05.2017 Аналитично охарактеризиране на някои Омега ненаситени мастни киселини в хранителни добавки, чрез използване на газхроматографски метод	117
Договор Д 84/02.05.2017 LC-HRMS аналитичен профил на биологичноактивни вторични метаболити в листа от <i>Solanum schimperianum</i> Hochst.....	118
Договор Д-85/02.05.2017 Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на фармакологичната активност на нови метокси-заместени ароилхидразони	119
Договор 86/02.05.2017 <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> ефекти на алцезефолизид (кверцетин-3- <i>O</i> - α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-[α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)]- β -D-галактопиранозид) при различни модели на интоксикация	120
Договор Д-87/02.05.2017 Анализ на сесквитерпенови лактони в арника с различен произход чрез газ хроматография-маспектрометрия с висока резолюция	121
Договор 88/02.05.2017 Проучване на невропротективните ефекти на 3,4,5-трикафеилхинна киселина, изолирана от <i>Geigeria alata</i> (Asteraceae) в модел на алкохолен оксидативен стрес при плъх	122
Договор Д-89/02.05.2017 Токсикологично охарактеризиране на екстракт от <i>Clinopodium vulgare</i> (Lamiaceae)	123
Договор Д-90/02.05.2017 Синтез на 1-заместени метилксантинови производни, молекулно моделиране и изследване за предполагаема антихолинестеразна активност	124
Договор Д-91/02.05.2017 Синтез, охарактеризиране, химични свойства и оценка на потенциални невропротективни ефекти и възможна инхибиторна активност върху човешка рекомбинантна MAO-B на новосинтезирани хидразидхидразони на кофеин-8-тиопропанова киселина	125

Договор Д-92/02.05.2017	Антиоксидантна протекция на кверцетин, енкапсулиран в полизахаридни наночастици върху модели на оксидативен стрес <i>in vitro</i>	126
Договор Д-93/02.05.2017	Синтез на N-пиролил хидразид-хидразони и оценка на вероятен инхибиторен MAO-B ефект	127
Договор Д-94/02.05.2017	Разработване на мезопорести силикатни наночастици като носител на прамипексол	128
Договор Д-95/02.05.2017	Експериментално изследване за противотуморна и антипролиферативна активност на Алмирал инжекционен разтвор.....	129
Договор Д-97/02.05.2017	Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Клинични, имунологични и микробиологични изследвания	130
Договор Д-115/02.05.2017	Изследване на полиморфизмите rs1799782 и rs25487 в XRCC1 гена като фактори за развитието на дерматомиозит у възрастни	131
МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ "ГРАНТ' 2016"		132
Договор 9/2016	Съвременни тенденции в конвенционалните и молекулярно-биологични методи при видовата идентификация на микроорганизми, причиняващи вулво-вагинална кандидоза, бактериална вагиноза и техните хронични форми	132
Договор 22/2016	Клинично значение на серумния хепсидин при възпалителни и туморни заболявания на червата.....	132
Договор 28/2016	Клинични и демографски характеристики и тяхната връзка с някои биомаркери на системно възпаление при пациентите с астма-ХОББ припокриващ синдром ...	134
Договор 37/2016	Установяване на асоциации между свръхчувствителност към хранителни алергени и полиморфизъм в локус HLA-DRB1.....	135
Договор 57/2016	Проучване ролята на имуногенетични биомаркери при пациенти с пренеоплазии и спиноцелуларен карцином на устната лигавица	136
Договор 60/2016	Референтни граници за оксидазна активност на церулоплазмин за българската популация. Меден статус – нови лабораторни аспекти при пациенти с болест на Уилсън	137
Договор 61/2016	Ниво на витамин Д сред пациенти с дихателни нарушения по време на сън	138
Договор 62/2016	Проучване на диагностичното и прогностично значение на някои нови биомаркери (ССА-СА и M2-ПК в кръвен серум и IGF-1 в жлъчка) при пациенти с механичен иктер	139
Договор 64/2016	Изследване на серумни антитела срещу <i>Pseudomonas aeruginosa</i> при пациенти с муковисцидоза и сравнение на резултатите от стандартно микробиологично изследване на секрети от дихателните пътища.....	140
Договор 65/2016	Изследване на белодробната функция при деца със сколиоза	142

Договор 66/2016 Клинико-морфологичен разрез и анализ на мекотъканни тумори с ретроперитонеална локализация; проучване и оценка на диагностична, клинична и прогностична стойност на имунохистохимичната експресия на P53 и MDM2.....	143
Договор 69/2016 Синдром на поликистозните яйчници и сърдечно-съдов риск.....	144
Договор 70/2016 Неврологични, съдови и биохимични фактори в еволюцията на диабетното стъпало.....	145
Договор 71/2016 Проучване значението на имунологични и имуногенетични фактори за развитието на ВКV репликация след трансплантация.....	146
Договор 72/2015 Връзка на стреса като невроендокринен фактор с клиничния ход на болестта при пациенти с хронична уртикария.....	147
Договор 73/2016 Оценка на NT-проBNP при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност..	148
Договор 74/2016 Възпаление и тиреоиден аутоимунитет при пациенти с фибромиалгия.....	149
Договор 75/2016 Определяне на диагностичната и прогностичната стойност на микрорибонуклеинови киселини в плазма при пациенти със системен лупус еритематозус....	150
Договор 76/2016 Експресионен анализ на микрорибонуклеинови киселини в плазма при пациенти с ревматоиден артрит и определяне на диагностичната и прогностичната им стойност.....	150
Договор 77/2016 Оценка на ефективността от вътреставно приложение на автоложна богата на тромбоцити плазма при пациенти с гонартроза.....	151
Договор 78/2016 Нарушения на съня при пациенти с остра сърдечна недостатъчност.....	152
Договор 79/2016 Оценка и проследяване на сърдечно-съдовия риск и ролята на аполипопротеин С3 при пациенти с хроничен панкреатит, първична и вторична панкреасна екзокринна недостатъчност.....	153
Договор 82/2016 Изследване на ниво на витамин Д [25(OH)D] при деца в училищна възраст през зимно-пролетния и лятно-есенния период.....	154
Договор 83/2016 Некласически форми на 21-хидроксилазен дефицит: клинична и молекулярно-генетична диагноза.....	155
Договор 84/2016 Генетични полиморфизми, свързани с невроендокринната дисфункция при синдром на поликистозните яйчници.....	155
Договор 85/2016 Неинвазивна диагноза на неалкохолната стеатозна болест/ неалкохолен стеатозен хепатит при пациенти с въглехидратни нарушения.....	156
Договор 86/2016 Показатели за гликемичен контрол при бременни жени с гестационен захарен диабет и захарен диабет.....	157
Договор 87/2016 Връзка на сърдечно-съдова автономна дисфункция със сетивна полиневропатия, неензимно гликиране и някои кардио-метаболитни рискови фактори при предиабет (нарушена гликемия на гладно и нарушен глюкозен толеранс).....	158

Договор 88/2016 Честота и прогресия на автоимунните тироидни заболявания при пациентки с пролактином: сравнително проспективно проучване	159
Договор 91/2016 Патогенетична роля на регулаторните Т лимфоцити (Treg) при HIV+HCV+ коинфектирани пациенти	160
Договор 92/2016 Роля на някои гени, свързани с овариалната функция, за преждевременното яйчниково стареене при жени	162
Договор 93/2016 Нови акценти в диагностичния алгоритъм, спектъра и честотата на вирусологичните агенти (парвовирус В19, аденовируси и Chlamidia trachomatis) ангажирани в развитието на патологична бременност	163
Договор 94/2016 Честота на постпункционно главоболие при пациенти след спинална анестезия за цезарово сечение – рандомизирано проучване, сравняващо спинални игли с тип Quincke, Sprotte и Atraucan дизайн на върха	164
Договор 95/2016 Създаване на скринингов модел за късна прееклампсия чрез изследване на биохимични и биофизикални маркери в 30 – 33 г.с.	165
МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „ГРАНТ’ 2017”	167
Договор Д-54/02.05.2017 Проучване ролята на хепсидин в патогенезата на атеросклерозата	167
Договор Д-60/02.05.2017 Използване на молекулярно диагностични техники за доказване на херпесни вируси (HSV-1, HSV-2 и VZV) при суспектни за херпесни инфекции пациенти, както и такива с усложнения или неясна клинична картина.....	169
Договор Д-96/02.05.2017 Оценка на зъбното покритие от горната устна при покой и усмивка	170
Договор Д-98/02.05.2017 Изследване на HLA-асоциирани генетични фактори и кодираните от тях молекули при пациенти със спиноцелуларен карцином на устната лигавица	171
Договор Д-99/02.05.2017 Ефективност на пародонтална пластична микрохирургия за лечение на коренова сензитивност (root dentine sensitivity)	172
Договор Д-100/02.05.2017 Ефективност на фотодинамичната терапия в сравнение с хлорхексидинов чип (Periochip®) в третирането на пародонталния джоб	173
Договор Д-101/02.05.2017 Присъствие на IL-8 генен полиморфизъм и серумни нива на IL-8 при пациенти с хроничен пародонтит	174
Договор Д-102/02.05.2017 Сравнително ин витро изследване степента на отстраняване на замърсяващия слой, степента на деконтаминация и възможността за създаване на ендодонтски моноблок при два различни иригационни протокола	175
Договор Д-103/02.05.2017 Дигитален протокол за анализ и лечение на функционалните и естетични смущения при пациенти с вродена цепнатина на устна и/или небце	176

Договор Д-109/02.05.2017	Оценка на ролята на интраоперативната лъчетерапия (ИОЛТ), при лечение на карцинома на млечната жлеза	177
Договор Д-110/02.05.2017	Проучване и оценка на диагностичната и прогностичната роля на острофазовите протеини IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-9 и прокалцитонин като предиктори за ранна инсуфициенция на анастомозата след предна резекция на ректума	178
Договор Д-111/02.05.2017	Изследване диагностичната и прогностична стойност на фибронектина при пациенти със солидни тумори	179
Договор Д-112/02.05.2017	Био имидж изследвания на клетъчната физиология на първични човешки клетъчни култури, изолирани от <i>in vivo</i> интраоперативно третирани с <i>trypan blue</i> предни лещени капсули на пациенти с възрасто-обусловена катаракта и вродена катаракта... 179	179
Договор Д-113/02.05.2017	Предиктивен модел за оценка на пре-трансплантационен крос-мач и антитяло медирана реактивност при бъбречна трансплантация	181
Договор Д-114/02.05.2017	Микро- и макросъдови промени при неалкохолната стеатозна болест с или без нарушения във въглехидратната обмяна	182
Договор Д-116/02.05.2017	Оперативно възстановяване на очната повърхност при пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция чрез трансплантация на <i>ex vivo</i> размножени лимбални стволови клетки	183
Договор Д-117/02.05.2017	Изследване на влиянието на клетъчни култури от Glioblastoma multiforme върху Tregs, Th17 и моноцити в състава на периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави донори	184
Договор Д-118/02.05.2017	Серумни биомаркери за болестна активност и прогноза при пациенти с прогресивна системна склероза, с водещи белодробни поражения.....	185
Договор Д-119/02.05.2017	Ранна диагноза, скрининг и проследяване на пациенти с неясна хронична диария и микроскопски колит, посредством изследване на фекални маркери	185
Договор Д-120/02.05.2017	Скрининг и диагностика на автоимунен панкреатит и съпътстваща панкреасна екзокринна функция.....	186
Договор Д-121/02.05.2017	Изследване на процент Th17 клетки и съответните им цитокини в хода на лечение с бетаинтерферони и fingolimod при пациенти с множествена склероза с оглед оценка на терапевтичния отговор	187
Договор Д-122/02.05.2017	Ниво на лептин при момчета с пубертетна гинекомастия.....	188
Договор Д-123/02.05.2017	Изследване на генетични полиморфизми, свързани с лекарствения отговор към метотрексат при пациенти с юношески идиопатичен артрит	189
Договор Д-124/02.05.2017	Парвовирус В19 инфекция, асоциирана с анемичен синдром при пациентки с рискова бременност	190
Договор Д-125/02.05.2017	Роля на някои стресови хормони за възникването на метаболитни нарушения при пациенти с обезитет.....	191

Договор Д-126/02.05.2017	Връзка на някои интерлевкини с клиничната активност на тиреоид-асоцираната офталмопатия и потенциалната им роля в терапевтичния подход.....	192
Договор Д-127/02.05.2017	Витамин Д в спектъра на предиабетните състояния и сърдечно-съдовата автономна дисфункция	193
Договор Д-128/02.05.2017	Оценка на диагностичния подход и някои маркери на сърдечносъдов риск при първичен алдостеронизъм.....	194
Договор Д-129/02.05.2017	Възпалителни биомаркери при пациенти със синдром на Астма-ХОББ припокриване	195
Договор Д-130/02.05.2017	Характеристика на генотипа и лекарствената резистентност на HBV при HIV/HBV коинфектирани пациенти.....	196
МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ “ГРАНТ’ 2016”		197
Договор 39/2016	Проучване влиянието на включените и изключени лекарствени продукти от Позитивния лекарствен списък върху достъпа и публичните разходи.....	197
Договор 42/2016	Проучване на качеството на живот, амбулаторната терапия на пациенти с редки заболявания в България и на техния достъп до лечение и до фармацевтично обслужване	198
Договор 43/2016	Проучване на безопасността и ефикасността на лекарства за лечение на редки заболявания – систематичен преглед и мета анализ	200
Договор 59/2016	Създаване на стандартен модел за манипулативна техника в практическото обучение по сестрински и акушерски грижи.....	200
МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ “ГРАНТ’ 2017”		202
Договор Д-76/02.05.2017	Трудови злополуки и сменен режим на работа. Биомаркери за стрес в слюнка	202
Договор Д-82/02.05.2017	Оценка на безопасността на херниалните платна чрез изследване на механичната им съвместимост с тъканите и качеството на живот на пациентите	203
Договор Д-104/02.05.2017	Изследване на субективното възприятие за качество на трудовия живот на работещи в здравеопазването	204
Договор Д-105/02.05.2017	Създаване на симулационна лаборатория по интравенозна терапия	206
Договор Д-106/02.05.2017	Въвеждане на обучение по биоетика в съвременните училища – фактор за здравословен стил на живот на подрастващото поколение	207
Договор Д-107/02.05.2017	Концептуален модел за измерване на безопасността като елемент от качеството на медицинските дейности	208
Договор Д-108/02.05.2017	Съдържание на флавоноиди и общи феноли в български храни и структурирането на данните в единен информационен регистър.....	210
КОНКУРС „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2016“		212

МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2016“ 212

Договор 1-Д/2016 Молекулни характеристики на *von Hippel-Lindau* синдром при български пациенти 212

Договор 2-Д/2016 Алгоритъм за установяване на резистентност към макролиди при *STREPTOCOCCUS PYOGENES* в български клинични изолати..... 213

Договор 5-Д/2016 Количествен PCR в реално време на хромозомни микроаберации, открити при пациенти с комплексни епилептични синдроми чрез микрочипова технология..... 214

Договор 8-Д/2016 Секвениране чрез синтез от ново поколение при селектирани пациенти с различни характеристики на вродени аномалии на бъбреците и отделителната система (ВАБОС) 215

Договор 11-Д/2016 Експресионен анализ на Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4) и Toll-like receptor 7 (TLR7) при пациенти с хроничен гноен отит и хроничен риносинусит 215

Договор 12-Д/2016 Експресионен анализ на разширен панел от подбрани хипоксични микро РНКи при пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса в тъканни и плазмени проби 216

Договор 13-Д/2016 Невропротективна и антиоксидантна активност на новосинтезирани С-8 заместени с арилпиперазинов фрагмент кофеинови производни при различни модели на токсичност *in vitro*..... 217

Договор 14-Д/2016 Пренилирани ацилфлороглуциноли от *Hypericum olympicum* L. - изолиране, структурно охарактеризиране и фармакологично изпитване за антинеопластична активност.. 218

Договор 15-Д/2016 Изследване на нестероидни противовъзпалителни лекарства за противовирусна активност 219

Договор 16-Д/2016 Изследване на ацетилхолинестеразна и бутирилхолинестеразна активност на хибридни съединения между Галантамин и 4-аминопиридина 219

МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2017“ 221

Договор Д-131/02.05.2017 Молекулярно-генетичен анализ на TSC2 гена при български пациенти с Туберозна склероза 221

Договор Д-133/02.05.2017 Проучване на способността на 4-метокси производни на салицилалдехидбензоилхидразон (SBH) да повлиява системи, генериращи активни форми на кислорода и анализ на връзката структура-действие чрез раманова спектроскопия 221

Договор Д-134/02.05.2017 Изследване на връзката между артериалната ригидност и някои циркулиращи маркери на сърдечно-съдовия риск у лица от различни възрастови категории.. 222

Договор Д-135/02.05.2017 Определяне на лептин-индуцираната експресия на фосфорилирания сигнален преобразувател и активатор на транскрипцията 3 (pSTAT3) в преоптичната област на предния хипоталамус на плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване 223

Договор Д-137/02.05.2017 Изследване ролята на хипоксични микро РНКи при карцином на ларинкса.....	224
Договор Д-138/02.05.2017 Експресионен анализ на микроРНК-и при недребноклетъчни белодробни карциноми	225
Договор Д-139/02.05.2017 Епидемиологично типирание на щамове <i>Streptococcus pyogenes</i> , изолирани от болни с различни инфекции.....	226
Договор Д-143/02.05.2017 Изследване на причинно-следствена връзка между HPV-инфекция, митохондриален статус, ДНК фрагментация и идиопатичен мъжки инфертилитет.....	227
Договор Д-145/02.05.2017 Асоциация между полово-предавани инфекции, HPV инфекция и абнормална цервикална цитология	228
Договор Д-146/02.05.2017 Изследване на кетопрофен, аналгин и мелоксикам за противовирусна активност	229
Договор Д-147/02.05.2017 Оценка ефектите на новосинтезирани производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина върху невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y и активността на човешки рекомбинантен ензим МАОВ	230
МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2016“	231
Договор 3-Д//2016 Корелация между централно аортно налягане и промените в лявото предсърдие при пациенти с артериална хипертония.....	231
Договор 4-Д/2016 Циркулиращи CD4(+)CD28(-) Т лимфоцити при пациенти с автоимунен тиреоидит и връзката им с клиничните и лабораторни показатели на заболяването	232
Договор 6-Д/2016 Мутации в гена кодиращ hTPO сред клинично селектирани български пациенти с първичен вроден хипотиреоидизъм	232
Договор 7-Д/2016 Методи за предоперативна оценка на промените в очната повърхност и определяне степента на значението им за постоперативния резултат	233
Договор 9-Д/2016 Изследване на възпалителни маркери в серум при пациенти със стабилна хронична обструктивна белодробна болест	234
Договор 10-Д/2016 Приложение на РЕЕР при продължителни гинекологични операции	235
МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2017“	237
Договор Д-132/02.05.2017 Оценка на значението на панел от соматични мутации като прогностични фактори при карцинома на стомаха	237
Договор Д-136/02.05. 2017 Диагностика и оценка на степента на малабсорбция на жлъчни киселини при пациенти с микроскопски колит, посредством изследване на серумни и фекални маркери	237
Договор Д-140/02.05.2017 Изследване на фенотип и цитокинова секреция на Т-хелперните субпопулации Th17 и Tregs при пациенти със системна склероза	239

Договор Д-141/02.05. 2017 Сравняване на диагностичната стойност на IGRA-тест (T-SPOT.TB) в периферна венозна кръв и в бронхоалвеоларна лаважна течност.....	240
Договор Д-142/02.05. 2017 Биохимични, генетични и ехографски критерии за оценка степента на развитие на стеатоза и фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст	241
Договор Д-144/02.05.2017 Експресия на андрогенния рецептор в асоциация с други прогностични и предиктивни фактори при български пациенти с рак на гърдата	242
Договор Д-148/02.05.2017 Въвеждане на пулсовата оксиметрия в денталната медицина за диагностика на зъбната пулпа	243
КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2016”	245
Договор 1-С/2016 Въвеждане на биохимичен и молекулярно-генетичен подход за диагностика на биотинидазен дефицит в България	245
Договор 2-С/2016 Идентифициране и мониториране мутациите на <i>EGFR</i> , <i>K/N-RAS</i> <i>BRAF</i> върху клетъчно-свободната, циркулираща туморна ДНК по време на системна противотуморна лекарствена терапия при болни с метастатичен белодробен и колоректален карцином	246
Договор 3-С/2016 Молекулярно-генетичен анализ на вирулентността, резистентността и епидемиологията на български клинично-значими изолати <i>Streptococcus pyogenes</i>	247
Договор 4-С/2016 Серумен хепсидин и корелацията му с показатели за оценка на оксидативен стрес при невродегенеративни заболявания.....	248
Договор 5-С/2016 Ролята на някои защитни механизми в слюнката при развитието на протезен стоматит у пациенти, с цели протези, подплатени с еластични материали на силиконова основа	250
Договор 6-С/2016 Участие на високорискови типове папиломни вируси в развитие на простатен карцином и/или преканцерозни състояния	251
Договор 7-С/2016 Изследване на трансдукционните механизми, регулиращи пролиферацията на стволовите епидермални кератиноцити	252
Договор 8-С/2016 Нов подход за изследване на локализацията на медикаментозно индуцирани невродегенеративни процеси в мозък на плъх посредством диференциална сканираща калориметрия	253
Договор 9-С/2016 Комплексна оценка на характеристиките на глюкозния профил и сърдечно-съдовия риск при предиабетни състояния	255
Договор 10-С/2016 Дизайн и антихолинестеразна активност на нови инхибитори на ацетилхолинестеразата – четвърти етап.....	256
Договор 11-С/2016 Разработване на системен подход на база високоразделителна мас спектрометрия и биоинформационен анализ за доказване произход на растителни екстракти- приложение при <i>Portulaca oleracea</i> L. (тученица)	256

Договор 12-С/2016 Влияние на половите хормони върху субгингивалната микрофлора и пародонталното здраве при деца през пубертета.....	257
Договор 13-С/2016 Пилотно проучване на цитокиновия профил при пациенти, лекувани с дентални имплантати	258
КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2017”	260
Договор Д-232/15.12.2017 Чревно носителство на широкоспектърни бета-лактамаза и/или карбапенемаза-продуциращи <i>Enterobacteriaceae</i> при хоспитализирани, амбулаторни пациенти и здрави хора - деца и възрастни	260
Договор Д-233/15.12.2017 Нови биохимични, генетични и клинични маркери за оптимизиране на диагностиката и мониторирането на неалкохолната стеатозна болест при пациенти със затлъстяване и предиабет	261
Договор Д-234/15.12.2017 Остър панкреатит - оценка на тежестта на заболяването и ролята на ентералното хранене в терапевтичния процес	262
Договор Д-235/15.12.2017 Оценка на връзката между хепсидин и феропортин с показатели за съдово-мозъчни атеросклеротични промени при пациенти с хронично бъбречно заболяване	263
Договор Д-236/15.12.2017 Процеси на фибрилизация на белтъци от плазмения протеом при невродегенеративни заболявания	266
Договор Д-238/15.12.2017 Оценка на нивата на витамин Д, витамин В12 и хомоцистеин в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2	268
Договор Д-239/15.12.2017 Въздействие на ротационни инструменти и техники за запълване върху стената на кореновия канал при ендодонтско лечение	268
КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ’ 2016”	270
Договор 1-И/2016 Влиянието на половите хормони върху пародонталното здраве на деца през пубертета и изработване на клинични критерии за оценка на пародонта в детско юношеска възраст	270
КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ’ 2017”	271
Договор Д-230/15.12.2017 Повишаване капацитета на лаборатория „Анализ и синтез на биоактивни вещества“ към ЦММ на Катедра „Медицинска химия и биохимия“ в областта на омикс (метаболомикс, протеомикс, липидомикс) изследванията	271
Договор Д-231/15.12.2017 Изграждане на лаборатория за изследване на стойката и локомоцията към катедрата по кинезитерапия във ФОЗ при МУ-София (I-ви етап)	272
SCIENTIFIC PROJECTS 2016 – 2017 WITH FINANCIAL SUPPORT OF MEDICAL UNIVERSITY – SOFIA	274
MEDICO-BIOLOGICAL AREA “GRANT 2016”	275

Contract 1/2016 Optimisation and validation of molecular genetic approach for diagnostics of myotonia congenita type Becker in Bulgaria	275
Contract 2/2016 Effects of Leptin on Thermoregulation in Rats with model of Obesity: Role of GABA _B Receptor Mechanisms	275
Contract 3/2016 Seroprevalence of <i>Helicobacter pylori</i> infection among children and investigation of probiotics with potential for infection control	276
Contract 4/2016 Microbiological and molecular genetic investigations on the resistance mechanisms to carbapenems in problematic clinical isolates of <i>Acinetobacter baumannii</i> from four university hospitals in Bulgaria	277
Contract 5/2016 Postoperative pain in streptozocin-induced diabetes: pharmacological modulation	279
Contract 6/2016 Antiangiogenic effect and cytotoxic mechanisms of hydroxyanthraquinone aloemodim in human brain microvascular endothelial cells	280
Contract 7/2016 Screening of newly synthesized coumarin and chromene derivatives (phases II and III) with evaluation of ED50 and TD50 and application of 6Hz model of pharmaco-resistant epilepsy	281
Contract 8/2016 Researches on toxigenic genes in Bulgarian strains of Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC, STEC)	282
Contract 9/2016 Contemporary trends in conventional and molecular methods in the species identification of microorganisms causing vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and their chronic forms	283
Contract 10/2016 Applying high resolution of mass spectrometrical analysis to investigate the involvement of protein kinase CK2 into the hetero-oligomeric BMPRs complexes in normal human primary dental pulp cells	284
Contract 11/2016 Effect of WNT3A on expression of apoptotic and stem cell markers in human mesenchymal stem cells from apical papilla	284
Contract 12/2016 Interactions between serotonergic and GABA-ergic neurotransmitters systems in lower vertebrates retina	285
Contract 13/2016 Investigation of virulence factors among clinically- significant carbapenemase or/and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing <i>E.coli</i> and <i>K.pneumoniae</i> isolates, in five hospitals in Sofia, Varna and Pleven	286
Contract 14/2016 Study the role of angiotensin AT1 receptors in mechanisms regulating brain reactivity in kainate model of epilepsy in hypertensive and normotensive Wistar rats	287
Contract 15/2016 Role of the cannabinoid and the catecholaminergic systems on nociception and Behavioral responses after stress in rats	288
Contract 16/2016 Model of depression: Participation in behavioral reactions of angiotensin II microinjected to into the amygdala of rats	289

Contract 17/2016 Role of hormones leptin, adiponectin, and ghrelin in the mechanisms of insulin resistance in hypo- and hyperfunction of thyroid gland	290
Contract 18/2016 The role of kiotorphin in behavioral and histological changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease	291
Contract 19/2016 Role and distribution of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the epiligament of collateral ligaments of the knee joint in rat under normal and experimental conditions	292
Contract 20/2016 Participation of angiotensin AT1 receptors in the mechanism of behavioral changes in spontaneously hypertensive rats with with diabetes mellitus type 2	293
Contract 21/2016 Участие на аденозин A ₁ рецепторите и азотния оксид, синтезиран от невроналната форма на азотен оксид синтазата в регулацията на бързите колебания на бъбречния кръвоток у плъхове	294
Contract 23/2016 Effects of quercetin and dihydroquercetin on the apoptotic signaling cascade in normal human keratinocytes	295
Contract 24/2016 Analysis of somatic mutations in the main lung cancer histologic subtypes: SCC, AC, NET (CT, SCLC and LCNET) in group of Bulgarian patient by NGS of tumour-associated genes	295
Contract 25/2016 Investigation of quality of oogenesis in vivo and in vitro in oocytes from mice with experimentally induced systemic lupus	296
Contract 26/2016 Association analysis of polymorphic markers or/ in to the selected candidate - genes associated with susceptibility to arterial hypertension in Bulgarians	297
Contract 27/2016 Analysis of somatic mutations in Bulgarian patients with colorectal and gastric carcinomas by Next generation sequencing of a panel of tumor-associated genes	298
Contract 29/2016 Molecular markers with diagnostic and prognostic value for treatment of children's solid tumours	299
Contract 30/2016 Genetic profiling of laryngeal cancer by Next Gen Sequencing	300
Contract 31/2016 Glutamate transporter EAAT2 in brain of rats with a model of neonatal epilepsy and pups with fetal alcohol syndrome	301
Contract 32/2016 Comparative studies of the effects of risperidone and probiotic on molecular and behavioral parameters of male rats in experimental models of autism and fetal alcohol syndrome .	302
Contract 33/2016 Effect of Pentoxifylline on skin changes in hypothyroid rats	303
Contract 34/2016 Investigation of antidepressant effects of escitalopram and physical activity in experimental models of depression	303
Contract 35/2016 Validation of potentially pathogenic variants in genes associated with Parkinson Disease found with next generation sequencing	304
Contract 36/2016 Production of flavonoids in in vitro cultures of Astragalus vesicarius L. and their potential antioxidant activity	305

Contract Nr 38/2016 Incorporation of bromo-hydrazones in polymeric nanoparticles and in vitro evaluation of their antioxidant activity.....	306
Contract 40/2016 Multifactor analysis of extraction combined with liquid-chromatography mass spectrometric determination of biological active substances in <i>Portulaca oleracea</i> L. (purslan).....	307
Contract 41/2016 <i>Gypsophila glomerata</i> Pall ex M.B. (Caryophyllaceae): potential source of bioactive compounds	308
Contract 44/2016 <i>Geigeria alata</i> : a source of caffeoylquinic acids with a potential antioxidant, antihypertensive and antidiabetic effects	309
Contract 45/2016 Phytochemical and pharmacological investigation of the flavonoid content of <i>Astragalus spruneri</i>	310
Contract 46/2016 Antioxidant and cytoprotective activity of biologically active lanthanide complexes	310
Contract 47/2016 Evaluation of chemical stability and biological activity of antimicrobial peptides type alfa-defensin 2	312
Contract 48/2016 Investigation of nsaid's for in vitro anti-tumor / antiproliferative activity in experimental model systems.....	312
Contract 49/2016 Synthesis and characterization of new methoxy derivatives of salicylaldehyde benzoylhydrazone and their Ga (III) metal complexes with potential biological activity.....	313
Contract 50/2016 Study on possibilities for preparation of modified-release drug forms with theophylline via single- and multi-stage extrusion.....	315
Contract 51/2016 Platinum complexes with mixed ammine/amine ligands. Design, synthesis, spectral characterization, theoretical prediction and pharmacological study.....	315
Contract 52/2016 Physiological characterisation of newly synthesized derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid.....	317
Contract 53/2016 Flavonoids from the aerial parts of <i>Chenopodium bonus-henricus</i> L. –isolation, identification and pharmacological investigation for presence of radical-scavenging/antioxidant activity and neuroprotective effect in models of neurotoxicity <i>in vitro</i>	318
Contract 54/2016 Design and characterisation of thermally responsive nanosized drug delivery systems based on poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene oxide) copolymers.....	318
Contract 55/2016 Effect of Vascular endothelial growth factor (VEGF) on collagen production and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells <i>in vitro</i>	319
Contract 56/2016 Nanocoatings with application in dental medicine	320
Contract 58/2016 Determination of concentrations of certain markers of inflammation and destruction in saliva and gingival exudate for the diagnosis of periodontal diseases	321
Contract 63/2016 The role of pharmacogenetics factors in optimization of tacrolimus drug therapy in Bulgarian kidney transplant recipients	322

Contract 67/2016 Assessment of the correlation of <i>IL-17</i> rs2275913 polymorphism and serum IL-17 levels – factors for development of dermatomyositis in adult population	323
Contract 68/2016 Molecular-genetic diagnostics in Amyotrophic lateral sclerosis patients.....	323
Contract 81/2016 Epigenetic biomarkers in patients with esophageal tumors	324
Contract 90/2016 Expression analysis of miRNAs in Bulgarian in plasma of patients with non-small cell lung cancer and other obstructive lung disease	325
Contract 96/2016 Storing tissues for expanding of tissue, plasma and DNA bank of patients with breast cancer.....	326
Contract 97/2016 Enlargement the biobank of patients with ovarian cancer and optimizing the terms for storage of biological material.....	327
MEDICO-BIOLOGICAL AREA “GRANT 2017”	329
Contract D-55/02.05.2017 Effects of 5HT ₂ antagonists on hyperthermia in a serotonin syndrome model	329
Contract D-56/02.05.2017 Survey of toxicity and macrolide resistance in clinical significant pyogen cocci <i>Streptococcus pyogenes</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	329
Contract D-57/02.05.2017 Microbiological and molecular genetic investigations on the resistance mechanisms to glycopeptide antibiotics in clinical isolates of <i>Enterococcus</i> spp.	330
Contract D-58/02.05.2017 Molecular-genetic diagnostics in patients with indefinite type neuromuscular disorders by next generation sequencing	331
Contract D-59/2.05.2017 Investigation of main mechanisms of resistance to beta-lactams and quinolones among cephalosporin resistant or/and carbapenem- clinically significant isolates <i>Enterobacter</i> spp in University hospital “Saint Marina” Varna.....	332
Contract D-61/02.05.2017 Genetic studies for congenital cardiac anomalies, DiGeorge syndrome and Hypoplastic left heart syndrome established by ultrasound examination.....	333
Contract D-62/02.05.2017 Next generation sequencing of patients with hereditary neurosensory hearing loss to clarify the genetic cause of hearing impairment.....	334
Contract D-63/02.05.2017 Expression profiling of angiogenic factors in spontaneous abortions.....	335
Contract D-64/02.05.2017 Cloning of genes responsible for toxigenicity of shiga toxin producing <i>Escherichia coli</i> isolates and study of their interaction with the cellular receptor CD77	336
Contract no D-65/02.05.2017 Study on the treatment effect of agomelatine in epileptic status induced with kainic acid upon the mechanisms regulating cerebral reactivity in temporal lobe epilepsy model	336
Contract D-66/02.05. 2017 Image-Based high content screening analysis of the involvement of protein kinase CK2 in TGFβ ₂ -induced epithelial–mesenchymal transition of LENS, isolated from Bulgarian cataractous patients	338

Contract D-67/02.05.2017 Role of the cannabinoid and the serotonergic neurotransmitter systems on cold stress-induced nociception triggered in rats.....	339
Contract Д-68/02.05.2017 Modulation of the memory processes after infusion of angiotensin II and losartan into the amygdala of rats with a depression model	340
Contract D-69/02.05.2017 Post-vaccine effect of 10-valent pneumococcal conjugated vaccine (PHiD-PCV10) on the etiology of acute otitis media (AOM) and nasopharyngeal carriage of otopathogenic bacteria among children with AOM during 2015-2017.....	341
Contract D-70/02.05.2017 Effect of the rs266729 polymorphism on transcription regulation of the adiponectin gene (<i>ADIPOQ</i>) during normal and gestational diabetes pregnancy.....	342
Contract D-71/02.05.2017 Effects of mesembrine alkaloids mediated by serotonin and cAMP on the behavior of rats with experimental diabetes mellitus type 1.....	343
Contract D-72/02.05.2017 Pharmacological study of effects of pioglitazone in an experimental model of autism	344
Contract D-73/2017 Comparative investigation of antidepressant and immunomodulating effects of escitalopram in enriched and isolated housing conditions	345
Contract D-74/02.05.2017 Comparative evaluation of the effects of 2H-chromen and coumarine substituted hydrazide-hydrazones on the levels of the expression of inflammatory cytokines in maximal electroshock (MES) test for antiseizure activity and in formalin test for nociception in mice	346
Contract D-75/02.05.2017 The role of certain polymorphic variants in genes, associated with blood pressure values, with reference to the risk of development of coronary heart disease	347
Contract D-77/02.05.2017 Evaluation of copy number variations in Bulgarian patients with Parkinson disease	348
Contract D-78/02.05.2017 <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> studies on novel galantamine derivative with potent anti-acetylcholinesterase activity	349
Contract D -79/02.05.2017 Eliciting the production of arylitralin lignans in cell systems <i>in vitro</i> ...	349
Contract D-80/02.05.2017 Possibilities for production of flavonoids from <i>in vitro</i> cultures of <i>Astragalus monspessulanus</i> L. and determination of their biological activity	350
Contract D-81/02.05.2017 Investigations of closely related and rare for Bulgarian flora species from genus <i>Astragalus</i> L.	351
Contract D-83/02.05.2017 Analytical characterization of some Omega unsaturated fatty acids in food supplements by application of gas chromatographic method	351
Contract D-84/02.05.2017 LC-HRMS analytical profile of biologically active secondary metabolites in leaves extract of <i>Solanum schimperianum</i> Hochst.....	352
Contract D-85/02.05.2017 Synthesis, spectral characterization and pharmacological activity of new methoxy-derived aroylhydrazones	353

Contract 86/02.05.2017	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> effects of alcesefolizide (quercetine-3-O- α -L-rhamnopyranozile-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranozile-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranozide) on different models of intoxication	354
Contract D-87/02.05.2017	Analysis of sesquiterpene lactones in <i>Arnica</i> of different origins by gas chromatography-high resolution mass spectrometry	355
Contract 88/02.05.2017	Study on the neuroprotective effect of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid, isolated from <i>Geigeria alata</i> (Asteraceae) against ethanol-induced oxidative stress in rats	356
Contract D-89/02.05.2017	Toxicological characterization of extract from <i>Clinopodium vulgare</i> (Lamiaceae)	357
Contract D-90/02.05.2017	Synthesis of 1-substituted methylxanthine derivatives, molecular docking, and evaluation of possible acetylcholinesterase activity	357
Contract 91/02.05.2017	Synthesis, characterization, chemical properties and evaluation of the possible neuroprotective effects and human recombinant MAOB inhibition of new hydrazidehydrazones of caffeine-8-thioglycolic acid.....	359
Contract D-92/02.05.2017	Antioxidant protection of quercetin, encapsulated in polysaccharide nanoparticles in vitro models of oxidative stress	359
Contract D-93/02.05.2017	Synthesis of N-pyrrolyl hydrazide-hydrazones and evaluation of their possible MAO-B inhibitory effect.....	360
Contract D-94/02.05.2017	Development of mesoporous silica nanoparticles as a drug system for pramipexole	361
Contract D-95/02.05.2017	Experimental investigation of anti-tumor/antiproliferative activity of almiral solution for injection	362
Contract D-97/02.05.2017	Relationship between periodontal diseases and rheumatoid arthritis. Clinical, immunological and microbiological studies	363
Contract D-115/02.05.2017	Investigation of rs1799782 and 25487 polymorphisms in <i>XRCC1</i> gene as factors for the development of dermatomyositis in adults.....	364
MEDICO-CLINICAL AREA "GRANT 2016"		365
Contract 9/2016	Contemporary trends in conventional and molecular methods in the species identification of microorganisms causing vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and their chronic forms	365
Contract 22/2016	Clinical significance of serum hepcidin in inflammatory and tumor bowel diseases	365
Contract 28/2016	Clinical and demographic characteristics and their relationship to some biomarkers of systemic inflammation in patients with asthma-COPD overlapping syndrome.....	367
Contract 37/2016	Associations between hypersensitivity to food allergens and polymorphism in the HLA-DRB1 locus.....	368

Contract 57/2016 Role of Immunogenetic Biomarkers in Patients with Oral Preneoplastic Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma.....	369
Contract 60/2016 Evaluation of reference intervals of ceruloplasmin oxidative activity in Bulgarians. Copper status – new laboratory aspects in patients with Wilsons’s disease	370
Contract 61 /2016 Vitamin D levels in obstructive sleep apnea syndrome.....	371
Contract 62/2016 Investigation of the diagnostic and prognostic significance of some new biomarkers (CCA-CA and M2-PK in blood serum and IGF-1 in bile) in patients with obstructive jaundice.....	372
Contract Nr 64/2016 Study of serum antibodies against Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis and comparison of the results of standard microbiological examination of secretions from respiratory tract	373
Contract 65/2016 Investigation of lung function in children with scoliosis	374
Contract 66/2016 Clinico-morphological cross-section and analysis of soft-tissue tumors with retroperitoneal localization; Study and evaluation of the diagnostic, clinical and prognostic value of the immunohistochemical expression of P53 and MDM2	375
Contract 69/2016 Polycystic ovarian syndrome and cardiovascular risk	376
Contract 70/2016 Neurological, vascular and biochemical factors in evolution of diabetic foot	377
Contract 71/2016 Exploration of the importance of immunological and immunogenic factors for the development of bkV replication after transplantation	377
Contract 72/2015 Association between stress as a neuroendocrine factor and disease course in patients with chronic urticaria.....	378
Contract 73/2016 Assesment on NT-ProBNP in chronic failure patients	379
Contract 74 /2016 Inflammation and thyroid autoimmunity in patients with fibromialgia	380
Contract 75/2016 Evaluating the diagnostic and prognostic value of plasma miRNAs in patients with systemic lupus erythematosus.....	381
Contract 76/2016 Expression analysis of plasma miRNAs in patients with rheumatoid arthritis and evaluation of their diagnostic and prognostic value	382
Contract 77/2016 Evaluation of the efficacy of autologous platelet-rich plasma in patients with Knee Osteoarthritis	382
Contract 78/2016 Sleep disorder in patients with acute heart failure	383
Contract 79/2016 Evaluation and follow-up of cardiovascular risk and the role of apolipoprotein C3 in patients with chronic pancreatitis, primary and secondary pancreatic exocrine insufficiency	384
Contract 82/2016 Study of vitamin D [25 (OH) D] levels in school-aged children during winter-spring and summer-autumn season	385
Contract 83/2016 Nonclassical forms of 21-Hydroxylase Deficiency: clinical and molecular- genetic diagnosis	385

Contract 84/2016 Genetic polymorphisms associated with PCOS neuroendocrine dysfunction	386
Contract 85/2016 Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/ non-alcoholic steatohepatitis in patients with glucose intolerance.....	387
Contract 86/2016 Indexes for glycemic control among pregnant women with gestational diabetes and diabetes.....	388
Contract 87/2016 Relationship between cardio-vascular autonomic dysfunction and sensory polyneuropathy, advanced glycation end-products and some cardio-metabolic risk factors in prediabetes (impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance).....	389
Contract 88/2016 Frequency and progression of autoimmune thyroid diseases in female patients with prolactinomas: a comparative prospective study.....	389
Contract 91/2017 Patogenic role of the T-regulatory lymphocytes (Treg) in HIV+HCV+ coinfectd patients	390
Contract 92/2016 Role of some genes associated with ovarian function for premature ovarian ageing in women	391
Contract 93/2016 New accents in the diagnostic algorithm, spectrum and frequency of virological agents (parvovirus B19, adenoviruses and Chlamydia trachomatis) involved in the development of pathological pregnancy.....	392
Contract 94/2016 Postdural puncture headache after spinal anesthesia for Cesarean section - randomized study comparing spinal needles with Quincke, Sprotte and Atraucan design of the needle tip	394
Contract 95/2016 Creation or risk model for late preeclampsia by biophysical and biochemical markers in 30- 33 gestational weeks	394
MEDICO-CLINICAL AREA "GRANT' 2017"	396
Contract D-54/02.05.2017 Study of hepcidin's role in the pathogenesis of atherosclerosis	396
Contract D-60/02.05.2017 Contemporary molecular diagnostic techniques for detection of herpes virus (HSV-1, HSV-2, and VZV) infections in suspected patients or patients with an unclear clinical picture	397
Contract D-96/02.05.2017 Evaluation of upper incisors coverage of the upper lip at rest and during smile	398
Contract D-98/02.05.2017 Investigation of HLA genes, HLA molecules and other factors in patients with oral squamous cell carcinoma	399
Contract D-99/02.05.2017 Effectiveness of periodontal plastic microsurgery for the treatment of root dentine sensitivity	400
Contract D-100/02.05.2017 Effectiveness of photodynamic therapy compared to chlorhexidine chip (Periochip®) in the treatment of periodontal pocket	401

Contract D-101/2017 Presence of il-8 gene polymorphism and il-8 serum levels in patients with chronic periodontitis.....	402
Contract D-102/02.05.2017 Comparative in vitro assessment of degree removal smear layer and decontamination and the ability of creation of endodontic monoblock with two different irrigating protocols	403
Contract D-103/02.05.2017 Digital protocol for the analysis and treatment of functional and aesthetic problems in patients with cleft, lip and/or palate	403
Contract D-109/02.05.2017 Intraoperative radiotherapy assessment (IORT) in the treatment of breast carcinoma.....	404
Contract D-110/02.05.2017 Research and evaluation of the diagnostic and prognostic role of acute phase proteins IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-9 and procalcitonin as predictors of early insufficiency of anastomosis after anterior resection of the rectum	405
Contract D-111/02.05.2017 Investigating diagnostic and prognostic value of fibronectin in patients with solid tumors	406
Contract D-112/02.05. 2017 Bio image examinations of cell physiology of primary human cell cultures, isolated from <i>in vivo</i> intraoperative treated with trypan blue anterior lens capsules of patients with age-related cataract and congenital cataract	407
Contract D-113/05.02.2017 A predictive model for evaluation of pre-transplantation cross-match and antibody mediated reactivity in kidney transplantation	407
Contract D-114/02.05.2017 Micro- and macrovascular changes in nonalcoholic fatty liver disease with or without carbohydrate disturbances	409
Contract D-116/02.05.2017 Surgical reconstruction of the ocular surface in patients with limbal stem cell deficiency by transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells	409
Contract D-117/02.05.2017 Investigation of the effect of cell cultures, isolated from Glioblastoma multiforme on Tregs, Th17, and monocytes in the composition of peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy donors	410
Contract D-118/02.05.2017 Serum biomarkers for disease activity and prognosis in patients with systemic sclerosis with pulmonary involvement	411
Contract D-119/02.05.2017 Early diagnosis, screening, and follow-up of patients with chronic diarrhea and microscopic colitis by measuring fecal markers.....	412
Contract D-120/02.05.2017 Screening and diagnosis of autoimmune pancreatitis and concomitant pancreatic exocrine function	412
Contract D-121/02.05.2017 Investigation of the percentage of Th17 cells and their related cytokines during treatment with beta interferons and fingolimod in patients with multiple sclerosis in order to evaluate the therapeutic response.....	413
Contract D-122/02.05.2017 Serum leptin level in boys with pubertal gynecomastia.....	414

Contract D-123/02.05.2017	Analysis of genetic polymorphisms related to the therapeutic response to methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis patients	415
Contract D-124/02.05.2017	Parvovirus B19 infection associated with anemic syndrome in risk pregnancy	416
Contract D-125/02.05.2017	Role of some stress hormones for the onset of metabolic disturbances in patients with obesity	417
Contract D-126/02.05.2017	Association of some interleukins with the clinical activity of thyroid-associated ophthalmopathy and their potential role for the therapeutic approach	418
Contract D-127/02.05.2017	Vitamin D in the spectrum of prediabetes and cardio-vascular autonomic dysfunction	419
Contract D-128/02.05.2017	Diagnostic algorithm and some markers for cardiovascular risk in primary aldosteronism	420
Contract D-129/02.05.2017	Inflammatory biomarkers in patients with asthma-COPD overlap syndrome	420
Contract D-130/02.05.2017	Characteristics of HBV genotype and drug resistance in HIV/HBV co-infected patients	421
MEDICO-SOCIAL AREA "GRANT' 2016"		423
Contract 39/2016	Study of the impact of included and excluded medicinal products from Positive drug list on access and public expenditures	423
Contract 42/2016	Study of quality of life, ambulatory therapy of patients with rare diseases in Bulgaria as well as their access to treatment and to pharmaceutical care	424
Contract 43/2016	Study of safety and efficacy of medicinal products for rare diseases – systemic review and metaanalysis.....	425
Contract 59/2016	Creation of a standard model for manipulatory technique in practical training in nursing and obstetric care	426
MEDICO-SOCIAL AREA "GRANT' 2017"		427
Contract D-76/02.05.2017	Occupational accidents and shift work. Stress biomarkers in saliva	427
Contract D-82/02.05.2017	Evaluation of safety of hernia meshes by investigation of their mechanical compatibility with tissues and quality of life of patients	428
Contract D-104/02.05.2017	Investigation of the subjective perception of the quality of working life among healthcare workers	429
Contract D-105/02.05.2017	Creation of a simulation laboratory for intravenous therapy	430
Contract D-106/02.05.2017	Implementing of education in bioethics at contemporary schools – factor for healthy lifestyle of the growing up generation	431

Contract Д-107/02.05.2017 Conceptual model for assessing safety as quality element of medical services.....	432
Contract D-108/02.05.2017 Content of flavonoids and total phenols in Bulgarian foods and structuring the information in data registry.....	434
COMPETITION „YOUNG SCIENTIST” 2016-2017	436
MEDICO-BIOLOGICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2016”	436
Contract 1-D/2016 Molecular characteristics of <i>von Hippel-Lindau</i> syndrome in Bulgarian patients .	436
Contract 2-D/2016 Algorithm for detection of macrolide resistance mechanisms in Bulgarian clinical isolates of <i>Streptococcus pyogenes</i>	437
Contract 5-D/2016 Quantitative real time PCR analysis of chromosomal microaberrations, detected by microarray technology in patients with complex epileptic syndromes.....	437
Contract 8-D/2016 Next generation sequencing by synthesis in selected group of patients with different types of Congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT)	438
Contract 11-D/2016 Expression analysis of Toll- like receptor 2(TLR2), Toll-like receptor 4(TLR4) and Toll-like receptor 7(TLR7) in patients with chronic otitis media and chronic rhinosinuitis.....	439
Contract 12-D/2016 Expression analysis of an expanded panel of selected hypoxic micro RNAs in patients diagnosed with larynx cancer in tissue and plasma samples	439
Contract 13-D/2016 Neuroprotective and antioxidant activity of newly synthesized C-8 caffeine derivatives with arylpiperazine fragment on different toxicity models <i>in vitro</i>	440
Contract 14-D/2016 Prenylated acylphloroglucinols from <i>Hypericum olympicum</i> L. - isolation, structural characterization and pharmacological testing for antineoplastic activity	441
Contract 15-D/2016 Investigation of non-steroidal anti-inflammatory drugs for antiviral activity.....	441
Contract 16-D/2016 Investigation of <i>in vitro</i> inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity by hybrid compounds composed of Galantamine and 4-aminopyridine	442
MEDICO-BIOLOGICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2017”	443
Contract D-131/02.05.2017 Molecular-genetics analysis of TSC2 gene in Bulgarian patients with Tuberous sclerosis.....	443
Contract D-133/02.05.2017 Evaluation of the impact of 4-methoxy derivatives of salicylaldehydebenzoylhydrazone (SBH) on free radical processes in ROS generation <i>in vitro</i> model systems. Raman analysis of the structure-antioxidant properties relationship.....	443
Contract D-134/02.05.2017 Relationship between arterial stiffness and circulating cardiovascular risk markers in individuals of two age groups	444
Contract D-135/02.05.2017 Determination of leptin-induced expression of the phosphorylated signal transducer and transcription activator 3 (pSTAT3) in the preoptic area of the anterior hypothalamus of rats with normal body weight and model of obesity	445

Contract D-137/02.05.2017 Study of role of hypoxic miRNAs in laryngeal cancer	446
Contract D-138/02.05.2017 Analysis of miRNA expression in non-small cell lung.....	447
Contract D-139/02.05.2017 Epidemiological typing of <i>Streptococcus pyogenes</i> , isolated from patients with different infections	447
Contract D-143/02.05.2017 Association between HPV infection, mitochondrial status, DNA fragmentation, and idiopathic male infertility.....	448
Contract D-145/02.05.2017 Association of sexually transmitted infections, HPV infection and abnormal cervical cytology	449
Contract D-146/02.05.2017 Investigation of ketoprofen, analgin and meloxicam for antiviral activity	450
Contract D-147/02.05.2017 Evaluation of the effects of newly synthesized caffeine-8-thioglycolic acid derivatives on neuroblastoma cell line SH-SY5Y and activity of human recombinant enzyme MAOB	450
MEDICO-CLINICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2016”	451
Contract 3–D/2016 Correlation between central aortic pressure and left atrial changes in patients with arterial hypertension	451
Contract Nr 4-D/2016 Circulating CD4 (+) CD28 (-) T lymphocytes in patients with autoimmune thyroiditis and their link to clinical and laboratory features of the disease.....	452
Contract 6-D/2016 Mutatons in the gene coding hTPO in selected bulgarien patients with primary congenital hypothyroidism	452
Contract 7-D/2016 Methods of preoperative assessment of ocular surface changes and their significance for the postoperative result	453
Contract 9-D/2016 Investigation of inflammatory markers in serum in patients with stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease	454
Contract 10-D/2016 The use of PEEP during prolonged gynecological operations.....	454
MEDICO-CLINICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2017”	455
Contract D-132/02.05.2017 Evaluation of prognostic value of somatic mutations in patients with gastric cancer	455
Contract D–136/02.05. 2017 Diagnostic evaluation of bile acid malabsorption by serum and fecal biomarkers in patients with microscopic colitis	456
Contract D-140/02.05.2017 Investigation of the T-helper subsets Th17 and Tregs’ phenotype and cytokine secretion in patients with systemic sclerosis	457
Contract D-141/02.05. 2017 Comparison of the diagnostic value of IGRA - test (T-SPOT.TB) in venous blood and bronchoalveolar lavage	458
Contract D-142/02.05.2017 Laboratory, genetic, ultrasound criteria for evaluating the degree of liver steatosis and fibrosis in pediatric patients with chronic liver diseases	459

Contract D-144/02.05.2017 Expression of androgen receptor in association with other prognostic and predictive factors in bulgarian patients with breast cancer	459
Contract D-148/02.05.2017 Implementation of pulse oximetry in dentistry for diagnostics of the dental pulp	460
COMPETITION „STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT” ..462	
STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2016	462
Contract 1-S/2016 Introdacement of a biochemical and molecular-genetic approach for diagnostics of biotinidase deficiency in Bulgaria	462
Contract 2-S/2016 Identification and monitoring of <i>EGFR</i> , <i>K/N-RAS</i> and <i>BRAF</i> mutations in circulation tumor cell-free DNA during treatment of non-small cell lung cancer and colorectal patients	463
Contract 3-C/2016 Molecular - Genetic Analysis of Virulence, Resistance and Epidemiology of Bulgarian Clinically Significant Isolates <i>Streptococcus pyogenes</i>	464
Contract 4-S/2016 Serum hepcidin and its correlation to oxidative stress arameters in neurodegenerative diseases	465
Contract 5-S/2016 The role of some protective mechanisms in saliva in the development of denture stomatitis in patients with complete dentures, lined with silicone based elastic materials.....	467
Contract 6-S/2016 Role of high-risk Human Papilloma Viruses in the development of prostate cancer and/or precancerous conditions.....	468
Contract 7-S/2016 Investigation of transduction mechanisms regulating the proliferation of the stem epidermal keratinocytes	469
Contract 8-S/2016 New appoach for investigating the localization of drug-induced neurodegenerative processes in rat brain by means of differential scanning calorimetry.....	470
Contract 9-S/2016 Complex assessment of the characteristics of the glucose profile and cardiovascular risk in prediabetes.....	471
Contract 10-S/2016 Design and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel inhibitors of acetylcholiesterase – fourth stage.....	472
Contract 11-S/2016 A liquid chromatography–high resolution mass spectrometry – based approach combined with bioinformatic analysis to integrate chemistry with geographical origin: application in the study of <i>Portulaca oleracea</i> L. (purslane).....	472
Contract 12-S/2016 Influence of sex hormones on subgingival microflora and periodontal health in children during puberty	473
Contract 13-S/2016 Pilot study of the cytokine profile in patients treated with dental implants	474
STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2017	476
Contract D-232/15.12.2017 Fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase or/and carbapenemase producing <i>Enterobacteriaceae</i> among hospitalized, ambulatory patients and healthy people - children and adults	476

Contract D-233/15.12.2017 New biochemical, genetic and clinical markers to optimize the diagnosis and monitoring of nonalcoholic fatty liver disease in obese and pre-diabetic patients.....	477
Contract D-234/15.12.2017 Acute pancreatitis – assessment of disease’s severity and the role of enteral nutrition in the therapeutic process	478
Contract D-235/15.12.2017 Evaluation of connection between hepcidin and ferroportin with brain-vascular atherosclerotic changes parameters in chronic kidney diseases patients	479
Contract D-236/15.12.2017 Protein fibrillization processes in plasma proteome in neurodegenerative diseases.....	482
Contract D-238/15.12.2017 Assessment of vitamin D, vitamin B12 and homocysteine levels in Bulgarian patients with type 2 diabetes	483
Contract D-239/15.12.2017 The influence of different rotary NiTi instruments and various filling techniques on the incidence of dentinal defects during endodontic treatment	484
COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2016"	486
Contract 1-I/2016 Influence of sex hormones on periodontal health of children during puberty and development of clinical criteria for periodontal assessment in childhood and adolescence	486
COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2017"	487
Contract D-230/15.12.2017 Enhance the capacity of the laboratory Analysis and synthesis of bioactive compounds of the Medical chemistry and biochemistry department in the field of omix (metabolomics, proteomics, lipidomics) research.....	487
Contract D-231/15.12.2017 Building of a laboratory for the posture and locomotion study at the Physiotherapy department in FPH in MU-Sofia (stage I).....	488

МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „ГРАНТ’ 2016”

Договор 1/2016 Въвеждане на молекулярно-генетичен подход за диагностика на миотония конгенита тип Бекер в България

Изследователски екип: Доц. Албена Първанова Тодорова-Георгиева, дбн

- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Гл. ас. Биляна Георгиева, дб
- Андрей Киров, дб

Базова организация: Катедра по Медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия проект беше да се въведе молекулярно-генетичен подход за диагностика на миотония конгенита тип Бекер у нас и да се изяснят молекулните характеристики на това заболяване при български пациенти. Прилагане на въведения молекулярно-генетичен подход за идентификация на патологични замени в *CLCN1* гена доведе до изясняване на значителен дял ($7/9 = 78\%$) от пациентите в тази група. Тези данни предполагат и много прецизно подбрана пациентска група. Установен беше и вероятно най-честият дефект за българската популация в *CLCN1* гена - splice-site замяната с.1471+1G>A, която в хода на настоящата разработка беше открита при три от изследваните семейства с диагноза миотония конгенита тип Бекер. Българската популация се характеризира с множество ендемични генетични характеристики, за което свидетелства откритата непубликувана в световен мащаб мутация дори в добре проучен ген като *CLCN1* - с.1571A>G, р.Тур524Сус. Оформят се два потенциални ендемични региона за миотония конгенита тип Бекер в България съответно за замяната с.1571A>G, р.Тур524Сус в региона на Мездра и за с.817G>A, р.Val273Met мутацията в региона на Гоце Делчев.

Научни публикации и прояви:

- Tincheva S, Georgieva B, Todorov T, et al. Myotonia congenita type Becker in Bulgaria: First genetically proven cases and mutation screening of two presumable endemic regions. *Neuromuscular Disorders* 2016;26 (10): 675-80.

Научният отчет е приет с ОТЛИЧНА оценка по скалата на СМН.

Договор 2/2016 Ефекти на Лептин върху терморегулацията у плъхове с модел на затлъстяване: роля на GABA_B-рецепторни механизми

Изследователски екип: Проф. Красимира Симеонова Якимова, дм, дмн

- Ас. Милен Христов
- Доц. Румен Николов, дм
- Соня Иванова
- Елизабета ди Блази, студент

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследвахме промяната в телесната температура на мъжки плъхове от порода Wistar с диета- индуцирано затлъстяване след системно (интраперитонеално) приложение на leptin, baclofen и CGP35348, прилагани самостоятелно или в различни комбинации. Нашите резултати показват, че системното прилагане на лептин предизвика статистически значима хипертермия у плъхове с модел на затлъстяване, както и GABA_B-антагониста CGP35348, докато GABA_B-агонистът baclofen предизвика понижаване на телесната температура. Не бе наблюдаван синергизъм в хипертермичния ефект при комбинирането на leptin и GABA_B-антагонист. Ефектът на комбинацията беше по-малък от ефектите на веществата, прилагани самостоятелно. При комбинираното прилагане на baclofen и leptin се установи понижаване на телесната температура, като ефектът беше по-слабо изразен в сравнение със самостоятелно приложения baclofen. Ефектите на baclofen и CGP35348 върху телесната температура бяха по-слабо изразени в плъховете с модел на затлъстяване в сравнение с плъхове с нормална телесна маса. В *in vitro* изследванията върху неврони от преоптичния преден дял на хипоталамуса (PO/AH), leptin незначимо повиши невроналната активност на невроните от PO/AH на плъхове с модел на затлъстяване, което показва наличието на лептинова резистентност. В заключение, въпреки незначимото повлияване на невроналната активност на невроните от PO/AH, leptin доведе до повишаване на телесната температура след системното му прилагане в плъхове с модел на затлъстяване. Нямаше синергизъм между leptin и GABA_B-антагонист или GABA_B-агонист, при едновременно прилагане. Ефектите на leptin, baclofen и CGP35348 бяха по-слабо изразени в плъховете с модел на затлъстяване, в сравнение с плъхове с нормална телесна маса.

Научни публикации и прояви:

- Hristov M, Yakimova K. Effects of leptin on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in rats with normal weight and experimental model of obesity. *C R Acad Bulg Sci.* 2017;70(8):1163-70
- Hristov M, DiBlazi E, Nikolov R, et al. Leptin and GABA interactions on body temperature of rats with experimental model of obesity. *Pharmacia* 2017
- Yakimova K, Hristov M. Effects of leptin on thermoregulation: *in vivo* and *in vitro* investigations on normal and obese rats.- 6th Int Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation, Ljubljana, Slovenia, 5-9 Dec 2016, A86.
- Hristov M, Yakimova K. Effects of leptin on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in normal and obese rats.- 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016, A190.
- DiBlazi E, Hristov M, Nikolov R, et al. Thermoregulatory interactions between leptin and modulators of GABA_B receptor function in rats with normal weight and experimental model of obesity. – XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 11-14 May 2017, A41.
- Yakimova K, Hristov M. Leptin-induced change on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in normal and obese rats. - Int Workshop “Metabolic diseases: genetics, epigenetics and proteomics”, Sofia, Bulgaria, 16-20 May 2017, A26.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 3/2016 Серопревалиране на *Helicobacter pylori* инфекцията при деца и проучване на пробиотици с потенциал за контрол на инфекцията

Изследователски екип: Проф. Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн

- Д-р Галина Гергова
- Д-р Даниел Йорданов
- Доц. Румяна Марковска-Давидкова, дм

Базова организация: Катедра медицинска микробиология, бул. Г. Софийски, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Беше определена анти-*Helicobacter pylori* активността на седем щамове *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (GLB) с 4 типа безклетъчни супернатанти (CFS): ненеутрализирани незагряти (CFS1), ненеутрализирани загряти (CFS2), рН-неутрализирани, каталаза-третиранни, незагряти (CFS3), или неутрализирани каталаза-третиранни и загряти (CFS4) срещу 18 щамове *H. pylori* в 301 комбинации. Всички щамове GLB произвеждаха бактериоциноподобни вещества (BLIS). Неутрализираните CFS инхибираха >2/3 от изследваните щамове. CFS3 и CFS4 на два GLB щамове потискаха >81% от всички изолати, а тези на четири GLB щамове бяха активни срещу >71% от антибиотично резистентните изолати. Неутрализирането намали CFS активността, докато загряването не повлия ефектите. Всички щамове GLB произвеждаха термостабилни BLIS с различия според щамове GLB и щамове *H. pylori*. Изявената анти-*H. pylori* активност на BLIS е силно предимство при избора на пробиотици за контрол на инфекцията. С ¹³C уреен дихателен тест (UBT), честотата на *H. pylori* сред 134 симптоматични деца беше 41,8% и по-честа (52,7%) при нелекувани деца с гастрит или дуоденална язва, спрямо останалите (18,5%). Над 1/3 от лекуваните пациенти бяха положителни. Четири от пет деца вземали прополис и/или лактобацили преди изследването бяха отрицателни. *H. pylori* инфекцията беше честа при симптоматичните деца и се придобива в ранна възраст. Необходимостта да не се употребяват прополис и пробиотици преди UBT следва да бъде проучена. Ерадикацията беше субоптимална и е необходима оптимизация и терапия според щамовата чувствителност. Беше проучена честотата на *H. pylori* IgG и CagA IgG при безсимптомни деца чрез ELISA. Честотата на *H. pylori* IgG беше 24,2%, а CagA IgG бяха открити в 40% от *H. pylori* IgG-положителните деца. И двете честоти бяха значимо по-ниски, отколкото в скорошно наше проучване сред безсимптомни възрастни. Серопревалирането на *H. pylori* беше най-ниско (13,5%) при децата на възраст 1-3 г. Честотата на инфекцията и вирулентността на щамовете у нас показват стабилно намаление.

Научни публикации и прояви:

- Boyanova L, Koumanova R, Hadzhiyski P, et al. *Helicobacter pylori* infection in Bulgarian pediatric patients. C.R.Acad. Bulg. Sci. 2018;71(7):971-7.
- Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* IgG and CagA IgG in Bulgarian children. C. R. Acad. Bulg. Sci. 2018;71(8):1124-9.
- Йорданов Д, Боянова Л, Марковска Р, Хаджийски П, Гергова Г, Митов И. Серопревалиране на *Helicobacter pylori* IgG и CagA IgG при децата в България. XV национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, Парк хотел Москва, 17-19 Май 2017: стр. 74-75
- Боянова Л, Гергова Г, Марковска Р, Йорданов Д, Митов И (доклад). Активност на бактериоцини на седем щамове *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* срещу

Helicobacter pylori шамове чувствителни и резистентни към антибиотици. XV национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, Парк хотел Москва, 17-19 Май 2017:19

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 4/2016 Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към карбапенеми на проблемни клинични изолати *Acinetobacter baumannii* от четири университетски болници в България

Изследователски екип: Доц. Таня Василева Стратева, дм

- Чл.-кор. проф. Иван Митов, дмн
- Проф. Енчо Савов, дмн
- Доц. Теменуга Стоева, дм
- Доц. Светослав Димов
- Гл. ас. Иво Сираков, дмн
- Ас. Юлия Мартева-Проевска

Базова организация: Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Двеста двадесет и шест карбапенем-нечувствителни нозокомиални изолати *Acinetobacter baumannii* (АВ) с множествена лекарствена резистентност (MDR), идентифицирани чрез *gyrB* полимеразно-верижна реакция (PCR), бяха събрани през периода 2014-2016 г. от четири университетски болници в България. Целите на изследването бяха: определяне на чувствителността към антимикуробни лекарствени средства (АМЛС) (според критериите на EUCAST-2016); извършване на молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към карбапенеми; епидемиологично типизиране на изолатите, както и изготвяне на подходящи препоръки за лечение. Антибиотичната резистентност беше следната: към imipenem – 90.7%, meropenem 98.3%, doripenem 100%, amikacin 92.8%, gentamicin 87.2%, tobramycin 55.6%, levofloxacin 98.2%, trimethoprim-sulfamethoxazole 86.2%, tigecycline (TGC) 22.1%, colistin (COL) 0% и ampicillin-sulbactam (SAM) 41.6% (интерпретирана според CLSI-2016). Общо 28 от тестваните шамове (12.4%) бяха с разширена устойчивост към АМЛС (XDRAB), чувствителни единствено към COL. Гени за вродените хромозомни ензими от група OXA-51-like бяха открити във всички изолати. Преобладаваща част от карбапенем-резистентните шамове притежаваха *bla*_{OXA-23-like} гени с разположена пред тях инсерционна последователност (IS) IS*Aba1* (26.1%) или *bla*_{OXA-24-like} (46.7%), 45 от тях (19.9%) – и двата гена, а един *A. baumannii* съдържаше *bla*_{OXA-58-like}. В хода на проучването, за първи път на Балканите беше идентифициран карбапенем-резистентен щам *Acinetobacter nosocomialis*, продуциращ единствено OXA-58 карбапенемаза. Генетичното обкръжение на кодиращия *bla*_{OXA-58} беше дефинирано като IS*Aba3*-like и IS*Aba3*, разположени съответно пред и след структурния ген. Епидемиологичното типизиране на нозокомиалните изолати *A. baumannii*, проведено чрез RAPD-PCR и UPGMA-анализ, установи персистирание на клонално свързани шамове (с коефициент на сходство над 70%), образуващи 6, 4, 3 и 2 различни клъстера, съотв. във Военномедицинска Академия, УМБАЛ “Св. Марина”, УМБАЛ “Александровска” и УМБАЛ “Св. Иван Рилски”. Карбапенемите се считат за ефективни АМЛС за лечение на инфекциите, причинени от АВ. Резистентността към тях, както и MDR, налагат употребата на други класове антибиотици и комбинирана терапия.

Обикновено изборът на антимикробно лечение за MDRAB и XDRAB е силно ограничен. Съществуват малко ефективни възможности, включващи COL, TGC и SAM. В заключение, постоянното разпространение на ендемични клонове, включващи OXA карбапенемаза-продуциращи MDRAB в мониторираните болници за 3-годишен период е значим проблем, който налага интензивни проучвания в бъдеще.

Научни публикации и прояви:

- Стратева Т. Карбапенем-резистентни изолати *Acinetobacter baumannii* – разпространение и механизми на антимикробна лекарствена устойчивост. Здраве и наука. 2016;VI(4):20-5.
- Стратева Т, Стоева Т, Савов Е, и др. Карбапенем-нечувствителни нозокомиални изолати *Acinetobacter baumannii* с множествена лекарствена резистентност (2014-2016 г.): надзор на антимикробната устойчивост и препоръки за лечение. Медицински преглед. 2017;53 (6):27-36.
- Strateva T, Sirakov I, Mitov I. First detection of an OXA-58 carbapenemase-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. J Glob Antimicrob Resist 2018;13:123-4.
- Стратева Т, Стоева Т, Савов Е, и др. Нозокомиални изолати *Acinetobacter baumannii* с множествена лекарствена резистентност (2014-2016) – механизми на устойчивост и епидемиологично типизиране. 15 Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. София. 17-19 май 2017:13-14.
- Strateva T, Sirakov I, Savov E, et al. First report of an OXA-58-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. 10th Balkan Congress of Microbiology Microbiologia Balkanica'2017. Sofia. Nov 16-18, 2017; A121.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 5/2016 Постоперативна болка при стрептозотицин-индуциран диабет: фармакологично модулиране

Изследователски екип: Чл.-кор. Проф. Мила Василева Власковска, дм, дмн

- Проф. Славина Сурчева, дм
- Доц. Павлина Гатева, дм
- Д-р Любина Тодорова
- Д-р Кирил Сурчев - УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”
- Любомила Димитрова
- Никол Христова

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на изследването да проследят и сравнят ефектите на някои аналгетици върху ноцицептивните прагове на здрави и диабетни мъжки плъхове порода Wistar при модел на остра постоперативна болка. Чрез тестове за механична и термична хипералгезия, инкапацитанс тест оценявахме антиноцицептивните ефекти на metamizol (150 mg/kg), paracetamol (100 mg/kg), gabapentin (60 и 100 mg/kg), amitriptyline (25mg/kg) при модел на постоперативна болка (инцизия на плантарен мускул) при здрави и диабетни плъхове. Metamizol и paracetamol потискат механичната и тактилна хипералгезия на

инцизирания крайник на 2ри и 24 ч от операцията. Еднократно приложен Gabapentin (поизразено в доза 100 mg/kg), след инцизията облекчава термичната хипералгезия и нарушената функция на увредената лапа. Еднократно, постоперативно габапентин осигурява недостатъчна аналгезия при здрави плъхове, но показва повишена постоперативна ефикасност при хипералгезия и инкапацитанс тест при диабетни плъхове. Gabapentin alone provided insufficient analgesia in naïve rats but show increased postoperative efficacy on hyperalgesia and weight bearing in diabetic rats. Предоперативно даден габапентин увеличава антихипералгезичните ефекти както на габапентин, така и на метамизол, приложени на 2ри и 24ти час след плантарен разрез при диабетни плъхове. Предоперативното прилагане на амитриптилин увеличава наркозата (съкрати заспиването и удължи събуждането) при плъховете, но не оказва значително влияние върху хипералгезията и нарушената функция. Нашите резултати показват, че предоперативното лечение с габапентин подобрява следоперативната аналгезия при диабетни плъхове.

Научни публикации и прояви:

- Surcheva S, Todorova L, Maslarov D, et al. Preclinic and clinic effectiveness of gabapentin and pregabalin for treatment of neuropathic pain in rats and diabetic patients, *Biotechnol Biotechnol Equip* 2017;31(3):568-57.
- Surcheva S, Marchev S, Surchev K, et al. Treatment of diabetic postoperative pain: experimental, clinical and regulatory studies. The 13th Congress of Eur Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), Prague, Czech Republic, Jun 24-27, 2017.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 6/2016 Антиангиогенен ефект и цитотоксични механизми на хидроксиантрахинона алое-емодин в човешки мозъчни микроваскуларни ендотелни клетки

Изследователски екип: Гл.ас. Биляна Георгиева Георгиева, дб

- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Доц. Албена Годорова, дбн
- Гл. ас. Миглена Копринарова, дб, Институт по Молекулярна биология, БАН
- Доц. Иванка Димова, дм
- Виктор Славов, докторант
- Доц. Светла Данова, дб, Институт по Микробиология, БАН

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящата работа беше да се изследват механизмите на цитотоксичност на фитохидроксиантрахинона алое-емодин (АЕ) върху човешката мозъчна ендотелна клетъчна линия hСМЕС / D3 и да се оцени клетъчният отговор в ранните стадии на третиране, за да се разширят познанията за антиангиогенните свойства на АЕ. Мозъчните ендотелиални hСМЕС / D3 клетки бяха третирани със серия от концентрации на АЕ (5 - 200 μ M) за период от 24 часа. Клетъчната жизнеспособност беше определена посредством MTS анализ. Нивата на аденозин трифосфат (АТФ) в клетките се оценяваха чрез луминисцентен анализ (CellTiter-Glo®). Вътреклетъчните реактивни кислородни

видове (ROS) се определяха флуориметрично посредством 2', 7'-дихлорофлуоресцеин (CM-H2DCFDA). Митохондриалният мембранен потенциал (MMP) се оценяваше чрез оцветяване с тетраметилпродамин метилов естер (TMRM), докато Fluo-4 се използваше за измерване на нивата на вътреклетъчния свободен Ca^{2+} в живи клетки, анализирани чрез автоматичен флуоресцентен микроскоп (High Content Analysis) Arrayscan VTI 740. Третирането на hCMEC / D3 клетки с АЕ в концентрации между 50 и 200 μ M, за период от 24 часа, доведе до дозозависимо намаляване на клетъчната преживяемост, както и на вътреклетъчните нива на АТФ. Беше установена увеличена продукция на ROS и нарушаване на митохондриалния мембранен потенциал. Третиране с АЕ в концентрация 5 μ M беше достатъчно за драстично повишаване на вътреклетъчните нива на Ca^{2+} . Получените резултати показват, че АЕ инхибира пролиферацията на човешки мозъчни микроваскуларни клетки чрез механизъм, включващ генериране на ROS, нарушаване на Ca^{2+} хомеостаза и митохондриални увреждания.

Научни публикации и прояви

- Dimova I, Danova S, Slavova K et al. Aloe-emodin triggers ROS and Ca^{2+} production and decreases the levels of mitochondrial membrane potential of human brain capillary endothelial cells. XXVII Int conference of the union of scientists in Stara Zagora, 1-2 Jun 2017.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 7/2016 Скриниране на новосинтезирани кумаринови и хроменови съединения (фаза II и III) с определяне на ED50 и TD50 и прилагане на 6 Hz модел на фармакорезистентна епилепсия

Изследователски екип: Проф. Славина Кирилова Сурчева, дм

- Доц. Павлина Гатева, дм
- Гл. ас. Виолина Стоянова, дх
- Доц. Яна Чекаларова, дм
- Проф. Николай Василев, дх
- Гл. ас. Радка Тафраджийска-Хаджиолова, дм
- Гл. ас. Юлиан Войников, дф
- Соня Калинова
- Енрико Медури, студент

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Проектът е пореден етап (фази II и III) от скрининг на вещества с потенциално антиепилептична активност. След като при предходни изследвания идентифицираме няколко различно функционализирани кумаринови и 2H-хроменови хидразид-хидразони, даващи положителни резултати при тестовете с максимален електрошок (MES) и подкожно инжектиране на пентилентетразол (scPTZ) при мишки, с настоящия проект ние (1) определихме времето до поява на максимален ефект (TPE); (2) оценихме средната ефективна доза ED50, средната токсична доза TD50 и протективния индекс (PI) на същите вещества с MES и scPTZ и (3) определихме TPE, ED50, TD50 и PI при теста с 6Hz като модел за парциални рефрактерни на лечение припадъци. Резултатите от количествения скрининг са както следва:

Тествано вещество	MES			scPTZ			6Hz		
	TPE (h)	ED50 (mg/kg)	PI	TPE (h)	ED50 (mg/kg)	PI	TPE (h)	ED50 (mg/kg)	PI
4a	0.5	99.71	> 3.01	0.5	-	-	-	-	-
4b	0.5	68.66	> 4.37	0.5	-	-	0.5	137.3	> 2.18
4c	0.5	81.29	> 3.69	0.5	-	-	0.5	94.37	> 3.18
8a	0.5	87.63	> 3.42	0.5	218.50	> 1.37	-	-	-
8b	0.5	12.51	> 23.98	0.5	127.10	> 2.36	-	-	-
8c	-	-	-	0.5	-	-	0.5	1.08	> 1.51

Освен това, ние разширихме скрининга с нови пиразол-съдържащи кумарини, получени след циклизация на ацилхидразони, които обаче се оказаха неактивни по отношение на приложените от нас тестове. В опит да изясним връзката структура-активност на биологично-активните съединения, приложихме компютърния метод молекулен докинг на кумаринови и хроменови аналози с GABA-A рецептора. Установихме съответствия между най-активните *in vivo* съединения и молекуления докинг. Направихме *in silico* изчисления на физикохимичните параметри за предсказване на способността на тестваните вещества да проникват през кръвно-мозъчната бариера.

Научни публикации и прояви:

- Angelova V, Voynikov Y, Andreeva-Gateva P, et al. In vitro and in silico evaluation of chromene based aroyl hydrazones as anticonvulsant agents. *Med Chem Res* 2017;26:1884-96.
- Angelova V, Valcheva V, Pencheva T, et al. Synthesis, antimycobacterial activity and docking study of 2-aroyle-[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one derivatives and related hydrazide-hydrazones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(13):2996-3002.
- Angelova V, Karabelyov VR, Tchekalarova J, et al. Molecular docking study on chromene based aroylhydrazones as anticonvulsant agents. Spring Student Scientific Session. Faculty of Pharmacy, MU-Sofia, 22.04.2017.
- Andreeva-Gateva P, Tchekalarova J, Angelova V, et al. Preclinical Screening of Coumarin and 2H-chromene substituted hydrazide-Hydrazone Derivatives, as Potential Anticounvulsants. The 13th Congress of the Eur Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), Prague 2017.
- Shakar S, Kasi A, Zhelyazkov D, et al. Evaluation of Mediane Effective Doses (ED50), Median Toxic Doses (TD50) and Protective Indices (PI) of six newly synthesized anticonvulsants. XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 11-14 May 2017, p. 62.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 8/2016 Изследвания върху гените за токсигенност на първите български изолати на ентерохеморагични *Escherichia coli* (EHEC, STEC)

Изследователски екип: Чл.кор. Проф. Иван Гергов Митов, дмн

- Гл. ас. Иво Сираков, дvm
- Доц. Таня Стратева, дm
- Гл. ас. Ралица Попова-Илинкина, дvm - БАБХ
- Проф. Христо Даскалов, дvmн - БАБХ

- Гл. ас. Ирина Александрова, дб - БАН

Базова организация: Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването е чрез класически и молекулярно-биологични техники, филогенетични и еволюционни анализи да докажем и проучим български изолати *E.coli*, които притежават ген за продукцията на шигатоксин и интимин. Изследвахме различни суровини и хранителни продукти за тяхното откриване. Използвахме селективни хранителни среди и биохимични методи за доказване на *E.coli*, сравнихме различни методи за получаване на ДНК, проведохме мултиплексен и конвенционален PCR за доказване на *stx1*, *stx2*, *eae* и 16s rRNA гена и за определяне на субтипа на *stx1* и *stx2*. Секвенирахме доказаните гени и ги проучихме филогенетично и еволюционно с данни от NCBI. Използвахме серологичен и PCR метод за определяне на серогрупите на изолатите и проучихме тяхната антибиотична чувствителност. Изолирахме и кутивирахме 25 изолата *E.coli*, от които 11 притежаваха ген/гени на токсигенност. Носители на *stx1* бяха 5 изолата, на *stx2* един и 5 изолата на ген за *eae*. За първи път в България определихме субтипа на *stx1* и *stx2*. След секвениране на *stx1A* субединица и филогенетичен анализ, нашите изолати се обособиха в две отделни групи. При анализ на 16s rRNA гена, положителните за *stx1*, *stx2* и *eae* български изолати *E.coli* показаха различна топология, но разликите в секвенциите, не са пределекционни за рестриктазни ензими. Изолатите са ограничен брой и може да се спекулира, че има връзка между топологията на изолат 348RP и наличието на *stx2* гена. Изолатите, положителни за ген за интимин *eae* се различават генотипно и се групират в отделна филогенетична група в сравнение с другите изолати. Също така се различават един от друг по *eae* гена, но не и по 16s rRNA гена, което най-вероятно се дължи на техния различен източник и общия им предшественик. След оценка на еволюционните различия, такива установихме само при една от референтните секвенции. Резултатите от антимикуробната чувствителност показва устойчивост към няколко антимикуробни средства, използвани най-вероятно при третирането на инфекции, причинени от хранителни патогени при хора и животни, докато четири от изолатите с продукция на *stx1* не показаха резистентност към използваните антибиотици.

Научни публикации и прояви:

- Popova R, Sirakov I, Alexandar I, et al. Subtyping of Stx and 16s rRNA gene analysis of some Bulgarian shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates. Acta Microbiol Bulg 2017;33:17-23.
- Sirakov I, Popova R, Alexandar I, et al. Partial genome analysis of intimin (*eae*) positive *E.coli* isolates from food. 10th Balkan Congress of microbiology, Microbiologia Balkanica' 2017, Nov 16-18, 2017, Sofia, Bulgaria, p.316.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 10/2016 Прилагане на високоразделителни мас спектрометрични методи за изследване на участието на протеин киназа СК2 в хетеро-олигомерните VMPRs комплекси от нормални човешки първични дентални пулпни клетки

Изследователски екип: Акад. Проф. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

- Доц. Валентин Лозанов, дб

- Гл. ас. Антония Исаева, дб
- Ас. Виолета Димитрова
- Ас. Анелия Василева
- Ас. Зорница Михайлова, ФДМ

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: За първи път бе проведено изследване, което категорично показва наличието на субпопулация от клетки, експресиращи по своята повърхност рецептор BMPRIa, за чието участие в олигомерния рецепторен комплекс, трансдуциращ BMP сигналите за първи път бе изследван в клетъчни култури, изолирани от нормална човешка дентална пулпа. В настоящият проект успешно бе проведено, изолиране на клетъчни култури от дентална папила, както и тяхното култивиране в DMEM с високо съдържание на глюкоза, съдържаща 0,5% FBS, 2 mmol/L glutamine, 100 U/ml penicillin/100 mg/ml streptomycin на 37⁰ C и 5% CO₂. Успешно бе извършено магнитно сепариране MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), въз основа, на което бе получена хомогенна клетъчна култура, експресираща по своята повърхност рецептор BMPRIa. Успешно бе осъществена трансфекцията с *siRNA SKa* на BMPRs-експресиращите клетки, сортирани от първичната хетерогенна дентална пулпна клетъчна култура. Получените резултати от използваните протеомни методи не подвърждават работната хипотеза за участие на SK2 в молекулната сигнализация на BMP рецепторите.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 11/2016 Изследване на ролята на Wnt3a върху експресията на стволовоклетъчни и апоптотични маркери в човешки мезенхимни стволови клетки от апикална папила

Изследователски екип: Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб

- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Ас. Зорница Михайлова
- Розалия Циканделова
- Ас. Виолета Димитрова
- Гл. ас. Николай Ишкитиев, дм, дб

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Резултатите изложени тук биха послужили като основа за още по-обстойно проучване върху регулацията на Wnt пътеката в клетки от апикална папила. Флоуцитометричните анализи сочат, че след третиране с висока концентрация на Wnt3a клетките не претърпяват програмирана клетъчна смърт, и ефектът на отлепяне наблюдаван в автокринна среда не се дължи на протичаща апоптоза. Чрез флоуцитометрия също беше установено, че третирането не променя експресията на стволовоклетъчни маркери като CD271 и нестин. С уестърн блот анализът бяха потвърдени резултатите от количествения имунофлуоресцентен анализ, и беше установено, че при третиране на клетки от апикална папила с 50нг/мл Wnt3a Wnt сигналната пътека се активира успешно, с ясна активация на таргетни гени от пътеката и понижена експресия на минерализационния маркер алкална фосфатаза. Допълнително

беше проведен Real time количествен RT-PCR анализ, с който бяха установени разлики в експресията на матричното РНК на гени участващи в регулацията на разграждането и на екстрацелуларния матрикс, иницирането на имунен отговор и минерализацията. Бъдещи проучвания върху ролята на Wnt сигналният път могат да бъдат проведени, използвайки литиев хлорид с цел изясняване на тук наблюдавания феномен на отлепяне. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 12/2016 Взаимодействие между серотонинергичната и ГАВА-ергичната невромедиаторни системи в ретината на нисши гръбначни

Изследователски екип: Проф. Лилия Витанова, дмн

- Доц. Елка Попова, дм
- Доц. Петя Купенова, дм
- Д-р Десислава Жекова

Базова организация: Катедра по физиология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящия проект бе изследване на взаимодействията между серотонина и йонотропните ГАВА-ергични рецептори в ретината на нисши гръбначни. Използвахме два методични подхода: имуноцитохимичен и електрофизиологичен. Посредством индиректния имунофлуоресцентен метод демонстрирахме разпределението на серотонинергичните и ГАВАергични неврони, както и точната синаптична локализация на ГАВА_C рецепторите в ретината на жабата *Rana ridibunda*. Върху изолирани, отворени очи на същия вид изследвахме ефекта от самостоятелното или комбинирано стимулиране на серотониновите и йонотропните ГАВА рецептори (с ТАСА) върху b- и d-вълните в електроретинограмата. Установихме, че серотонинът предизвиква увеличаване на амплитудата на b- и d-вълните, докато ТАСА води до намаляването им. Относителното намаляване на амплитудата на вълните, предизвикано от ТАСА, беше достоверно по-малко при комбинираното прилагане на (серотонин + ТАСА). За да установим ефектите от изолираното активиране на ГАВА_C рецепторите, в група опити изследвахме ефектите на ТАСА или на (ТАСА + серотонин) по време на блокиране на ГАВА_D рецепторите (с бикикулин). Бикикулинът предизвикваше значително увеличение на амплитудата на b- и d- вълните. Стимулирането на ГАВА_C рецепторите на фона на приложен бикикулин предизвикваше значително намаляване на амплитудата на двете вълни в ЕРГ. Подобно намаление на амплитудата на b-вълната беше наблюдавано и по време на прилагането на (серотонин + ТАСА), докато намалението на амплитудата на d-вълната беше по-слабо проявено. Получените резултати показват, че серотонинът модулира негативно ГАВА_D рецепторите, участващи в генерирането както на ON-, така и на OFF-отговорите, докато негативно модулиращият му ефект по отношение на ГАВА_C рецепторите се отнася предимно за OFF-отговорите. Имуноцитохимично, използвайки едновременно антитяло срещу серотонина и антитяло срещу ГАВА_C рецепторите (double labeling), установихме близко разположение и колокализация на двете антитела в проксималната част на вътрешния плексиформен слой - мястото, където формират своите синаптични контакти OFF- биполарните клетки. Тъй като ретината е част от ЦНС, може да се допусне, че подобни взаимоотношения между двете медиаторни системи съществуват и на нивото на мозъка.

Научни публикации и прояви:

- Vitanova L, P Kупenova, E Popova. Immunocytochemical study on the possible interactions between serotonin and GABA C (GABA A rho) receptors in frog retina. IUPS 38th Word Congress: Rio de Janeiro, 1-5 Aug 2017, Brazil.
- Popova E, P Kупenova, L. Vitanova. Interaction between the serotonergic and GABAergic systems in the frog retina as revealed by electroretinogram. IUPS 38th Word Congress: Rio de Janeiro, 1-5 Aug 2017, Brazil.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 13/2016 Проучване на факторите на вирулентност при клинично-значими щамове *E.coli* и *K.pneumoniae*, продуциращи карбапенемази и/или широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) в пет болници в София, Варна и Плевен

Изследователски екип: Доц. Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм

- Чл-кор. Проф. Иван Митов, дм, дмн
- Доц. Цветан Велинов, дм
- Проф. Мария Средкова, дм, МУ-Плевен
- Проф. Емма Кьоляян, дм - Мед. институт, МВР
- Доц. Теменуга Стоева, дм - МУ-Варна
- Д-р Добринка Иванова - II МБАЛ – София
- Росица Димова, студент

Базова организация: Катедра по медицинска микробиология, бул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Бяха колекционирани 41 карбапенемаза продуциращи *K. pneumoniae* клинични изолати от 4 медицински центъра. Разпределението на карбапенемазите показва преобладаването на КРС ензими - (80%). Бяха доказани още NDM и OXA ензими. Изолатите се групираха в 7 клъстера. КРС продуцентите показаха наличието на 6 клъстера с от 3 до 6 представителя. NDM продуцентите принадлежаха на един клон. Установихме го във всички участващи клиники и се асоциираше с продукция на СТХ-М-15 like ензими. Определянето на антимикуробната чувствителност показва високи нива на резистентност, те запазват висока чувствителност само по отношение на amikacin. Colistin, tigecycline и fosfomycin също имаха много добра чувствителност. Шестдесет и девет процента от всички *E. coli* изолати принадлежаха на високо вирулентната B2 филогенетична група и се асоциираха предимно с продукцията на СТХ-М-15 ензими. В много висок процент бяха изолирани гените кодиращи тип 1 фимбрии, кодиращ рецептор за йерсиниобактин, протеин, специфичен за уропатогените микроорганизми.

Научни публикации и прояви:

- Markovska R, Keuleyan E, Stankova P et al. Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to cephalosporins third generation collected from patients in Bulgarian hospitals. CR Acad Bulg Sci. 2018;71(8):1130-8.
- Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Pencheva D, Keuleyan E, Murjeva M, Sredkova M, Ivanova D, Lazarova G, Nedelcheva G, Kaneva R, Mitov I. Dissemination

of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017 Dec;89(4):310-3.

- Марковска Р, Стоева Т, Станкова П, и др. Широко разпространение на CTX-M-15 призвеждащи *Klebsiella spp* в болници в България. 15 конгрес на БАМ. София, 17-19 май 2017, Парк-хотел “Москва” стр 19-20

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 14/2016 Изследване ролята на ангиотензин АТ1 рецепторите в механизмите регулиращи мозъчната реактивност при каинатен модел на епилепсия у спонтанно хипертензивни и нормотензивни Wistar плъхове

Изследователски екип: Проф. Николай Еленков Лазаров, дмн

- Доц. Яна Чекаларова, БАН
- Гл. ас. Ангел Дандов, дм
- Гл. ас. Димитринка Атанасова, БАН
- Ас. Златина Ненчовска, докторант, БАН
- Ас. Тодор Киров
- Андрей Иванов, студент
- Събина Митова

Базова организация: Катедра по анатомия, хистология и ембриология, ул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящия проект бе да се изследва ефекта от продължително третиране със селективния АТ1 рецепторен антагонист лосартан върху промените в пространствената хипокамп-зависима памет и АТ1 рецепторната експресия през хроничната фаза на каинат-индуцирана епилепсия при спонтанно хипертензивни и нормотензивни Wistar плъхове. Лосартанът бе прилаган в доза от 10 мг/кг/ден, интраперитонеално за един месец в периода на епилептогенезата. С помощта на денонощно видео наблюдение бе верифицирана появата на спонтанна епилептиформна активност и настъпването на хроничната фаза на епилепсия. Пространствената памет бе изследвана с радиален осем-раменен лабиринт (RAM), а експресията на АТ1 рецептори в дискретни мозъчни структури с имунохистохимичен метод. Резултатите от това изследване показаха, порода-зависими вариации в пространствената памет в норма и патология. Хипертензивните плъхове се характеризираха с по-добро заучаване спрямо нормотензивните при контролни условия и след епилептичен статус. Многократното третиране с лосартан показва облекчаващ ефект върху уврежданията в хипокамп-зависимата памет при Wistar плъхове с епилепсия. Резултатите от имунохистохимичното изследване на пластичните промени в АТ1 рецепторите и в частност ефектите от продължително третиране с антагониста лосартан върху дискретни мозъчни структури при хипертензивни плъхове, SHRs и нормотензивни Wistar плъхове показа, че хроничната фаза на КА-индуциран модел на темпорална епилепсия се характеризира с повишена рецепторна експресия в CA1, CA2, CA3a, CA3c полета на хипокамп и хилус на дентатен гирус, но пириформената кора е с понижена АТ1 имунореактивност. За разлика от нормотензивните плъхове, при хипертензивните плъхове бе установена повишена рецепторна експресия в базолатералната амигдала. Селективният АТ1 антагонист

лосартан потисна повишената имуноекспресия в по-голяма степен при модел на коморбидна хипертония и епилепсия. В заключение, данните от настоящето изследване имат теоретичен и приложен принос за прецизиране терапията с антихипертензивния препарат лосартан при коморбидна хипертония и епилепсия.

Научни публикации и прояви:

- Ivanova N, Tchekalarova J, Atanasova D, et al. Strain-dependent effects of AT1 receptor antagonist losartan on spatial memory performance of Wistar and spontaneously hypertensive rats in kainate model of temporal epilepsy. CR Acad Bulg Sci. 2018;71(6):839-46.
- Tchekalarova J, Atanasova D, Nenchovska Zl et al. Agomelatine protects against neuronal damage without preventing epileptogenesis in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis. 2017; 104:1-14.
- Atanasova D, Tchekalarova J, Ivanova N et al. Losartan suppresses the kainate-induced changes of angiotensin AT₁ receptor expression in a model of comorbid hypertension and epilepsy. Life Sci 2018;193:40-6.
- Ivanova N, Atanasova D, Lazarov N, et al. Study role of AT1 receptors on spatial memory impairment in the kainate model of epilepsy. Scientific Meeting of Bulg Soc Physiol Sci - Sofia branch, 25 Nov, 2016, page 8.
- Goranova P, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Effects of chronic treatment with agomelatine on seizure activity, comorbid behavioral changes and neuronal damage in the kainate model of temporal lobe epilepsy. XVII Int Cong Med Sci, Sofia 11-14 May, 2017, page 112.
- Tchekalarova J, Atanasova A, Atanasova M, et al. Antidepressant effect of chronic agomelatine treatment in kainate model of epilepsy-associated depression involves a suppression of inflammatory signalling. Neurogenesis in the developing and adult primate brain, Varna, 19-21 May 2017, page 1.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 15/2016 Роля на канабиноидната и катехол-аминергичната невротрансмитерни системи върху ноцицепцията и поведенческите отговори след стрес на плъх

Изследователски екип: Гл.ас. Христина Христова Ночева-Димитрова, дм

- Проф. Адриана Бочева, дм
- Доц. Роман Ташев, дм
- Доц. Димо Кръстев, дм – МК „Й. Филаретова“
- Гл. ас. Радка Тафраджийска, дм
- Ас. Мимоза Цветкова
- Ас. Ивелина Химчева - МУ-Плевен
- Димитър Кочев, докторант
- Людмила Янкова

Базова организация: Катедра по Патофизиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Получените резултати потвърждават очакваните от екипа ефекти от взаимодействието между канабиноидите и катехоламинергичната система.

Имобилизационната стрес-индуцирана аналгезия (И-СИА) се потенцира най-силно от приложението на десипрамин както преди агониста на СВ1-рецепторите анандамид, така и след въвеждането на антагониста на СВ1-рецепторите АМ251. Студовата стрес-индуцирана аналгезия (С-СИА) също се повлиява в най-висока степен от приложението на десипрамин, като преди анандамид неговият ефект отшумява след 20-та мин, докато приложението на АМ251 удължава аналгетичния ефект и след 30-та минута от експеримента. Топлинната СИА се повишава в най-висока степен от клонидин, като ефектът му е по-силно изразен приложен преди агониста на СВ1-рецепторите анандамид в сравнение с антагониста АМ251. Трите вида стрес (имобилизационен, студов, топлинен) нарушават паметта и обучението при опитните животни. Съвместното приложение на клонидин и анандамид подобряват обучението след трите вида стрес, докато АМ251 и десипрамин не го променят значимо. По отношение на изследователското поведение анандамид и адренергичната система понижават броя на вертикалните и хоризонталните движения при изследваните животни. Получените резултати потвърждават хипотезата на изследователския екип за взаимодействието между ендогенната канабиноидна и адренергичната системи. Двете системи взаимно повлияват болковата перцепция, изследователското поведение, паметта и обучението. Анализът на получените резултати показва, че най-значимо усилване на СИА се наблюдава след студов стрес след съвместното приложение на инхибитор на обратното захващане на адреналина десипрамин и агониста на СВ1-рецепторите анандамид. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 16/2016 Модел на депресия: Участие в поведенчески реакции на ангиотензин II микроинжектиран в амигдала на плъхове

Изследователски екип: Доц. Роман Емилов Ташев, дм

- Проф. Александър Стойнев, дм, дмн
- Проф. Адриана Бочева, дм
- Гл. ас. Христина Ночева, дм
- Гл. ас. Радка Тафраджийска, дм
- Ас. Мимоза Цветкова
- Димитър Кочев, докторант
- Тодор Тороманов, студент
- Петра Василева, студент
- Людмила Янкова

Базова организация: Катедра по Патофизиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Проучени са ефектите на ангиотензин II (Ang II) и лосартан (антагонист на АТ1-рецепторите), инфузирани едностранно или двустранно в централното ядро на амигдала (CeA) на плъхове с модел на депресия (олфакторна булбектомия, ОВХ) върху изследователското поведение, локомоторната активност, състоянията на тревожност и ноцицепцията. Промените в изследователската и локомоторната активност са регистрирани в апарат Opto Varimex. Повишената експлораторна и двигателна активност с нарушена хабитуация е типичен поведенчески феномен при ОВХ плъховете. Установено е, че Ang II (50 µg), микроинжектиран в лявото CeA повишава експлораторната и

локомоторна активност на ОВХ-плъховете, докато лосартан (100 µg) приложен двустранно и в лявото СеА, ги потиска в сравнение с ОВХ контролите. Беше изследван ефектът на Ang II и лосартан, микроинжектирани едностранно и двустранно в СеА на депресивни плъхове върху състоянията на тревожност (plus-maze). Инфузията на Ang II не променя състоянието на тревожност на ОВХ плъховете, докато лосартан, микроинжектиран двустранно и в ляво, проявява аксиолитично-подобен ефект. Ноцицепцията се изследва чрез механичен натиск върху лапата на плъх (аналгезиметър). Ang II, микроинжектиран двустранно и в дясното СеА понижава прага на болката (ноцицептивен ефект). Инхибирането на AT1 рецепторите от лозартан, инжектиран едностранно или двустранно в СеА на ОВХ плъховете, повишава болковия праг (антиноцицептивен ефект) в сравнение със съответните ОВХ контроли; антиноцицептивният ефект е по-изразен в дясната страна. Така, ефектите на Ang II и лосартан са противоположни и асиметрични в лявата и дясната амигдала. Това изследване за първи път дава информация за изразен латерализиран ефект на лозартан върху изследователското поведение, локомоторната активност, тревожността, ноцицепцията и посочва за възможното участие на AT1 рецепторите в механизмите на депресивно-подобните синдроми, което говори за асиметрия на Ang II-свързаните поведенчески отговори на лявото или дясното СеА и различно разпределение на AT1 рецепторите в двете полукълба.

Научни публикации и прояви:

- Tashev R, H Nocheva, M Tzvetkova, et al. Differential effects of angiotensin II and losartan on exploratory behaviour after microinjections into rat amygdala. C R Acad Bulg Sci 2017;70(6):863-70.
- Tashev R, P Vasileva, S Belcheva, et al. Differential effects of angiotensin II and losartan on exploratory behavior after microinjections into rat amygdala. Jubilee Conferences "Audacity and youth in pharmacology," Zigov chark, Oct 7-9, 2016.
- Tashev R, S Belcheva, T Toromanov, et al. Asymmetry in exploratory behaviour to losartan microinjected into amygdala in rats with a model of depression. Jubilee Conferences "Audacity and youth in pharmacology," Zigov chark, Oct 7-9, 2016.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 17/2016 Роля на хормоните лептин, адипонектин и грелин в механизмите на инсулинова резистентност при хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза

Изследователски екип: Доц. Теодора Светославова Ханджиева-Дърленска, дм

- Проф. Надка Бояджиева, дм, дмн
- Д-р Десимира Миронова
- Галина Добревска
- Калина Каменова
- Росица Методиева

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В проведеното проучване се проследи взаимовръзка между функцията на щитовидната жлеза и мастната тъкан като ендокринен орган. Моделите на експериментално индуцираните дисфункции на щитовидната жлеза се проведоха за:

хипофункция с Propycil 50 mg, ALMEDA LTD, в дневна доза 1 mg/ml) и хиперфункция с L-tyroxin 100 µg, Berlin-Chemie, в дневна доза 2µg/ml. Проследи се и се промяната на теглото в дадения едномесечен период за трите групи плъхове. При сравняването на трите групи се отчете несъществена разлика в покачването на телесното тегло. Очакваната разлика в теглото на експерименталните животни не е толкова демонстративна, което се обяснява с краткия период, през който животните са подложени на патологично ефект на дисфункцията на щитовидната жлеза. Биохимичната оценка на щитовидната жлеза се установи чрез изследване на хормоните TSH, fT3 и fT4. За групата с хипофункция се отчете средна стойност 20.49 ng/ml, за хиперфункция- 1.05 ng/ml и контролна група- 1, 08 ng/ml. Допълнителното определяне на периферните хормони дава по-пълна информативност за степента на повлияване на щитовидната функция. За fT3 (средни стойности за хипотиреоидна група- 2,07 ng/ml, за хипертиреоидна- 2,54 ng/ml, контролна група- 2,08 ng/ml), се отчитат нормално разпределение на стойностите на хормоните за отделните групи, което отразява очакваните промени във функцията на жлезата. Самостоятелното проследяване само на fT3 и fT4 е недостатъчно, защото секрецията им, както и конвертирането на fT4 в fT3 е зависимо от времевия период, в който се очаква да се развие хипофункция или хиперфункция, при съответния стандартизиран експериментален модел. От значение за конверсията на хормоните са и допълнителни фактори на средата, като околна температура и сезонност. Ендокринната връзка между тиреоидеята и мастната тъкан като органи се изясни с проследяване на стойностите на лептин и адипонектин. Установява се положителна връзка между плазмените нива на TSH и лептин, което се обуславя от подлежащите метаболитни нарушения, свързани с хипофункцията на щитовидната жлеза. Установи се инсулинова резистентност и в трите групи като се изчисли НОМА- индекс, на базата на изследвана сутрешна кръвна захар и имунореактивен инсулин. Групата с хипофункция на жлезата показва стойности, некорелиращи с доказаните при хипотиреоидизъм по-ниски стойности на кръвната захар (средна стойност 7,48 ммол/л). Вероятно този феномен се дължи на факторите на средата (сезонност, промяна в температурата).

Научни публикации и прояви:

- Mironova D, Darlenska T. Hypothyroidism leads to leptin resistance in male Wistar rats, ECO2017 - the 24th Eur Congress on Obesity, Portugal, Porto, 17-20 May 2017, p 96
- Mironova D, Darlenska T. The effect of metformin and SGLT 2 inhibitors on insulin resistance in rats with experimental model of hypothyroidism, Eur Obesity Summit (EOS) - Joint Congress of EASO and IFSO-EC, Gothenburg, Sweden, Jun 1-4, 2016, p 94.
- Mironova D, Darlenska T. Experimental model of hypothyroidism in male Wistar rats. Int Congress of Medical Sciences, 12.05-15.06.2016
- Mironova D, Darlenska T. Ефект на Емпаглифлозин върху телесното тегло на мъжки плъхове порода Wistar с експериментално индуциран хипотиреоидизъм, 6th Congress of Pharmacy 13-16 октомври 2016

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 18/2016 Роля на киоторфина в поведенческите и хистологични изменения предизвикани от експериментален модел на Болестта на Алцхаймер

Изследователски екип: Проф. Бойчо Василев Ланджов, дм

- Доц. Лина Малинова, дм
- Ас. Александър Илиев, дм
- Ас. Станчо Станчев, докторант
- Ас. Христина Ангелова, докторант
- Доц. Даниела Пехливанова, дм - БАН
- Доц. Елена Джамбазова, дм - СУ

Базова организация: Катедра по анатомия, хистология и цитология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В настоящото изследване установихме значителни изменения в мозъчните структури и поведенчески характеристики на плъхове с експериментален модел на спорадична болест на Алцхаймер (AD) предизвикан чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на стрептозотозин (STZ, icv). Ранната фаза от развитието на модела (един месец след инжектирането) се характеризира с повишена двигателна и изследователска активност, понижено ниво на безпокойство, единични спонтанни гърчови пристъпи и увреждане на работната памет. Субхроничното третиране с дипептида киоторфин (КТР, icv) 7 дни преди и 7 дни след прилагане на токсина потисна анксиолизата и премахна увреждащия работната памет ефект на експерименталния модел, но не доведе до понижаване в двигателната активност. По време на напредналата фаза на AD (четири месеца след индуцирането) регистрирахме нарушена хабитуация със запазени високи нива на двигателна и изследователска активност, анксиолиза и увреждане на работната и пространствената памет. Третираните с КТР по време на индуцирането на модела плъхове показаха запазена хабитуация, и състояние на безпокойство в непозната околна среда, близки до нормалните стойности на работната памет, но нарушена пространствена памет. Хистологичните изследвания у плъхове четири месеца след индуциране на AD установиха морфологични изменения в мозъчните структури свързани с уголемяване на мозъчните вентрикули, намаляване на обема на хипокампа и неокортекса. Селективното оцветяване с Congo red показва отлагане на А β амилоид в хипокампа и мозъчните кръвоносни съдове. Плъховете претретираните с КТР не показаха достоверни изменения в нивата на отложения А β амилоид в конкретните мозъчни структури, в сравнение с групата AD третирана с физиологичен разтвор. Хистохимичните находки показват, че NADPH-d експресиращите неврони са силно чувствителни към невродегенерация и че азотния оксид и КТР имат връзка с патогенезата на AD. Обобщените данни показват умерен протективен ефект на дипептида КТР при директното му инжектиране в мозъка, върху патологичните изменения предизвикани от експериментален модел на AD у плъхове.

Научни публикации и прояви:

- Angelova H, Iliev A, Stanchev S, et al. Expression of NADPH-d reactive neurons in hippocampus of Alzheimer's disease rat model. A histochemical study. X Int symposium on clinical anatomy, 6-8 Oct 2016, Varna, Bulgaria. Scripta Sci Med 2016;48(Suppl. 2):42-3.
- Angelova H, Pechlivanova D, Dzhambazova E, et al. Effects of kyotorphin on the early behavioral and histological changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. C R Acad Bulg Sci 2018;71(3):424-30.
- Angelova H, Pechlivanova D, Dzhambazova E, et al. Role of kyotorphin in the behavioral changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. Bulgarian society of physiological sciences, 25 Nov 2016, Sofia, Bulgaria, p. 12.

- Angelova H, Pechlivanova D, Dzhambazova E, et al. Impact of sub-chronic intracerebroventricular injection of the dipeptide kyotorphin on the behaviour in a model of sporadic Alzheimer's disease. Of mice and mental health: facilitating dialogue between basic and clinical neuroscientists. London, 24-25 Apr 2017. P20.
- Angelova H, Katsiou A, Pechlivanova D, et al. Behavioral alterations induced by a model of sporadic alzheimer disease: influence of an intracerebroventricular injection of the kyotorphin. 16th Int Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors, May 11-14, Sofia, Bulgaria, 2017. p. 91.
- Korcheva K, Angelova H, Dzhambazova E, et al. Changes in rat's brain on 2nd and 5th month after Alzheimer's disease model. 16th Int Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors, May 11-14, Sofia, Bulgaria, 2017. p. 97.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 19/2016 Роля и разпределение на матриксни металопротеинази 2 и 9 в епилигамента на колатералните връзки на колянната става при плъх в норма и експеримент

Изследователски екип: Доц. Лина Георгиева Малинова, дм

- Гл. ас. Георги Георгиев, дм
- Проф. Бойчо Ланджов, дм
- Д-р Ива Димитрова
- Гл. ас. Александър Илиев, дм

Базова организация: Катедра по Анатомия, хистология и ембриология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на това изследване е да се изследва наличието на матриксни металопротеинази-2 и 9 (ММР-2 и 9) по време на ранно излекуване на медиалния еластичен лигамент в модел на колянна става от плъх. Ние описахме и сравнихме различната експресия на ММР-2 и 9 в епилигамента (EL) на медиалния колатерален лигамент (MCL) на колянното на плъх. MCL и EL на колянната става от дванадесет мъжки плъхове Wistar беше хирургично прерязан и беше оставен да се излекува спонтанно в девет от тях. На осмия, шестнадесетия и тридесетия ден след увреждането, животните бяха умъртвени и връзките бяха изследвани. Разпределението на ММР-2 и 9 беше изследвано през тези периоди. Описанието на EL и експресията на ММР-2 и 9 бяха осъществени чрез светлинно-микроскопски и имунохистохимичен анализ. Експресията на ММР-2 и ММР-9 беше открита в адвентицията на съдовете и във фибробластите на EL. Реакцията на ММР-2 и 9 беше по-интензивна в сравнение с ММР-9. Ние представяме едно от първите изследвания на имунохистохимичната локализация и разпределение на ензимите ММР-2 и 9 в EL тъкан и освен това ние описахме и сравнихме ензимната активност на ММР-2 и 9 в EL. Наблюдавахме добре дефинирана имуноположителна реакция във всички периоди след хирургичната травма, за разлика от нормалната тъкан. Ние също така открихме, че основният източник на ММР-2 е локализиран в тъканта на епилигамента. Чрез текущото проучване ние предлагаме по-пълно описание на процеса на лечение на епилигемнта и за пръв път илюстрирахме наличието на ензими от групата на ММР по време на излекуването на структурите на колянното.

Научни публикации и прояви:

- Пиев А, Georgiev GP, Dimitrova IN, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. Acad Anat Int. 2016;2(2):44-8.
- Georgiev G, Пиев А, Landzhov B, et al. Localization of matrix metalloproteinase-2 in injured medial collateral ligament epiligament in rat knee. C R Acad Bulg Sci 2017;70:273-8.
- Пиев А, Georgiev GP, Landzhov B, et al. Localization of matrix metalloproteinase -2 and -9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. X Int Symposium on Clinical Anatomy. Varna, Bulgaria. Oct 6-8, 2016. A45.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 20/2016 Участие на ангиотензинови АТ1 рецептори в механизма на поведенческите промени при захарен диабет тип 2 у спонтанно хипертензивни плъхове

Изследователски екип: Проф. Александър Георгиев Стойнев, дмн

- Ас. Кирил Петров
- Доц. Даниела Пехливанова, доктор - БАН
- Румяна Митрева - БАН

Базова организация: Катедра по Патофизиология, бул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването беше да изследваме ефектите на субхроничното третиране с ангиотензиновия АТ1 рецепторен антагонист лосартан върху поведенчески и биохимични изменения при експериментален тип 2 захарен диабет (Т23Д) у нормотензивни (Wistar) и спонтанно хипертензивни плъхове (SHRs). Експерименталният модел на Т23Д беше предизвикан чрез комбинирано дълготрайно прилагане на диета богата на наситени мазнини и еднократна и.п. инжекция със стрептозотоцин (STZ, 30 мг/кг) на животни третирани субхронично с лосартан (10 мг/кг дневно, и.п., в продължение на 15 дни). За изследване на промените в телесната маса консумираната храна и вода и екскретираната урина бяха използвани метаболитни клетки, а за определяне на концентрацията на глюкоза в кръвта – тест ленти. Поведенческите експерименти за изследване на двигателна активност, поведение на безпокойство, ноцицепция и работна памет бяха проведени две седмици след инжектирането на STZ. При диабетичните животни бяха установени хипергликемия, намален темп на нарастване на телесна маса, и повишен прием на вода у SHRs. Субхроничното третиране с лосартан повиши денонощния прием на вода у плъховете Wistar с Т23Д, нормализира темпа на нарастване на телесната маса и водния прием у SHRs. Т23Д индуцира понижена двигателна активност у двете породи плъхове, която частично се премахва след третиране с лосартан, без да повлияе съществено нивото на безпокойство. Т23Д понижи болковата чувствителност и предизвика увреждане в краткотрайната памет у SHRs. Третирането с лосартан премагна Т23Д-предизвиканите отклонения в поведението на SHRs и подобри краткотрайната памет у нормотензивните плъхове с модел на ЗД. Третирането на плъхове с ангиотензинов АТ1 рецепторен антагонист лосартан показва умерен протективен ефект

върху предизвиканите от експериментален стрептозотоцинов T23Д поведенчески промени, по-силно изразен у плъховете със спонтанна хипертония.

Научни публикации и прояви:

- Petridis A, D Pechlivanova, K Petrov, et al. Behavioral characteristics of normotensive Wistar and spontaneously hypertensive rats with an experimental model of diabetes mellitus type 2. Black sea symposium for young scientists in biomedicine, 6-9 Apr, 2017, Varna, A119.
- Pechlivanova D, Petrov K, Mitreva R, et al. Effects of AT1 receptor antagonist losartan on the type 2 diabetes mellitus-induced behavioral changes in Wistar rats. XXVII Int Scientific Conference of Assembly of Scientists – Stara Zagora 1-2 Jun 2017, Abstracts.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 21/2016 Участие на аденозин A₁ рецепторите и азотния оксид, синтезиран от невроналната форма на азотен оксид синтазата в регулацията на бързите колебания на бъбречния кръвоток у плъхове

Изследователски екип: Доц. Юри Пенков Няголов, дм

- Петя Маркова, дб
- Лазар Митров, студент

Базова организация: Катедра по физиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследванията бяха проведени на анестезирани мъжки плъхове от линия Wistar. Вълната на бъбречния кръвоток (RBF) и на артериалното кръвно налягане (ABP) бяха регистрирани директно (Biopac MP150WS). Чрез спектрален анализ бяха изследвани бързите колебания на систолното (SAP), диастолното (DAP), средното (MAP) артериално налягане, както и колебанията на максималните (MAX), минималните (MIN) и средните (MEAN), стойности във вълната на RBF (Lab View 3.11). В получените спектрограми на ABP и RBF бяха изследвани зоните на ниски (L: 0.020-0.195 Hz), средни (M: 0.195-0.605 Hz) и високи (H: 0.605-3.00 Hz) честоти. Проучвано беше процентното участие на ниските (L/T%), средните (M/T%) и високочестотните (H/T%) колебания във формирането на общата вариация (T) на ABP и RBF в контролен период и в период на въздействие. За проучване ролята на аденозин A₁ рецепторите; азотния оксид, синтезиран от невроналната изоформа на азотен оксид синтазата (nNOS) и ролята на L-тип Ca²⁺ каналчета в регулацията на RBF, бяха инфузирани венозно съответно: селективен аденозин A₁ рецепторен агонист N6-Cyclopentyladenosine (CPA), в доза 0.125 mkg.kg⁻¹.min, селективен инхибитор на nNOS 7-Nitroindazole (7NI), в доза 2 mg.kg⁻¹.h, както и селективен блокер на L-тип Ca²⁺ каналчета Amlodipine besylate (AML), в доза 200 mkg.kg⁻¹ болус + 50 mkg.kg⁻¹.h инфузия. Получените резултати показаха, че аденозинът чрез A₁ рецепторите, както и NO, синтезиран от nNOS имат съществена роля в регулацията бързите колебания на RBF и ABP. Ние установихме, взаимодействие между тях в регулацията на RBF и в модулацията симпатиково медираните средночестотни колебания на RBF. Ние допускаме, че аденозинът, участва в регулацията на RBF, чрез активиране на A₁ рецепторите по механизъм, изключващ взаимодействие L-тип Ca²⁺ каналчета. Установихме, че активността на L-тип Ca²⁺ каналчета има важна роля в контрола на RBF и на бързите механизми, включени в регулацията му. В условия на инактивирани L-тип Ca²⁺ каналчета

NO, синтезиран от nNOS има съществена роля за генерирането на бързите колебания на RBF.

Научни публикации и прояви:

- Mitrov L, Pramatarova D, Markova P, et al. Involvement of adenosine acting by adenosine A1 receptor subtype and neuronal nitric oxide synthase in the renal blood flow autoregulation in rats. XI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria 11-14 May 2017, A61

Научният отчет е приет с *ДОБРА* оценка по скалата на СМН.

Договор 23/2016 Ефекти на кверцитина и дихидрокверцитина върху апоптотичната сигнална каскада при нормални човешки кератиноцити

Изследователски екип: Доц. Валентин Стойчев Лозанов, дх

- Доц. Мария Драгнева, дб
- Ас. Весела Лозанова
- Ас. Виолета Димитрова
- Ас. Анелия Василева

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия проект беше да се установят ефектите от третиране на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин, с фокус върху повлияването на клетъчната жизнеспособност, пролиферация, морфология и влиянието върху компоненти на апоптотичните сигнални каскади. Третирането на първични кератиноцитни култури с кверцитин (0-100 μM) и дихидрокверцитин (0-100 μM) води до понижаване на клетъчната жизнеспособност до съответно 72% и 73% при 24-часово третиране и 61% и 52% при 48-часово третиране, което е съпроводено и с видими изменения в клетъчната морфология. С помощта на имуноцитохимични методи и Western blot анализи беше установено, че тестваните вещества при концентрация 10 μM не водят до промяна в няколко ключови вътреклетъчни сигнални белтъци, включително каспаза-3 и компоненти на MAP киназната сигнална каскада. Кверцитинът и дихидрокверцитинът при използваните култури от нормални човешки кератиноцити не повлияват експресията на MEK-1/2, p38 MAPK и ERK-1/2, които са ключови участници в MAP киназната сигнална каскада, а също така не повлияват и експресията на киназата Akt, която участва в PI3сигналния път. Кверцитинът и дихидрокверцитинът не повлияват в значима степен и нивата на свободни радикали в клетката. Третирането на нормални човешки кератиноцити с кверцитин и дихидрокверцитин при концентрация до 10 μM не води до промяна в активността на ключови вътреклетъчни сигнални молекули, но води до промяна в клетъчната морфология. Наблюдаваните морфологични изменения не могат да бъдат обяснени чрез индукция на апоптотичен процес посредством класическите митохондриален и извънклетъчен път, опосредстван от рецептори на смъртта.

Научни публикации и прояви:

- Лозанова В, Димитрова В, Василева А, и др. Ефекти на кверцитин и дихидрокверцитин върху пролиферацията и морфологията на нормални човешки

кератиноцити. Втори докторантски симпозиум. Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, 6-7 април 2017, стр. 33
Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 24/2016 Анализ на соматични мутации при основните хистологични типове белодробни карциноми: ПК, АК, НЕТ (КТ, ДКБД и ЕКНЕК) в група български пациенти чрез секвениране от ново поколение на панел от тумор-асоциирани гени

Изследователски екип: Гл. ас. Атанаска Величкова Миткова, дб

- Доц. Радка Кънева, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Гергана Станчева, дб
- Дарина Качакова, дб
- Иван Попов, дб
- Калина Михова
- Проф. Янина Славова-Маринова, дм
- Проф. Димитър Костадинов, дм
- Ас. Дора Маринова, дм
- Евгени Меков, дм
- Александър Лилов, дм

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В настоящето проучване бяха включени туморни тъкани от 8 пациента с АК и 6 с ПК, от които бе изолирана ДНК с помощта на кит. Бе проведен анализ на соматични мутации в панел от 48 тумор-асоциирани гени (TSACP) чрез NGS на платформа MiSeq (Illumina). След провеждане на биоинформатичен анализ установихме, че най-често мутиралият ген в изследваните проби е *TP53*, с 10 различни патогенни варианти. Патогенни мутации в *TP53* бяха открити в 5 пациента с ПК и в 5 пациента с АК, като четири от тях се срещат в повече от един пациент (p.Arg156fs; p.Asn200fs; p.Ser99Cys и p.Tyr236Cys). На второ място, в изследваната група пациенти, по честота на срещане, са мутациите в *KRAS* гена. Откриваме следните активиращи *KRAS* патогенни варианти: p.Ala11Val, p.Gly12Cys, p.Gly12Val, p.Gly12Asp. Мутацията p.Gly12Val се открива в четирима от изследваните пациенти. Много често с настъпване на мутация в *KRAS* гена се наблюдава и мутационно събитие в *TP53*, *GNAS* и *STK11*, което откриваме в анализираният от нас пациенти. В изследваните пациенти не откриваме мутации в *EGFR*, но в един от тях с АК откриваме BRAF V600E мутацията, водеща до намалена чувствителност при лечение с ТКИ- gefitinib и отговор към терапията при лечение с vemurafenib или dabrafenib. В допълнение откриваме и следните патогенни мутации: p.Ser1355fs в *APC* и p.Ala201Gly в *RBI*. В заключение, молекулното профилиране на белодробните карциноми с NGS разкрива нови възможности за стратификация на пациенти за съществуващите таргетни терапии и откриване на нови терапевтични мишени, което е стъпка напред в индивидуализираната медицина.

Научни публикации и прояви:

- Миткова А. Молекулно профилиране и таргетна терапия при солидни тумори. Симпозиум Чудомир Начев, БАН, 03.12.2016
- Петкова В и др. Анализ на соматични мутации при аденокарциноми и плоскоклетъчни карциноми на белия дроб с таргетно новогенерационно секвениране. 2-ри Балкански конгрес по човешка генетика, Пловдив, 8-10.09.2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 25/2016 Изследване на качеството на овогенезата *in vivo* и *in vitro* в овоцити на мишки с експериментално предизвикан системен лупус

Изследователски екип: Доц. Стефка Методиева Делимитрева, дб

- Доц. Майя Маркова, дб
- Доц. Ралица Живкова, дб
- Гл. ас. Венера Николова, дб
- Гл. ас. Ирина Чакърва, дб
- Ас. Валентина Хаджинешева
- Ас. Катерина Кавалджиева
- Доц. Андрей Чорбанов, дб – БАН
- Гл. ас. Калина Николова-Ганева, дб – БАН
- Виолета Костадинова – БАН

Базова организация: Катедра по биология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящото изследване беше да се проследи дали и как системният лупус еритематозус (СЛЕ), експериментално предизвикан при мишки, влияе на качеството на тяхната овогенеза. За тази цел качеството на цитоскелетните и хроматиновите структури беше оценявано в овоцити, получени след хормонално стимулирана овулация от мишки с лупус и резултатите бяха сравнени с данни от здрави мишки. Същите експерименти бяха проведени с *in vitro* зрели овоцити, получени от лупусни и здрави мишки. Лупус беше индуциран чрез интра-перитонеално инжектиране на въглеродородното масло пристан в BALB/c мишки. Проточна цитометрия беше използвана за проследяване на CD25/CD69 активационните маркери. Нивата на цитокини, автоантитела и автоантитяло-продуциращи плазмоцити бяха установени чрез ELISA, ELISpot и protein array. Овулираните *in vivo* овоцити бяха добивани от яйцепроводите след хормонална стимулация. Овоцитите за *in vitro* зреене бяха получени от преовулаторни яйчникови фоликули. Хроматиновите, тубулиновите и актиновите структури в овоцитите бяха визуализирани съответно с Hoechst 33258, анти алфа-тубулиново антитяло и фалоидин, конюгиран с TRITC. Общият брой метафазни овоцити, получени от лупусните мишки беше по-малък в сравнение със здравите контроли. Степента на зрялост беше 9,8% за лупусните мишки, 12,7% за седем месечните контроли и 14,3% за младите контроли. За всеки овоцит бяха описани четири характеристики – морфологията на вретеното и актиновата шапка, кондензацията и подреждането на хромозомите. Бяха установени две значителни разлики. Първо, най-лошото качество на вретената в метафаза I при овулираните овоцити беше регистрирано при тези, получени от лупусни мишки (60% нормални вретена). За младите и по-възрастните контроли този процент беше съответно 86% и 81%. За вретената в метафаза II такава разлика не беше отчетена. Както за

овоцитите в метафаза I, така и за тези в метафаза II не беше наблюдавана разлика в процентите нормални актинови шапки, както и при подреждането и кондензацията на хромозомите. Второ, при всички *in vitro* зрели овоцити, получени от лупусни мишки, всички вретена в метафаза I и метафаза II, както и техните актинови шапки, бяха дезорганизирани.

Научни публикации и прояви:

- Живкова Р, М Маркова, В Хаджинешева и др. Фактори на репродуктивен неуспех при жени с lupus erythematosus. Акушерство и гинекология 2016;55(7):20-3.
- Костадинова В, Р Живкова, М Маркова и др. Автоимунитет и размножаване – уроци от животинските модели Седма работна среща „Репродуктивна медицина 2017 – противоречия и консенсус“ 28-30 април 2017, Плевен

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 26/2016 Асоциативен анализ на полиморфни маркери в или в близост до подбрани кандидат - гени, свързани с предразположението към артериална хипертония, при българи

Изследователски екип: Проф. Кирил Любенов Найденов, дх

- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Доц. Радка Кънева, дб
- Доц. Добрин Василев, дм
- Проф. Румяна Търновска-Къдрева, дм
- Ас. Теодора Янева-Сиракова, дм
- Рени Цвеова, дб,

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: В това проучване бяха включени 108 пациенти с хипертония и 112 популационни контроли. Вариантът rs9349379 беше генотипиран чрез използване на TaqMan метод (Applied Biosystems). Методът χ^2 беше приложен за оценка на асоциацията на генотипите и алелите на изследвания полиморфизъм с АХ чрез използване на PLINK 1.7. Всички пациенти в настоящото изследване бяха с труден антихипертензивен контрол. Средните първоначално измерени стойностите на артериалното налягане при пациентите са: 142.59 (\pm 18.81) ммHg за систоличното, 83.33 (\pm 10.37) ммHg за диастоличното и 58.84 (\pm 13.60) ммHg за пулсовото налягане. При сравняване на генотипните и алелните честоти на изследвания вариант при контроли и пациенти с първична АХ не се откри статистически значима разлика за асоциация на този генетичен маркер със заболяването в общата група и в групата на представителите от женски пол. При представителите от мъжки пол се наблюдава статистически значима разлика в разпределението на алелните честоти за изследвания полиморфизъм ($p=0.03$), което показва връзката му с предразположението към развитие на АХ при българи. Най – вероятно изследвания полиморфен вариант се асоциира с патогенезата на високото артериално налягане и тази зависимост е полово обусловена, но за да се потвърди това трябва да се увеличат както групата на болните, така и контролната група индивиди, които се анализират. Възможно е, поради изключително слабия ефект на изследвания

полиморфизъм по отношение на риска за първична АХ, изследваната извадка от пациенти и популационни контроли да не е достатъчно голяма и независимо от сравнително високите стойности на OR 2,206 [SE 0,3676 (1,073-4,534)], статистическа значимост да не се наблюдава или да е изключително слаба.

Научният отчет е приет с *ДОБРА* оценка по скалата на СМН.

Договор 27/2016 Анализ на соматични мутации при български пациенти с колоректални и стомашни карциноми чрез секвениране от ново поколение на панел от тумор-асоциирани гени

Изследователски екип: Проф. Георги Тодоров Тодоров, дм

- Доц. Костадин Ангелов, дм
- Мариела Василева, дм
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Доц. Радка Кънева, дб
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Д-р Даниела Дачева
- Румяна Додова, дб
- Гергана Станчева, дб
- Иван Попов, дб
- Костантин Гроздев, докторант
- Мохамед Хаят, докторант
- Д-р Георги Велев
- Гл. ас. Антон Койчев
- Ас. Николай Горанов
- Гл. Ас. Николай Кътев, дм
- Ас. Камен Пирински
- Гл. Ас. Венцел Младеновски
- Ас. Владимир Нейчев, дм
- Ас. Веселин Илинов
- Ас. Светослав Тошев, дм
- Ас. Манол Соколов, дм
- Ас. Свилен Маслянков, дм
- Ас. Васил Павлов, дм
- Ас. Илия Фидошев
- Ас. Петър Грибнев
- Проф. Светлана Христова, дм
- Ас. Александрина Влахова
- Ас. Тихомир Диков
- Ас. Диана Къосева

Базова организация: Катедра по хирургия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В настоящето проучване бяха включени туморни тъкани от 5 пациенти с колоректален и 5 със стомашен карцином, от които бе изолирана ДНК с помощта на кит. Бе проведен анализ на соматични мутации в панел от 48 тумор-асоциирани гени (TSACP)

чрез NGS на платформа MiSeq (Illumina). След оценка на суровите NGS данни, 2 от стомашните карциноми бяха изключени от изследването поради лошо покритие. Биоинформатичният анализ показва наличие на 12 патогенни (5 FS, 1 SG, 6 “missense”) от общо 27 варианти (44.4%) при колоректалните и 6 (3 FS, 3 “missense”) при стомашните тумори (50%, 6/12). При 7 от туморите бяха установени повече от един патогенни варианти. Най-често мутираният ген при колоректалните тумори е TP53, в който бяха установени 4 патогенни варианти (33%, 4/12). Един FS вариант в FGFR3 бе наблюдаван в двама пациенти. Мутации бяха установени и в гените: BRAF (p.Val600Glu), HNF1A, JAK3, SMAD4, APC, SMARCB1 и GNAS. Всека една от тях бе наблюдавана еднократно с честота 8,3% (1/12). Един и същ патогенен “hot-spot” вариант в гена PIK3CA и 2 в HNF1A, бяха наблюдавани и при тримата пациенти с карцином на стомаха. Установени бяха мутации и в други гени: един FS в EGFR и един “missense” вариант в KDR (при двама пациенти всеки) и един “missense” в TP53 (при един пациент). В заключение, соматичните мутации не само играят важна роля в туморогенезата на карциномите на стомаха и колона, но представляват надеждни молекулярни биомаркери за диагноза, прогноза, прецизно типизиране на туморите, и избор на терапия. Молекулното профилиране на туморите чрез NGS открива нови възможности за персонализирано лечение.

Научни публикации и прояви:

- Миткова А и др. Молекулно профилиране на колоректални стомашни карциноми в контекста на персонализираната медицина. Хирургия.
- Миткова А. Молекулно профилиране и таргетна терапия при солидни тумори” Симпозиум Чудомир Начев, БАН, 29.10.2016

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 29/2016 Молекулярни маркери с диагностична и прогностична стойност при лечение на солидни тумори в детска възраст

Изследователски екип: Доц. Радка Петрова Кънева, дб

- Доц. Маргарита Каменова, дм - УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”
- Д-р Олга Богданова - УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”
- Доц. Христо Шивачев, дм - УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов”
- Д-р Габриела Славкова - УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов”
- Иван Щърбанов, дм
- Доц. Добрин Константинов, дм
- Даниела Пенчева
- Гергана Станчева, дб
- Гл. ас. Олга Белчева, дб
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Актуалността на проблематиката се определя от високата честота на солидните тумори в детска възраст (ДСТ), големият им малигнен потенциал с висока смъртност и възможността да се повлияват от съвременното лечение при навременна и

точна диагноза. Голям брой хромозомни аберации, делеции, дупликации, имат отношение както към патогенезата на тумора на Уилмс (дупликации в 1q, делеции в 11p,16q и 22), невробластом (делеции в 1p,11q, дупликации 17q), и при останалите ДСТ. Независимо от наличието на често срещани големи промени като аберациите засягащи 17q, 1p, 3p и 11q, откритията на по-редки фокални геномни дисбаланси позволява доказването на ролята и на други важни гени в етиологията на ДСТ. MLPA анализът на големи геномни делеции/дупликации, проведен чрез MLPA китове P251, P252 и P253 показва най-голяма честота на аберациите в хромозомни рамена 1p, 1q, 2p, 4p и 9p. Анализ на преживяемостта показва наличие на значима негативна корелация при пациентите притежаващи дупликация в хромозомни участъци 1p ($p=0.011$), 1q ($p=1.05$), 3p ($p=0.011$) и 3q ($p<0.001$). Дупликациите в 2p се наблюдават по-често при пациентите с невробластом и не беше установена значима връзка с преживяемостта при пациентите с ДСТ ($p=0.628$). Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 30/2016 Генетично профилиране на ларингеален карцином чрез секвениране от ново поколение

Изследователски екип: Проф. Диана Петрова Попова, дмн

- Тодор Попов, дм
- Станислав Йорданов, дм
- Димитър Конов, дм
- Силва Гирагосян, докторант
- Гергана Станчева, дб
- Дарина Качакова, дб
- Калина Михова, докторант
- Доц. Радка Кънева, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн

Базова организация: Клиника по УНГ болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”

РЕЗУЛТАТИ: Туморната хетерогенност при рак на ларинкса е известна характеристика на тези тумори, но „driver“ соматични мутации и процесите, в които те участват все още на са напълно и мащабно проучени. Сравнени бяха резултати получени при анализ на пробите изолирани от свежа тъмorna тъкан при 14 пациента (892 варианта), като след филтруването на вариантите останаха 498 варианта. Установени бяха условията за анализ на материали от туморна, свежо замразена тъкан, без това да внася фалшиво позитивни и негативни резултата. В резултат от това беше проведен новогенерационен секвенционен анализ (NGS) на пациенти с рак на ларинкса, което показва наличие на патогенни мутации при изследваните от нас пациенти. Общия брой на откритите аотирани варианти при пациентите с ларингеален карцином наброява 498 и включва всички видове еднонуклеотидни замени (SNV) и малки инсерции и делеции. Общо 101 известни различни патогенни мутации бяха открити- 3 мутации водещи до стоп кодон (Stop-gained), 19 малки инсерции/делеции, 37 известни в базите данни и доказано патогенни миссенс мутации (missense); 14 3'UTR и 15'UTR варианти; 22 splice варианти, които имат роля при RNA splicing разпределени сред 30% от изследваните гени. Мутационните събития се откриват в гените KDR, TP53, HNF1A, FLT, GNAQ и KIT.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 31/2016 Определяне на глутаматен транспортер EAAT2 в мозък на плъхове с неонатална епилепсия и плъхове с фетален алкохол синдром

Изследователски екип: Проф. Надка Иванова Бояджиева, дмн

- Доц. Мирослава Варадинова, дм
- Д-р Радослав Клисуров
- Елена Стефанова, студент
- Росица Методиева

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Извършени са експериментални фармакологични изследвания върху новородени плъхчета, третирани пренатално с алкохол. Определяни са концентрациите на глутамат в кора на новородените животни, група от тези плъхчета са третирани с цефтриаксон, определяни са глутаматни концентрации в кора на мозък и са сравнени с тези на нетретирани с цефтриаксон. Резултатите демонстрират увеличени концентрации на глутамат в мозък на потомството на бременни плъхове, третирани с алкохол след 5-ия ден от оплождането до раждането. Цефтриаксон намалява увеличените концентрации на глутамат в мозъка на пренатално третирани с алкохол плъхчета. Във втора серия на експериментите е проучено влиянието на цефтриаксон върху концентрация на глутамат в мозък на новородени плъхчета с експериментална неонатална епилепсия. Използвана е каинова киселина (30 мг/кг), въвеждане е i.p. за предизвикване на гърчове и епилептичен статус. Цефтриаксон е прилаган преди инжектиране с каинова киселина. Резултатите показват увеличена концентрация на глутамат в мозък на плъхчета с експериментална неонатална епилепсия. Многократното приложение на цефтриаксон намалява нивата на глутамат в мозъка при инжектиране с каинова киселина. Анализът на резултатите показва ролята на глутамат като невротрансмитер на мозъка в пренаталната токсичност на алкохол и в механизмите на неонатална епилепсия. Резултатите демонстрират фармакологични ефекти на цефтриаксон върху глутамат и експериментална епилепсия. Допуска се роля на глутаматен глиален транспортер EAAT2 в механизмите на цефтриаксон.

Научни публикации и прояви:

- Бояджиева Н, Р Методиева. Фетален алкохол синдром и глутаматен транспортер EAAT2. Лекарска практика, 2017;3:9-12

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 32/2016 Сравнителни проучвания на ефектите на рисперидон и пробиотик върху молекулярни и поведенчески параметри на мъжки плъхове в експериментални модели на аутизъм и фетален алкохол синдром

Изследователски екип: Доц. Мирослава Георгиева Варадинова, дм

- Проф. Надка Бояджиева, дмн,
- Гл.ас. Георги Богданов, дм

- Калина Каменова
- Соня Иванова
- Росица Методиева
- Спас Керимов, студент
- Елена Стефанова, студент

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Създадени са експериментални модели на аутизъм и фетален алкохол синдром (ФАС) в поколението на женски плъхове, третирани по време на бременността съответно с валпроева киселина (600 мг/кг, i.p.) или 10%-ов воден разтвор на етанол p.o. Проследиха се ефектите от 21-дневно приложение на рисперидон (1 мг/кг p.o.) или пробиотик (1%, p.o.) върху метаболитни показатели (телесно тегло, нива на кръвна глюкоза на гладно), параметри на ноцицепция (време за реакция на топлинен болков стимул в tail-flick тест), показатели на обучение и памет (латентно време и брой грешки в shuttle-box тест), стойности на проинфламаторни цитокини (серумни нива на IL-1beta и IL-6) и концентрация на невротрофичен фактор BDNF в серум на опитните животни. Установиха се значителни различия в телесното тегло на плъхчета с модел на аутизъм в сравнение с контролните животни. В допълнение, след третиране с рисперидон или пробиотик беше отчетено повишаване на средното телесно тегло на плъхчетата както в контролните, така и в групите с аутизъм или ФАС. По-съществено повишение на този показател бе наблюдавано в групите, приемали пробиотик. Същевременно, в края на експеримента не се регистрираха абнормни нива на глюкоза при нито една от изследваните групи животни и не бяха отчетени съществени разлики по този показател между отделните групи. Плъхчетата с експериментален модел на аутизъм или ФАС демонстрираха понижен болков праг, но след третиране с пробиотик времето им за реакция в tail-flick не се различаваше съществено от това на контролните. При провеждане на shuttle-box тест латентното време на експерименталните животни с ФАС, третирани с пробиотик бе сравнимо с това на контролните животни. Освен това, най-съществено скъсяване на латентното време в 5-дневните обучителни сесии в shuttle-box се регистрира в групите с аутизъм, третирани с пробиотик и особено - с рисперидон. Данните от изследване на BDNF показват повишаване на стойностите му при плъхчета с модел на аутизъм, третирани с пробиотик. Взети заедно, нашите резултати допускат важна роля от приложението на рисперидон и/или пробиотик за подобряване на когнитивни параметри при пациенти с аутизъм и ФАС. В допълнение, нашите данни показват значимостта на микробиома, функцията на оста ГИТ-ЦНС и потенциалното благоприятно действие на пробиотиците в терапията на симптоми на аутизъм и други разстройства на невроналното развитие.

Научни публикации и прояви:

- Варадинова М, Стефанова Ж, Стефанова Т. Съвременна терапия на аутизъм. Лекарска Практика, 3, 2017.
- Varadinova M, Bogdanov G. Parameters of learning and memory of rats in experimental model of autism after treatment with risperidone or probiotic. Доклади на БАН, 2017.
- Varadinova M, Kamenova K, Voyadjieva N. Ефекти на рисперидон и пробиотик върху серумни нива на IL-1beta и IL-6 в експериментални модели на аутизъм и фетален алкохол синдром. Неврология и Психиатрия
- Варадинова М, Богданов Г. Експериментални модели на аутизъм и фетален алкохол синдром: изследване на параметри на обучение и памет. Сборник статии

от Юбилейни научни конференции по фармакология и клинична фармакология за млади учени. 2016: 124-8.

- Варадинова М., Богданов Г. Експериментални модели на аутизъм и фетален алкохолен синдром: изследване на параметри на обучение и памет. Юбилейна научна конференция ”Дръзновение и Младост във Фармакологията”, Цигов Чарк, 7-9 Окт, 2016.
- Stefanova T, Stefanova Z, Varadinova M. Role of risperidone and probiotic in active avoidance test of rats in experimental model of autism, XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, 2017, стр. 125
- Bogdanov G, Varadinova M. Effects of risperidone and probiotic in experimental model of autism: metabolic issues, XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, 2017, стр. 89.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 33/2016 Влияние на Pentoxifylline върху промените в кожата на хипотиреоидни плъхове

Изследователски екип: Доц. Жоржета Стоянова Бочева, дм

- Гл. ас. Георги Богданов, дм
- Доц. Лина Малинова, дм
- Калина Каменова

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: С настоящият проект чрез ELISA бяха изследвани нивата на цитокините TNF- α и IL-6 в кожа на хипотиреоидни плъхове, без и с третиране с Pentoxifylline в нарастващи дози от 25 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг за период от 7 дни. Беше установено понижение в измерените стойности на изследваните провъзпалителните цитокини, което би могло да се обясни със силно подтиснатия метаболизъм при PTU–индуцирания хипотиреоиден модел. Седемдневното прилагане само на 25 мг/кг Pentoxifylline при хипотиреоидните плъхове показва повишаване на TNF- α и IL-6, но под нивата им в кожата на здрави плъхове. При направените хистологични препарати установихме характерните за хипотиреоидизма микседематозни промени в дермата, без да се наблюдават промени в епидермиса. Хипотиреоидната кожа ясно показва ретракция на колагенните влакна от отложените между тях глюкозаминогликани, по-ясно демонстрирано при оцветяването по van Gieson. След прилагане на Pentoxifylline се наблюдава дозозависимо намаляване на дермалните отлагания от протеоглици, обективизирано чрез намаляване на ретракцията на колагеновите влакна и видимо нормализиране на хистологичната картина.

Научни публикации и прояви:

- Бочева Ж, Богданов Б. Имуномодулаторни ефекти на фосфодиестеразния инхибитор Pentoxifylline. Юбилейни научни конференции по фармакология и клинична фармакология за млади учени - Цигов чарк, 7-9 октомври 2016.
- Bocheva G, Bogdanov G, Malinova L. Anti-inflammatory effect of Pentoxiphylline on hypothyroid rat skin. Int workshop metabolic diseases – genetics, epigenetics and proteomics – Sofia, 16-20 May 2017.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 34/2016 Изследване антидепресивния ефект от комбинираното прилагане на escitalopram и физическа активност при експериментални модели на депресия

Изследователски екип: Гл. ас. Евгений Юриев Харитов, дм

- Доц. Весела Узунова-Райкова, дм
- Петър Ангелов, студент
- Георги Галев, студент
- Венелин Петров, студент
- Елена Ангелеска, студент

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящото проучване е оценка на антидепресивните и антиинфламаторните ефекти от самостоятелното и комбинирано прилагане на есциталопрам и т. нар. „въртящо се колело” в индуциран с липополизахарид (LPS) модел на депресия при плъхове, порода Вистар. За тази цел на 10-ти постнатален ден (PND 10), животните бяха третирани еднократно с LPS (50 µg/ kg, i.p.). След отбиването на новородените от майките на 21-ви постнатален ден, плъхчетата бяха третирани с есциталопрам (10 mg/ kg, per os) и имаха свободен достъп до „въртящо се колело”. След изтичането на този период, животните първо бяха подложени на forced swim test (FST) и sucrose preference test (SPT) за оценка на депресивни симптоми, а след това бяха декапитирани с цел измерване с ELISA-тест нивата на IL-1beta в хипокампусите им. Резултатите от настоящето проучване показаха, че комбинираното прилагане на есциталопрам и „въртящо се колело” води до сигнификантно най-изразен ефект върху показателите за депресивност в поведенческите тестове (FST и SPT), в сравнение със самостоятелното им прилагане. Особено важно е силното редуциране в нивата на проинфламаторният цитокин IL-1β в хипокампусите на експерименталните животни под влияние на комбинираното прилагане на двата подхода. Тези резултати дават основание да се твърди, че физическата активност и някои от съвременните антидепресанти (SSRI^s) действат синергично по отношение на депресивната симптоматика и в основата на това взаимодействие са техните идентични ефекти на редуциране нивата на невровъзпаление в ЦНС, което са свързва с депресивното разстройство. Това дава също основание за прилагането на физическата активност, като важен подход в лечението на терапевтично резистентната депресия.

Научни публикации и прояви:

- Харитов Е, Узунов И, Радева Й, и др. Невроимунни механизми в антидепресивните ефекти на физическата активност. Лекарска практика. 2016; 5: 20-29.
- Харитов Е, Радева Й, Узунов И, и др. Имуни механизми на психологичния стрес. Лекарска практика. 2016; 6: 17-24.
- Харитов Е, Кирков В, Киркова М, и др. Антидепресивни ефекти на физическата активност. Неврология и психиатрия. 2017
- Харитов Е, Босилкова Е, Радева Й, и др. Взаимодействие между есциталопрам и физическа активност при неонатален LPS-индуциран модел на депресия при плъхове. Неврология и психиатрия. 2017;48(2):3-15

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 35/2016 Потвърдителен анализ на потенциално патогенни варианти в гени свързани с Болест на Паркинсон, открити при секвениране от ново поколение

Изследователски екип: Доц. Албена Кирилова Йорданова, дб

- Чл.-кор. Проф. Лъчезар Трайков, дм, дмн
- Доц. Шима Мехрабиан-Спасова, дм
- Гл. ас. Мария Петрова, дм
- Доц. Маргарита Райчева, дм
- Калина Михова
- Даниела Пенчева
- Доц. Радка Кънева, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В настоящето изследване подбрахме най-добрите кандидат гени, получени след новогенерационен анализ на добре характеризирани група от пациенти с БП, за сегрегационен анализ и скрининг за мутациите в здрави контролни индивиди чрез директно секвениране по Сангер. Резултатите ни показват, че варианти с.632C>T, с.784A>G и с.1000G>A in *LRRK2*, с.845C>T in *MAPT* и с.581A>G, с.796G>C в *GRN* гените са редки беннигнени полиморфизми. Мутации с.260-262delCTG в *PARK7* и с.1231G>A, в *PINK1* са патогенни. Нашите открития допринасят за по-доброто разбиране на молекулната основа на болестта на Паркинсон и може да бъде от полза при поставяне на диагноза на пациентите и генетичното консултиране на семействата в България. Откриването на мутации в гените, свързани с болестта на Паркинсон, ще изясни тяхната роля в прогресията на заболяването. Това ще увеличи възможностите за ранна диагностика и изясняване на фенотип-генотипните корелации, спомагащи за изясняването на функцията на засегнатите белтъци и връзката им с патологията на заболяването. Нашите открития допринасят за по-доброто разбиране на молекулните основи на болестта на Паркинсон и имат отношение към диагностиката на пациентите.

Научни публикации и прояви:

- Mihova K, Verstraeten A, Theuns J, et al. First systematic genetic study of Bulgarian patients with Parkinson disease. 12th Balkan Congress of Human Genetics, 8-10 Sep 2017, Plovdiv, Bulgaria, A 64
- Михова К. Генетични маркери при болест на Паркинсон, Симпозиум Чудомир Начев, БАН, 3 декември 2016, София, стр. 14

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 36/2016 Продукцията на флавоноиди в ин витро култури на *Astragalus vesicarius* L. и тяхната потенциална антиоксидантна активност

Изследователски екип: Проф. Илиана Илиева Йонкова, дфн

- Христо Василев, докторант
- Павлинка Попова
- Боряна Узунова, студент

Базова организация: Катедра по фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: За първи път беше изследван ефектът на някои регулатори на растежа на растенията и тяхната комбинация върху производството на биомаса и флавоноиди в суспензионни култури на *A. vesicarius* L. По-високото образуване на флавоноиди корелира с добрия растеж на клетките. Съдържанието на флавоноиди се намалява при по-високи концентрации на ауксини. Добавянето на цитокинин стимулира както пролиферацията, така и производството на флавоноиди. Кинетин е благоприятен за производството на флавоноиди в клетки от *A. vesicarius* L. През последните години все повече доказателства потвърждават ролята на свободните радикали за приноса на свързаните с тях стареене и дегенеративни заболявания. Потенциалната антиоксидантна активност се оценява чрез установения метод за радикал-свързваща активност, като се използва 1,1-дифенил-2-пирилхидразил (DPPH) радикал и активността се определя чрез използване на стандартни криви от референтни вещества: аскорбинова киселина и хиперозид. Разнообразието на флавоноидния състав в екстракти от суспензионните култури от *A. vesicarius* определя радикал-свързващата им активност. Най-висока активност е показана от суспензии, култивирани върху среда, съдържащи 2 mg / L кветин и 0,3 mg / L ауксин при светлинни условия, равно на 1217,58 µg еквивалент аскорбинова киселина и 890,82 µg еквивалент на хиперозид. Присъствието на ауксини и тъмнина потиска продукцията на молекули с потенциална радикал-свързваща активност.

Научни публикации и прояви:

- Vasilev H, P Popova, I Ionkova. Radical-Scavenging Potential of Bioflavonoids from in vitro Cultures of *Astragalus vesicarius* L. 9 CMAPSEEC, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria, A126

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 38/2016 Включване на бромпроизводни хидразони в полимерни частици и ин витро оценка на антиоксидантната им активност

Изследователски екип: Проф. Красимира Павлова Йончева

- Проф. Николай Ламбов, дф
- Гл. ас. Боряна Николова-Младенова
- Доц. Вера Хаджимитова
- Ас. Надя Христова-Авакумова

Базова организация: Катедра по технология на лекарствените средства с биофармация, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Три бромпроизводни хидразони бяха използвани като моделни вещества - 5-бромосалицилалдехидбензоилхидразон, 5-бромосалицилалдехид-4-хидроксибензоилхидразон и 5-бромосалицилалдехид-изоникотиноилхидразон. Бромпроизводните хидразони бяха натоварени в наночастици изградени от хитозан и алгинат или от съполимер на поли(ε-капролактон) и полиетиленгликол метилиран етер. От двата типа наночастици, хитозан-алгинатните се характеризираха с по-ниска полидисперсност, което ги очерта като подходящ носител за подбраните активни вещества. Профилите на освобождаване показаха, че чрез включването на хидразоните в наночастиците се постига забавяне на скоростта на освобождаване. Инкубирането на

бромпроизводните хидразони с ABTS радикал регистрира висока антиоксидантна активност на веществата. Установено бе, че антиоксидантната им активност обаче намалява с повече от 5 % при 5-дневно съхранение на разтворите. След включването на бромпроизводните хидразони в хитозан-алгинатните наночастици бе наблюдавано запазване на тяхната антиоксидантна активност в продължение на 30 дена, докато спадът на активността при неенкапсулираните хидразони бе над 40 %. В заключение, разработената стратегия за включване на бромпроизводните хидразони в хитозан-алгинатни наночастици, оказва протективен ефект по отношение на антиоксидантната активност на енкапсулираните хидразони.

Научни публикации и прояви:

- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Yoncheva K, et al. Novel hydrazones – antioxidant potential and stabilization via polysaccharide particles. J Physics 2017;780(1):012004.
- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Yoncheva K, et al. Novel hydrazones – antioxidant potential and stabilization via polysaccharide particles. INERA Workshop, Membrane and Liquid Crystal Nanostructures (MELINA-2016), Varna, 3-6 Sep 2016.
- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Hadjimitova V, et al. Antioxidant study of chitosan-alginate particles containing new designed bromo-salicylaldehyde aroylhydrazones. VIth Congress of Pharmacy, Sandanski, 13-16 Oct 2016, 90-91.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 40/2016 Мултифакторен анализ на екстракция, комбиниран с течно-хроматографско - мас спектрометрично определяне на биологичноактивни вещества в *Portulaca oleracea* L. (тученица)

Изследователски екип: Гл. ас. Димитрина Живкова Желева-Димитрова, дф

- Доц. Ренета Гевренова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб
- Проф. Ирини Дойчинова, дхн
- Гл. ас. Юлиан Войников, дф
- Доц. Параскев Недялков, дф
- Биляна Добрева, студент
- Марио Борисов, студент

Базова организация: Катедра по Фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) е добре известно хранително и лечебно растение. В Традиционната Китайска Медицина тученицата е наречена "зеленчук за дълъг живот". В настоящото проучване са разработени бърз и надежден метод за ултразвукова екстракция, както и метод за течна хроматография (LC), съчетан с масспектрометър quadrupole-orbitrap, за определяне на 12 фенолни киселини и 2 флавонолни гликозиди в растителен материал от 12 различни находища. Екстракцията, подпомагана с ултразвук, оптимизирана с ортогонален дизайн, се извършва при 50 ° C 2 x 15 минути с метанол-вода (50:50 об/об), а съотношението разтворител към дрога е 40: 1. Общото съдържание на полифеноли и сапонини, както и антиоксидантната активност (DPPH) са използвани като критерии за избор на оптимално състояние на екстракция.

Анализираните фенолни киселини и флавоноиди се елуират за 10 мин върху колона Kromasil EternityXT C18 (1.8 μ m, 2.1 \times 100 mm), като се използва ацетонитрил и разтвор на мравчена киселина-вода като подвижен с дебит при скорост на потока 0.3 ml / min. Всички калибрационни прави показват добра линейност ($r > 0.996$) в рамките на тестваните диапазони. Фелуловата киселина е основното съединение, чието съдържание достига до 315.39 ± 2.349 ng/g сухо тегло. Най-високо съдържание на гентизинова киселина е открито в проба от Гърция (35.590 ± 0.419 ng/gdw). По отношение на флавоноловите глюкозиди, рутинът присъства в най-високото количество (40.135 ± 0.264 ng/g dw) в българска проба. Данните бяха анализирани чрез основен анализ на компонентите (PCA). Графиката на баловите групира по-голямата част от българските проби в един добре дефиниран клъстер. Две български проби показват най-високите комбинирани нива на изследваните съединения. Графиката на приносите определя гентизинова и кафеена киселини като съединения с най-висок принос в PC1, докато хлорогенова и неохлорогенова киселини доминират в PC2. В заключение разработеният LC-HRMS метод позволява едновременното определяне на общи антиоксиданти в относително ниски нива на концентрация, както и анализ на пръстовите отпечатъци в тученицата.

Научни публикации и прояви:

- Voynikov Y, Nedialkov P, Gevrenova R, et al. Rapid determination of antioxidant compounds in *Portulaca oleracea* L. (purslane) by the optimal ultrasound extraction combined with liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). First Int Conference on Bio-antioxidants 25-29 Jun 2017, Sofia, Bulgaria

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 41/2016 *Gypsophila glomerata* Pall ex M.B. (Caryophyllaceae): потенциален източник на биологичноактивни вещества

Изследователски екип: Доц. Ренета Славова Гевренова, дф

- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб
- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Юлиан Войников, дф
- Биляна Добрева, студент
- Марио Борисов, студент

Базова организация: Катедра по Фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: В настоящото проучване е установена много добра кълняемост на семената от *Gypsophila glomerata* Pall ex M. B. на 3-я месец след събирането им (72%), но покълнеците са уязвими и растенията не оцеляват в ранния си етап на развитие. Изследвани са сапонини от групата на 3,28 бисдезмосидите на глюкуронидите на тритерпеновите карбоксилни киселини (GOTCAB) във водно-етанолен екстракт от корени на *G. glomerata* (GGR) чрез течна хроматография – високоразделителна мас спектрометрия (LC-HRMS). Проведен е скрининг на метанолния екстракт от надземните части (GGA) за фенолни киселини и С-гликозиди. Въз основа на прецизните мас спектрометрични измервания, фрагментните MS/MS спектри и сравнение с референтни сапонини в GGR са идентифицирани или е дадена предварителна структура за 41

GOTCAB, от които 12 двойки изобари/изомери и 17 нови сапонини. Предложен е пътът на фрагментация на 3 групи GOTCAB. Група I са главно производни на гипсогенина с две въглеродородни вериги: разклонен тризахарид в C-3 и три- до хексазахарид в C-28 на агликона. Установени са сапонини с ацетилирана (група II) или сулфатирана (група III) C-28 верига, както и GOTCAB на квилая и олеанолова киселина. Повечето от *G. glomerata* сапонини образуват двойки изомери. Седем фенолни киселини и С-глюкозилфлавононите хомоорентин, ориентин, витексин, изовитексин и С,О-диглюкозида сапонарин са доказани в GGA чрез LC-HRMS. Определено е съдържанието на два характерни за *Gypsophila* просапонини в GGR чрез твърдо-фазова екстракция – високо-ефективна течна хроматография (SPE-HPLC): гипсогенин 3-О-глюкуронид (7.4079 ± 0.0723 mg/g сухо тегло) и квилая киселина 3-О-глюкуронид (4.4593 ± 0.1207 mg/g). Общите феноли в GGA са 20.59 mgGAE/g екстракт. Изолирани са два GOTCAB сапонини чрез полу-препаративна ВЕТХ. За първи път в *G. glomerata* са анализирани тритерпенови сапонини и фенолни съединения. LC-ESI/HRMS (Orbitrap) стратегията за структурно охарактеризиране на *Gypsophila* GOTCAB сапонини и С-флавоноиди е приложима за идентифицирането им в растителни екстракти.

Научни публикации и прояви:

- Gevrenova R, Bardarov K, Voynikov Y, et al. Preliminary study on sulfated GOTCAB saponins from two Bulgarian *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae) species. C R Acad Bulg Sci. 2017;70(11):1539-48.
- Gevrenova R, Bardarov K, Voynikov Y, et al. GOTCAB saponin profiles of two Bulgarian *Gypsophila* L. species (Caryophyllaceae) by LC-ESI/MS. 6th Int Congress of Aromatic and Medicinal Plants. Coimbra, Portugal. 29.05.-01.06.2016. A172

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 44/2016 Geigeria alata: източник на кафеилхинни киселини с потенциален антиоксидантен, антихипертензивен и антидиабетен ефект

Изследователски екип: Доц. Румяна Любомирова Симеонова, дф

- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Доц. Ренета Гевренова, дф
- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова, дб
- Александра Касабова, докторант

Базова организация: Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящата разработка е да се изолира и идентифицира основния вторичен метаболит дикафеилхинна киселина (ДКХК) в корени от Африкански вид *Geigeria alata*, Asteraceae и да се проучи за антиоксидантна, антихипертензивна и антидиабетна активност върху Streptozotocin - индуциран диабет при спонтанно хипертензивни плъхове (SHR) - експериментален модел на есенциална хипертония. Диабетът се индуцира чрез прилагане на стрептозотоцин (40 mg / kg, i.p.). Биохимичните

параметри: редуциран глутатион (GSH), малондиалдехид (MDA), както и активността на антиоксидантните ензими глутатионпероксидаза (GPx), глутатионредуктаза и глутатион-S-трансфераза (GST) са измерени спектрофотометрично в чернодробен хомогенат от експерименталните животни. Периодично е проследявано артериалното налягане чрез неинвазивен tail-cuff инструментален метод, както и гликемичния статус на животните чрез експресен кръвно-захарен тест „Multicare“. ДКХК намалява слабо артериалната хипертония (АХ) с 19% (p <0,05) при контролни SHR, но не променя налягането при стрептозотоцин-индуцираната диабетна група SHR (SHR-D). Нивото на кръвната захар се повишава със 78% (p <0,05) и със 171% (p <0,05) съответно при диабет-индуцираните NTR и SHR. При контролни SHR количеството MDA е със 197% (p <0,05) по-високо, а нивата на GSH са с 24% (p <0,05) по-ниски в сравнение с нивата при контролни NTR. Значително намаляване на активността на GPx, GR и GST се измерва в черния дроб на всички диабетни плъхове, NTR и SHR. Триседмичното орално прилагане на ДКХК подобрява биохимичните чернодробни параметри и при двата вида диабетни животни, но ефектите са по-слабо изразени при SHR с индуциран диабет. Получените резултати ясно показват, че диабетът и хипертонията в комбинация са по-трудни за модулиране с БАВ от природен произход - ДКХК.

Научни публикации и прояви:

- Simeonova R, Kondeva-Burdina M, Zheleva-Dimitrova D, et al. Antidiabetic, antioxidant and antihypertensive effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid from *Geigeria alata* (Dc) Oliv. & Hiern. on streptozotocin-induced diabetic normotensive and hypertensive rats. 52-th EUROTOX congres, Seville, Spain, 4-7 Sep, 2016, S293
- Vitcheva V, Simeonova R, Kondev-Burdina M, et al. “*In vitro/in vivo* evaluation of the antioxidant potential of Dicaffeoylquinic acid isolated from *Geigeria alata*” First Int Conference on Bio-antioxidants, BAS 25-29 Jun 2017, Sofia, Bulgaria.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 45/2016 Фитохимично и фармакологично проучване на флавоноидния състав на *Astragalus spruneri*

Изследователски екип: Проф. Илина Николаева Кръстева, дф

- Доц. Румяна Симеонова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Гл. ас. Петранка Здравева, дф
- Ас. Александър Шкондров, дф

Базова организация: Катедра по Фармакогнозия и Катедра по Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: При фитохимично изследване на надземните части на *Astragalus spruneri* Voiss. са изолирани три редки флавоноида: изобиокверцетин, баймазид и кемпферол-3-O- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-[6-O-(3-хидрокси-3-метилглутарил)- β -D-галактопиранозид]. Структурата на веществата е определена чрез киселинна хидролиза, 1D и 2D NMR експерименти и HRESIMS. В допълнение чрез BETX са идентифицирани четири флавоноида като: рутин, хиперозид, кверцитрин и кемпферол-7-рамнозид. Полученият пречистен екстракт от *A. spruneri* и изолираните от него флавоноиди, приложени

самостоятелно, при *in vitro/in vivo* експерименти не проявяват статистически значим хепатотоксичен ефект. При *in vitro* модели, с различен механизъм на хепатотоксичност (метаболично биоактивиране и оксидативен стрес), те проявяват добре изразен статистически значим цитопротективен и антиоксидантен ефекти. Екстрактът проявява по-изявена активност от чистите вещества, съизмерима с тези на силибина. При *in vivo* опитите за екстракта е доказан и добър хепатопротективен и антиоксидантен ефекти, сравнени с тези на силимарина. Резултатите са потвърдени и чрез патохистологично изследване. Екстрактът, както и изолираните от него вещества, са перспективни за по-нататъшни изследвания като възможни хепатопротектори и антиоксиданти.

Научни публикации и прояви:

- Шкондров А. Дисертация: Фитохимично проучване на видове от род *Astragalus* L. София, 2017.
- Shkondrov A, Kondeva-Burdina M, Simeonova R, et al. Phytochemical investigation of *Astragalus* species occurring in Bulgaria. Шести конгрес по фармация, Сандански. 13-16.10.2016. А41.
- Simeonova R, Vitcheva V, Kondeva-Burdina M, et al. Evaluation of the antioxidant potential of defatted extract from *Astragalus spruneri* (Fabaceae) in spontaneously hypertensive rats. First Int Conference of Bio-Antioxidants. 25-29.06.2017

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 46/2016 Антиоксидантна и цитопротективна активност на биологично активни лантанидни комплекси

Изследователски екип: Проф. Ирена Петкова Костова, дх, дхн

- Стефан Балкански, дх
- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Александра Касабова, докторант

Базова организация: Катедра „Химия“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Синтезирани са нови Ga(III), In(III) и Ln(III) комплексни съединения с биологично активни лиганди. Веществата са охарактеризирани чрез съвременни физикохимични, аналитични и спектрални методи, в т.ч. елементен анализ, ЯМР, ИЧ- и Раман-спектрални анализи. Извършен е за първи път задълбочен вибрационен анализ на изследваните лиганди и техните Ga(III), In(III) и лантанидни(III) комплекси, така че идентификацията на характеристичните ИЧ- и Раман-ивици на функционалните групи да се използва като база-данни за понататъшно приложение при анализа на подобни съединения. Подробният вибрационен анализ на НОА, НАОА, на М(III)-ОА и М(III)-АОА системите доказва, че свързването в комплексите е бидентатно чрез карбоксилните кислородни атоми. ЯМР спектрите на лигандите и на комплексите потвърдиха комплексобразуването. Сравнителният спектрален анализ на новополучените съединения позволи прогнозиране на координационното поведение на избраните лиганди, както и типа на връзките метал-лиганд в Ga(III), In(III) и лантанидните(III) комплекси. Върху изолирани чернодробни микросоми, всички комплекси, приложени самостоятелно (в концентрация 100 µM) не проявяват про-оксидантен ефект, а в условията на не-ензимна

липидна пероксидация проявяват антиоксидантен ефект, като най-изявен е при PrAOA, HoAOA, ErAOA, InAOA и GaAOA. Върху изолираните плъши хепатоцити с най-слаб цитотоксичен ефект са PrAOA, HoAOA, ErAOA, InAOA и GaAOA, а при модел на *терт*-бутил хидропероксид-индуциран оксидативен стрес, тези комплекси проявяват цитопротективен и антиоксидантен ефекти. С най-изявени ефекти при този модел са InAOA и GaAOA. Ефектът им е съизмерим с този на кверцетин. За комплексите InAOA и GaAOA са установени и невропротективен и антиоксидантен ефекти при модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес върху изолирани плъши синаптозоми.

Научни публикации и прояви:

- Kostova I, Atanasova V, Kondeva-Burdina MS, et al. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of newly synthesized Ho(III) complex. *Biointerface Res Appl Chem*. 2016;6(5):1541-9.
- Kostova I, Valcheva-Traykova M, Balkansky S. Vibrational characterization and prooxidant activity of newly synthesized dysprosium(III) complex. *J Iran Chem Soc*. 2016;13(5):891-902.
- Kostova I, Atanasova V, Kondeva-Burdina MS, et al. Vibrational Characterization and Antioxidant Activity of Newly Synthesized Gallium(III) Complex. *Peertechz J Med Chem Res*. 2016;2(1):1-8.
- Kostova I, Atanasov P. Antioxidant Properties of Pyrimidine and Uracil Derivatives. *Curr Org Chem*. 2017;21(20):2096-108.
- Kostova I. Lanthanide(III) Complexes with Biologically Active Ligands. 16-a editie a Congresului National de Farmacie (CNFR2016), Bucuresti, Romania, Sept 28-Oct 1, 2016; p. 19.
- Kostova I. Application of Density Functional Approximation and Vibrational Spectroscopy in Coordination Chemistry of Lanthanide(III) Complexes. 6th Int Conference on Perspectives in Vibrational Spectroscopy (ICOPVS 2016), Lucknow, India, 5-8 Nov, 2016; IL35, p. 67.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 47/2016 Оценка на химическата стабилност и биологична активност на антимикробни пептиди тип *alfa-defensin 2*

Изследователски екип: Доц. Иванка Петкова Пенчева-Ел Тиби, дф

- Доц. Ваня Масларска, дф
- Чл.-кор. Проф. Христо Найденски, двмн – БАН
- Гл.ас. Мая Захаријева, дф - БАН
- Мери Америкова, докторант

Базова организация: Катедра „Фармацевтична химия“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: През последните години усилията на учените са насочени към изследване на потенциала за приложение на АМП тип алфа-дефензини 2 в клиничната практика. Работи се усилено върху ваксини, фармацевтични системи за доставяне на пептиди със защитена от разрушаване структура и устройства за идентификация на бактерии с АМП. За целта бе разработен ВЕТХ метод за идентичност и количествено определяне на алфа-дефензини 2 в среди с различни химични модификатори. Методът е валидиран съгласно

изискванията на Европейска Фармакопея и ИСН. Оптимизирани са аналитичните параметри селективност, възпроизводимост, предел на откриваемост, предел на количествено определяне и линейност. Определена е стабилността на пептида при рН 2, 7.4 и 9 рН единици в зависимост от фактора време. Паралелно е определена антимикробната активност чрез определяне на минималната инхибираща концентрация (МИК) на тестваните разтвори на дефензини върху патогенни микроорганизми и респираторната активност на бактериите с колориметричен тест.

Научни публикации и прояви:

- Америкова М. Дипломна работа „Оценка на химическата стабилност и биологична активност на антимикробни пептиди тип alfa-defensin 2“, 2016
- Америкова М. „Оценка на химическата стабилност и биологична активност на антимикробни пептиди тип alfa-defensin 2“, Студентска Научна Сесия, Фармацевтичен факултет, 2016, стр. 47.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 48/2016 Изследване на НСПВс за in vitro антитуморна/антипролиферативна активност в експериментални моделни системи

Изследователски екип: Проф. Николай Дамянов Данчев, дм

- Ас. Любомир Маринов
- Гл. ас. Юлиан Войников, дф
- Доц. Стоян Шишков, дб - СУ
- Гл. ас. Антон Хинков, дб - СУ
- Гл. ас. Калина Шишкова, дб - СУ
- Петя Ангелова, докторант
- Проф. Ренета Тошкова, дмн - БАН
- Ас. Ани Георгиева, дб - БАН

Базова организация: Катедра „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Способността на туморните клетки да проникнат и разрушат базалните мембрани и прилежащите тъкани играе централна роля в комплексния многоетапен процес на метастазирание. Изследваните НСПВс показват различна по степен антитуморна /антипролиферативна активност към използваните 3 човешки туморни линии - цервикален аденокарцином (HeLa), аденокарцином на дебело черво (HT-29) и рак на гърдата (MCF-7). По миграционна активност установена чрез прилагане на Scratch Wound healing assay изследваните човешки туморни клетки могат да бъдат подредени в низходящ ред – с най-висока миграционна активност HeLa, средна - MCF-7 и ниска - HT-29. Клетъчната миграция е резултат от динамични взаимодействия между клетката, извънклетъчния матрикс (ЕСМ) и цитоскелета. Най-чувствителни към НСПВс са MCF-7 клетки, последвани от HeLa и HT-29. Най-ефективни върху миграцията на човешки туморни клетки е Декскетопрофен (370 µg/ml) и диклофенак (90 µg/ml), които действат и при трите човешки туморни линии. Третирането на HeLa, HT-29 и MCF-7 туморни клетки с НСПВс води до различни по степен нарушения в морфологията и смърт на клетките. Тежки морфологични белези на ранна или късна апоптоза се наблюдават при висок процент от

третираните с НСПВс препарати. Прави впечатление наличието на ентози след третиране с мелоксикам при MCF-7 туморни клетки. Най-силно изразени белези на апоптоза – кондензиран хроматин, ядрена фрагментация и образуване на апоптотични тела се наблюдават в клетките третирани с диклофенак, мелоксикам и метамизол. Необходими са последващи подробни проучвания на различни представители на конвенционални НСПВс относно антитуморните им ефекти при разширен спектър на човешки туморни клетъчни линии с цел по-прецизно установяване на техните потенциални антитуморни ефекти. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 49/2016 Синтез и охарактеризиране на нови метокси-производни на салицилалдехидбензоил хидразона и техни Ga(III) метални комплекси с потенциална биологична активност

Изследователски екип: Проф. Георги Цветанов Момеков, дф

- Проф. Александър Златков, дф
- Проф. Дарвин Иванов, дф
- Гл. ас. Боряна Николова-Младенова, дх
- Доц. Мая Георгиева, дф
- Доц. Лили Пейкова, дф
- Габриела Митев, студент

Базова организация: Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Синтезирани са 8 нови съединения – 5 нови 5-метоксипроизводни салицилалдехид бензоилхидразони и 3 нови Ga (III) комплекси с хидразоните. 5-метоксипроизводните хидразони са получени чрез кондензация в етанол на 5-метоксисалицилалдехид с 5 хидразида – бензхидразид, 4-хидроксибензхидразид, 4-пиридинкарбохидразид, 4-метил-бензхидразид и 4-хлоробензхидразид. Комплексите са синтезирани чрез взаимодействие на $Ga(NO_3)_3 \cdot H_2O$ с лигандите в молно отношение 1:2. Съединенията са охарактеризирани чрез елементарен, термогравиметричен и маспектрален анализ, ИЧ- и ЯМР-спектроскопия. Определени са брутните формули и структурата на 5-метоксизаместените хидразони. Строежът и химичните връзки на комплексите са определени чрез сравнение на спектрите им със спектрите на лигандите. Предложена е следната обща формула $[Ga(L-H)_2]NO_3$. Установено е, че 5-метокси-производните хидразони се проявяват като тридентатни лиганди при координация с Ga(III) метални йони. Комплексите са моноядрени, като Ga (III) йоните са свързани с два лиганда чрез кислородния атом от депротонираната алдехидна хидроксилна група, азотния атом от азометиновата група и кислородния атом от amidната група. Проведена е геометрична оптимизация на някои от 5-метоксидхидразоните и Ga (III) комплекси посредством теорията на функционала на плътността (DFT) чрез метода B3LYP/6-31+G (d,p). Изчислените дължини на връзките на хидразоните се доближават до експериментално определените за салицилалдехидбензоилхидразона. Стойностите на изчислените двустенни ъгли показват, че алдехидното и хидразидното ароматни ядра не лежат в една равнина и като цяло молекулата на хидразоните не е планарна. 5-метоксипроизводни хидразони са изследвани с „Правилото на Липински”, за да се оцени фармакокинетичното

им поведение и лекарственото им подобие. Установено е, че всички хидразони имат подходяща липофилност и потенциално добра пропускливост през клетъчните мембрани. 5-метоксихидразоните са проучени за цитотоксична активност върху спектър от 5 човешки туморни и 1 нетуморна клетъчни линии с помощта на МТТ тест. Веществата показват концентрационно-зависима цитотоксична активност при всички изследвани клетъчни линии. Определените стойности на IC_{50} са по-ниски от тези на референтните цитостатици cisplatin и melphalan. Цитотоксична активност на Ga(III) комплекси върху някои от клетъчните линии е по-изразена от тази на изходните хидразони.

Научни публикации и прояви:

- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D, et al. Design and drug-like properties of new 5-methoxysalicylaldehyde based hydrazones with anti-breast cancer activity. J Appl Biomed, 2017;15(3):233-40
- Nikolova-Mladenova B, Angelova S, Ivanov D, et al. Synthesis and Structural Study of Ga(III) complexes with 3-, 4- and 5-methoxy Substituted Salicylaldehyde Benzoylhydrazones. Zbornik referatov Slovenski kemijski dnevi 2016
- Nikolova-Mladenova BI, Peikova LP, Georgieva MB, et al. Application of a RP-HPLC method for determination of chemical and physiological stability of two newly synthesized methoxy-benzoylhydrazone derivatives. Bulg Chem Commun, 2017;49(spec. issue D):153-8.
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D. Design and drug-like properties of new 5-methoxysalicylaldehyde based hydrazones with anti-breast cancer activity, 8th Central Eur Conference "Chemistry Towards Biology", Brno, Czech Republic, 28 Aug–1 Sep 2016, p 133
- Nikolova-Mladenova B, Angelova S, Ivanov D, et al. Synthesis and Structural Study of Ga(III) complexes with 3-, 4- and 5-methoxy Substituted Salicylaldehyde Benzoylhydrazones. Slovenski kemijski dnevi 2016, Portorož, Slovenia, 28–30 Sep 2016, p 167
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D. Gallium(III) complexes with bioactive ligands 5-methoxysalicylaldehyde benzoylhydrazone and 5-methoxysalicylaldehyde isonicotinoylhydrazone. 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Mitev G, et al. Synthesis, Spectral Characterization and Cytotoxic Activity of New 5-Methoxy-Derivatives of Salicylaldehyde Benzoylhydrazone. 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016
- Peikova L, Nikolova-Mladenova B, Georgieva M. Modification and validation of RP-HPLC method for stability determination of new benzoylhydrazone at close to physiological conditions. 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016, p 136
- Митев Г, Николова-Младенова Б. Синтез и охарактеризиране на 5-метокси-салицилалдехид изоникотиноилхидразон. Студентска научна сесия, Фармацевтичен факултет, София, България, 3 декември 2016, p 50

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 50/2016 Проучване на възможностите за приготвяне на лекарствени форми с изменено освобождаване с теофилин чрез едностепенна и многостепенна екструзия

Изследователски екип: Проф. Милен Венциславов Димитров, доктор

- Теодора Попова

Базова организация: Катедра „Технология на лекарствените средства с биофармация“ ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Събрани и анализирани са литературни данни за приготвяне и охарактеризиране на лекарстводоставящи системи с теофилин с изменено освобождаване с потенциална приложимост в терапията на бронхиална астма и ХОББ. Разработени и технологично и биофармацевтично охарактеризирани са лекарствени форми с теофилин приготвени след едностепенна и многостепенна екструзия, посредством директно таблетирание, както и по метода на обвиване чрез пресоване. Методът на приготвяне на системите оказва значимо влияние върху скоростта и степента на освобождаване на теофилин. При системите приготвени посредством екструзия се наблюдава значимо понижаване в скоростта и степента на освобождаване на теофилин, в сравнение със системите приготвени чрез обвиване чрез пресоване. При всички изследвани системи освобождаването на теофилин от системи приготвени с ХПМЦ протича значимо по-забавено, в сравнение с такива приготвени с КМЦ-натрий, а при системите приготвени с ХПМЦ с различна молекулна маса, с увеличаване на молекулната маса на ХПМЦ, освобождаването на активното вещество се забавя. Методът на екструзия също оказва значимо влияние върху степента и скоростта на освобождаване на теофилин; налице е забавяне на освобождаването в посока от едно към многостепенна екструзия. Най-благоприятни от хронофармацевтична гледна точка се явяват таблетки, получени след едно- и многостепенна екструзия. Приети вечер тези таблетки ще освобождават минимално количество теофилин, в първите няколко часа, с пик на освобождаване след 5-тия час, което е в съответствие с хронофармацевтичните изисквания на астмата.

Научни публикации и прояви:

- Popova T, Petkova V, Dimitrov M. Comparison of single- and multi-stage extrusion versus press-coating technique in formulation of modified-release tablets with theophylline. WJPPS. 2017; 6(6): 01-18
- Popova T, M Dimitrov, N Lambov. Ethanol as potential tool for extending the release rate of theophylline from ethylcellulose containing-pellets, prepared by extrusion/spheronization, 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, UK, 4-7 Apr, 2016

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 51/2016 Платинови комплекси със смесени аминокислотни лиганди. Дизайн, синтез, спектрално охарактеризиране, теоретично предсказване и фармакологично изследване

Изследователски екип: Доц. Адриана Георгиева Бакалова, дх

- Проф. Спиро Константинов, дм
- Гл. ас. Емилия Чернева, дх

- Яница Русенова, студент
- Петър Арнаудов, студент
- Ивелина Железова, докторант
- Теодора Атанасова

Базова организация: Катедра по химия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: На база на литературни данни са подбрани две органични съединения за синтезиране и изследване на нови комплекси на Pt(II) и Pt(IV). С помощта на правилото на Липински е оценено лекарственото подобие на няколко органични съединения (включително и тези, предмет на настоящето изследване) и важните за фармакокинетиката им в човешкото тяло свойства. Органичните съединения - 3-амино-5-метил-5-фенилхидантоин и 3'-амино-4-тио-1H-тетрахидропиранспиро-5'-хидантоин са използвани като носещи лиганди за синтез на четири нови комплекса на Pt(II) и Pt(IV). Комплексите на Pt(II) са с обща формула $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{LCl}_2]$, а тези на Pt(IV) - $cis,cis,trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{LCI}_2(\text{OH})_2]$, където L е съответното аминохидантоиново или аминоспирохидантоиново производно. Новосинтезираните съединения са изучени чрез съвременни физико-химични методи за анализ – елементен анализ, ИЧ и ЯМР спектрални анализи. За теоретично предсказване на структурите им е използван DFT метод на високи базисни нива. Определени са някои дължини на връзките, енергии и ъгли. Предложени са най-вероятните химични формули на съединенията. Всички новосинтезирани комплексни съединения са изследвани за цитотоксична активност *in vitro* върху набор от няколко човешки туморни клетъчни линии. Резултатите показват, че комплексите имат по-добра цитотоксичност от органичните съединения, използвани като лиганди. Комплексът $cis,cis,trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{LCI}_2(\text{OH})_2]$, където L е 3-амино-5-метил-5-фенилхидантоин проявява по-добър цитотоксичен ефект от референта cisplatin върху HT-29 клетъчна линия. В заключение, комплексите на Pt(IV) са по-активни от комплексите на Pt(II).

Научни публикации и прояви:

- Bakalova A, Cherneva E, Zhelezova I. Design, Drug-likeness and Antiproliferative Activity of Some 3-substituted S-containing Spiro-5'-hydantoins, Zbornik referatov Slovenski kemijski dnevi. Portorož, Slovenia. 28–30 Sep 2016.
- Cherneva E, Bakalova A, Michailova R, et al. Preparation, Characterization, Theoretical Investigation and Cytotoxic Activity of New Mixed Ammine/amine Platinum Complexes with 3-Amino-5-methyl-5-phenylhydantoin, Bulg Chem Commun. 2017;49:89–95 Special Edition B.
- Nikolova-Mladenova BI, Bakalova AG, *In silico* Drug Likeness and *in vitro* Cytotoxic Activity of Some 3,5-Disubstituted Hydantoins and Spirohydantoins, Bulg Chem Commun 2017;49(spec issue D):159-63.
- Bakalova A, Cherneva E, Konstantinov S. Cytotoxic Activity and Theoretical Investigation of New Mixed Ammine/Amine Platinum Complexes with 3'-Amino-5-methyl-5-phenylhydantoin, 8th Central Eur Conference “Chemistry towards Biology”. Brno, Czech Republic. 28th August - 1st Sep 2016.
- Bakalova A, Cherneva E, Zhelezova I. Design, Drug-likeness and Antiproliferative Activity of Some 3-Substituted S-Containing Spiro-5'-hydantoins, Slovenian Chemical Days 2016, 28–30 Sep, Portorož, Slovenia.
- Bakalova A, Cherneva E, Mihaylova R, et al. New Mixed Ammine/Amine Platinum Complexes with 3'-Amino-4-thio-1H-tetrahydropyranspiro-5'-hydantoin. Preparation,

Spectral Analysis, Theoretical Calculations and Biological Properties, VIth Congress of Pharmacy. Sandanski, Bulgaria. 13-16 Oct 2016.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 52/2016 Физиологично охарактеризиране на новосинтезирани производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина

Изследователски екип: Проф. Александър Борисов Златков, дф

- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Доц. Мая Георгиева, дф
- Гл. ас. Борис Кадинов – БАН
- Гл. ас. Явор Митков, дф
- Кристина Белчева, студент
- Румяна Григорова, студент
- Виктор Костов, студент

Базова организация: Катедра „Фармацевтична химия“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Върху изолираните плъщи синаптозоми, приложени самостоятелно, дериватите на кофеин-8-тиогликоловата киселина, в концентрация 100 μ M, проявяват статистически значим невротоксичен ефект, спрямо контролата (не-третиран синаптозоми). С най-слаб токсичен ефект са JTA-1 и JTA-2, следвани от JTA-3, JTA-4 и JTA-5. JTA-2Ox и веществата от JTA-6 до JTA-13 са с най-изявени невротоксични ефекти. Върху изолираните плъщи синаптозоми, при модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес (*in vitro* модел, наподобяващ някои симптоми при болестта на Паркинсон), JTA-1 и JTA-2 проявяват статистически значим невропротективен и антиоксидантен ефекти, съизмерими с тези на чистия кофеин и кофеин-8-тиогликоловата киселина. Изследваните производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина (KTG) реализират ефектите си чрез взаимодействие с аденозинови рецептори, както на ниво съдова гладка мускулатура, така и на ниво ендотел и вегетативна нервна система.

Научни публикации и прояви:

- Kadinov B, Mitkov Y, Kostov V, et al. A study of newly synthesized derivatives of caffeine-thioglycolic acid. „Дръзновение и младост във фармакологията“, Цигов чарк, 7-9 октомври, 2016
- Kadinov B, Kostov V, Grigorova R, et al. Newly synthesized derivatives of Caffeine-thioglycolic acid – *in vitro* study. XIV Int Medical Scientific conference, Pleven, 10-15 Oct 2016, 188.
- Василев М. *In vitro* оценка съкратителната активност на JTA-3, производно на кофеин-8-тиогликоловата киселина върху малки мозъчни съдове. Пролетна студентска научна сесия. Фармацевтичен факултет, София, 22.04.2017, А6.
- Vasilev M., Kadinov B. *In vitro* study of newly synthesized derivatives of caffeine-thioglycolic acid – effects on contractile activity of small brain vessels., 16th Int Congress of Medical Sciences for Students and Young Doctors (ICMS); 11-14 May 2017 MU-Sofia Bulgaria, A204.

- Kasabova-Angelova A, Kondeva-Burdina M, Mitkov J et al. Effects of newly synthesized derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid on isolated rat synaptosomes and human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Научна Сесия „Биомедицина и качество на живот – младите в науката“; 26 Юни 2017.
- Vasilev M, Kadinov B, Kondeva-Burdina M, et al. *In vitro* study of newly synthesized derivatives of caffeine-thioglycolic acid – effects on contractile activity of small brain vessels. 7th Global Experts Meeting on Neuropharmacology: Major Challenges and Breakthroughs, Milan, Italy, Jul 31-Aug 02, 2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 53/2016 Флавоноиди от надземната част на *Chenopodium bonus-henricus* L. – изолиране, идентифициране и фармакологично проучване за наличие на радикал-свързваща/антиоксидантна активност и невропротективен ефект при модели на индуцирана невротоксичност *in vitro*

Изследователски екип: Доц. Параскев Тодоров Недялков, дф

- Гл. ас. Златина Коканова-Недялкова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Ас. Деница Алуани
- Александра Касабова, докторант

Базова организация: Катедра по Фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: От надземните части на *Chenopodium bonus-henricus* L. (сем. Amarathaceae) са изолирани и идентифицирани девет флавоноидни гликозиди с агликони патулетин, спинацетин и 6-метоксикемпферол. Гликозидите на патулетина (Chbhmf-1, Chbhmf-2 и Chbhmf-7) притежават най-висока DPPH радикал-свързваща активност (85.78 %, 85.59 % и 86.07 %), сравнима с активността на класическия антиоксидант аскорбинова киселина (86.46 %). Всички флавоноиди проявяват висока ABTS радикал-свързваща активност и приложени самостоятелно в концентрация 100 µM, не проявяват токсичен ефект върху изолирани плъщи мозъчни синаптозоми. В условия на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес, всички флавоноиди проявяват изявен невропротективен и антиоксидантен ефект, съизмерим с този на силибина. Ефектите са по-изявени при Chbhmf-9, което най-вероятно се дължи на наличието на ферулова киселина в захарната част на структурата му. Установено е че, съединения Chbhmf-02, Chbhmf-04, Chbhmf-06 и референта силибин в концентрационен интервал 50÷800 µM не понижават жизнеността на SH-SY5Y-клетките. Не беше установен цитотоксичен ефект върху невробластомните клетки в широк концентрационен интервал на изследваните компоненти, което е показателно за тяхната ниска токсичност и добър профил на безопасност. Установена е също така протекция на изпитваните флавоноиди при H₂O₂-индуцирана понижена жизненост и в условия на оксидативен стрес, като тези ефекти са съизмерими с тези на силибин.

Научни публикации и прояви:

- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov P. Antioxidant properties of 6-methoxyflavonol glycosides from the aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* L. *Bulg Chem Commun.* 2017;49(spec. issue D):253-8.
- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov P. Radical-scavenging activities of nine flavonoids isolated from the aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* L. VIth Congress of Pharmacy. Sandanski, Bulgaria. Oct 13-16, 2016. 75-76 p.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 54/2016 Дизайн и охарактеризиране на термо-чувствителни наноразмерни лекарство-доставящи системи на основата на поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид) съполимери

Изследователски екип: Гл. ас. Виктория Искрова Михайлова, дх

- Проф. Деница Момекова, дф
- Проф. Станислав Рангелов, дн - БАН
- Доц. Ивайло Димитров - БАН
- Доц. Евгени Иванов - БАН
- Ас. Иванка Петрова-Дойчева - БАН
- Христиана Величкова, докторант - БАН
- Доц. Румяна Благоева - БАН
- Доц. Асен Недев - БАН

Базова организация: Катедра по технология на лекарствените средства с биофармация, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия проект е дизайн и охарактеризиране на термо-чувствителни наноразмерни системи на основата на поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид) присаден съполимер (PNIPAM-g-PEO) за насочено доставяне на лекарствени вещества. Установено бе, че тези системи показват по-различен механизъм на мицелообразуване и натоварване, определен от една страна от фазовото превръщане полимера в смесения разтворител етанол-вода и от друга - от наличието на хидрофобното лекарство индометацин, което силно асоциира с веригите PNIPAM. Приложен бе термо-реологичен анализ за проучване степента на солватация на чистия съполимер и установяване на връзка със структурата на получените PNIPAM-g-PEO наночастици преди и след температурата на фазово превръщане. При $T < LCST$, количеството етанол в системата е основен регулатор на процеса на мицелообразуване. С увеличаване съдържанието на етанол в системите, PNIPAM-g-PEO мицелни частички се превръщат от сложни надградени структури ($\phi = 5 - 25\%$) в полимерозоми ($\phi = 30 - 40\%$). Присъствието на индометацин оказва значително влияние върху физико-химични свойства и морфология на частичките. Най-високи степен и ефективност на натоварване бе установена за системите, получени с 5-10% етанол при съотношение ИМС : PNIPAM-g-PEO 1.5:1, което доведе до морфологични трансформации от глобуларни в ламеларни и образуване на полимерозоми. Основен фактор, контролиращ размера и дисперсността на тези частици, е скоростта на добавяне на етанола. От проведените *in vitro* изследвания бе установено, че процесът на освобождаване на индометацин от ИМС/PNIPAM-g-PEO натоварени полимерни наночастици се повлиява от температурата – при 42°C протича с най-голяма

скорост. Промените в мицеларната структура на разтворите са обратими и способни да модулират кинетиката на процеса. С помощта на математическо моделиране с модел-зависими методи бе установено, че скоростта и степента на освобождаване на индометацин са тясно свързани със съществуващата зависимост между конформацията на полимерните вериги, температурата и съдържанието на етанол. Релаксационно-ерозионните и дифузионни свойства на тези системи оказват по-слаб ефект върху процесите на освобождаване. Получените резултати определят перспективността на разработваната мицелна система PNIPAM-g-PEO за насочено доставяне на нестероидни противо-възпалителни лекарства.

Научни публикации и прояви:

- Blagoeva R, Nedev A, Michailova V. An approach to modeling drug release from polymersome nanoparticles based on PNIPAM-g-PEO copolymer. *Int J Bioautomation* 2017;21(2):179-88.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 55/2016 Изследване влиянието на растежния фактор Vascular endothelial growth factor (VEGF) върху производството на колаген и остеогенната диференциация на стволови клетки от периодонтален лигамент *in vitro*

Изследователски екип: Доц. Павел Кирилов Станимиров, дм

- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Ас. Зорница Михайлова
- Розалия Циканделова
- Доц. Наталия Грънчарова, дм
- Гл. ас. Николай Ишкитиев дм, дб

Базова организация: Катедра по орална и лицевочелюстна хирургия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящото изследване е разкриване ефекта на VEGF върху стволови клетки от ПДЛ *in vitro* и в частност-значението му за клетъчната диференциация и експресия на маркери. Клетките бяха култивирани и намножени в автокринна среда. За период от около 2 до 4 седмици бяха получени достатъчен брой клетки за провеждане на изследването. Като рутинна процедура преди залагането на всеки експеримент, клетките бяха характеризирани със стволочелюстни маркери, за да бъдем сигурни, че клетките са стволови. Стволови клетки от ПДЛ бяха култивирани в среда с VEGF за период от 48ч до 3 седмици в зависимост от дизайна на експеримента. Като оптимална концентрация за провеждане на опитите беше избрана 50 нг/мл. Чрез качествен (имунофлуоресценция) и количествен (флуоцитометрия) метод установихме, че VEGF селективно потиска експресията на стволочелюстни маркери. Експресията на CD71 е значително инхибирана, докато тази на другите два маркера (CD90 и CD271) остава непроменена. Чрез РНК анализ и real time RT-PCR и чрез функционален тест за изследване на синтез на общ колаген установихме, че VEGF не влияе върху синтезната активност на клетките. От друга страна, този РФ поттиква клетките към остеогенна диференциация. Тази негова способност беше доказана с помощта на оцветяване с alizarin red след триседмично култивиране. Резултатите от РНК анализ и real time RT-PCR

доказват също, че VEGF инхибира експресията на маркери, свързани с прогресия на неоплазмите и на възпалителните процеси. Той участва в процеси на ангиогенеза, формиране на нови нервни влакна, стабилизиране на ЕЦМ.

Научни публикации и прояви:

- Mitev V, Mihaylova Z, Stanimirov P, et al. Effects of VEGF on periodontal ligament mesenchymal stem cells. ISSCR 2017 annual meeting, Boston MA, USA 14-17 Jun

Научният отчет е приет с *ДОБРА* оценка по скалата на СМН.

Договор 56/2016 Наноструктурни покрития с приложение в денталната медицина

Изследователски екип: Доц. Елка Николаева Радева, дм

- Проф. Петър Петров, дфн - БАН
- Ас. Десислава Цанова-Тошева, докторант,
- Инж. Димитър Дечев - БАН

Базова организация: Катедра по консервативно зъблечение, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В резултат на опитните постановки, при които са отлагани покритията, са оптимизирани максимално технологичните параметри необходими за депозиране на качествено градиентно покритие от TiN/TiO₂. Резултатите от електрохимичната корозия показват, че нанесеното покритие спомага за съществено намаляване на корозионния ток на системата от 1.10⁻⁷ А/cm² до 6.10⁻⁸ А/cm² в стационарни условия. Съпоставянето на анодните криви, които характеризират процесите на окисление на сплавта показва, че отложеното покритие инхибира анодното разтваряне на компонентите на подложката и прави системата по-устойчива на корозия. Резултатите от изследването на твърдостта и модула на еластичност на образци от кобалт-хромов сплав с нанесени покрития от титанов нитрид/титанов двуокис показват, че средната твърдост е 16,285 GPa, а модулет на Юнг е 230,151 GPa. Наличието на стандартно отклонение показва чувствителността на наноиндентора към грапавостта или нехомогеността на тестваната повърхност. Добрите резултати от това изследване доказват добрите качества на получените покрития и потвърждават значимостта на параметрите на депозиране. Направена е сканираща електронна микроскопия на К-пила без покритие. След петата стерилизация не се наблюдават особени промени върху пилата. Открива се наличие на малък вдлъбнат дефект на повърхността. Структурата изглежда непроменена като на места се наблюдават артефакти. След петата стерилизация е направена сканираща електронна микроскопия на К-пила с депозирано покритие от TiN/TiO₂. Видимо не се наблюдават никакви дефекти по повърхността на пилата. Липсват кратеровидни дефекти. Наблюдават се артефакти. Сканиращата електронна микроскопия на К-пила без покритие след десетата стерилизация демонстрира наличие на артефакти и формиране на по-голям брой повърхностни дефекти в сравнение с повърхността на К-пилата без покритие след петата стерилизация. Наблюдавана е повърхността на ендодонтски инструмент с депозирано покритие от TiN/TiO₂ след десетата стерилизация. Наблюдават се артефакти. Повърхността на покритието изглежда променена - с по-изразена зърниста структура. Липсва наличие на кратери и дефекти по повърхността на инструмента. Вероятно наличието на покритие

потвърждава фактите от литературата, според които то предпазва сплавта от напукване и фрактуриране.

Научни публикации и прояви:

- Цанова-Тошева Д, Радева Е, Дечев Д, и др., Биосъвместими материали за денталната медицина, Машиностроене и машинознание, 2017, бр. 27, книга 1, стр.12-17
- Tsanova-Tosheva D, Radeva E, et al. Crystallographic Structure of Biocompatible Nanocoatings Deposited on Co-Cr Substrate, 6th National Crystallographic Symposium 2016, BAS, 5-7 Oct 2016, p.83
- Tsanova-Tosheva D, Radeva E, et al. „Formation and structure of TiN/TiO₂ multilayer coatings deposited on Co-Cr substrate, 18th Int workshop on Nanoscience and Nanotechnology 2016, 18-19 Nov, 2016, p.26

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 58/2016 Определяне на концентрациите на някои маркери на възпаление и деструкция в слюнка и гингивален ексудат за диагноза на пародонталните заболявания

Изследователски екип: Доц. Теодора Николаева Болярова-Копова, дм

- Проф. Христина Михайлова, дм
- Ас. Цветелина Великова, дм
- Ас. Екатерина Иванова-Тодорова, дм
- Калина Тумангелова-Юзеир, дм
- Д-р Силвия Петкова
- Долорес Тодорова, студент

Базова организация: Катедра по пародонтология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на приследването е да се търси значимостта на показателите IL-1 β и MMP-8 от човешка слюнка и от гингивална кревикуларна течност (ГКТ) като биомаркери за пародонтални заболявания. В изследването участват 62 лица, на средна възраст 35,55 г. (SD \pm 13,782), разделени в три групи на основата на клинични и рентгенографски параметри – 19 здрави лица, 19 пациенти с гингивит, 24 пациенти с пародонтит. От всички пациенти са вземани ГКТ и слюнка в микропипети и стерилни контейнери. В тези биологични течности са определяни концентрациите на IL-1 β и MMP-8 чрез ELISA. Ние откриваме значимо по-високи концентрации на IL-1 β в ГКТ и в слюнка не само при пациенти с изразен пародонтит, но и при пациенти с плак-индуциран гингивит, в сравнение с концентрациите им при здрави лица. Установихме значима разлика в средните стойности на концентрациите на MMP-8 в слюнка при здравите лица и пациентите с гингивит. Това ни дава основание да потвърдим становището, че показателите IL-1 β в ГКТ и в слюнка и MMP-8 в слюнка са сензитивни маркери за диференциране на състояние на пародонтално здраве от пародонтално заболяване. Установена е значима разлика между концентрациите на IL-1 β в ГКТ при пациентите със средна костна загуба (BL) < 2 mm и пациенти с BL \geq 2 mm. Това ни дава основание да свържем нивата на IL-1 β в ГКТ със средна костна загуба, т. е. с тежестта на хроничния пародонтит. Резултатите показват значима линейна корелация на кървенето при

сондиране при пациентите с пародонтит с нивата на MMP-8 в слюнка, което ни насочва към твърдението, че MMP-8 е биомаркер, който би могъл да се свърже с активност на заболяването. Получените данни определят IL-1 β и MMP-8 от слюнка и ГКТ като значими маркери за диагноза на пародонталните заболявания и дават основание да предложим разработка и произвеждане на тестове за бърза и по-точна диагностика около стола на пациента.

Научни публикации и прояви:

- Болярова Т, С Петкова. Определяне на концентрациите на някои маркери на възпаление и деструкция в слюнка и гингивален ексудат за диагноза на пародонталните заболявания. Обзор. Обща мед. 2016; XVIII(4): 56-65.
- Petkova S, T Bolyarova, T Velikova, et al. Interleukin-1 β as a biomarker for periodontal diseases. IntDental Journal 2017; 67 (Suppl. 1):112.
- Bolyarova T, Petkova S. Interleukin-1 β in relation with bone loss in chronic periodontitis. British Society of Periodontology Conference, London, UK 22-23 Jun 2017.
- Petkova S, T Bolyarova, T Velikova, et al. Interleukin-1 β as a biomarker for periodontal diseases. FDI World Dental Congress, Madrid, Spain, 29 Aug–1 Sep 2017, p. 201

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 63/2016 Изследване ролята на фармакогенетични фактори при прецизиране лекарствената терапия с такролимус при пациенти с бъбречна трансплантация в България

Изследователски екип: Проф. Емил Димитров Паскалев, дмн

- Проф. Добрин Свиначков, дмн
- Доц. Радка Кънева, дб
- Радослава Саръева, дб
- Рени Цвеова, дб
- Калина Михова
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

Базова организация: Клиничен център по нефрология, бул. Г Софийски 1, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Настоящият проект имаше за цел да проучи влиянието на полиморфни варианти в гените за CYP3A4/5, POR, PRARA, ABCB1 и ABCC2 при прецизиране лекарствената терапия с такролимус при пациенти с бъбречна трансплантация в България. В проучването бяха включени 34 пациента с бъбречна трансплантация, лекувани с такролимус, и употребяващи стабилни дози в продължение на няколко седмици или месеца. Анализ на фармакокинетичния параметър C₀ (концентрация на лекарството в кръвта непосредствено преди пореден прием на Таc) беше осъществен с помощта на LC-MS/MS метод. Заложените полиморфизми в CYP3A4, CYP3A5, POR, PRARA, ABCB1 и ABCC2 бяха изследвани с помощта на анализ чрез топене с висока резолюция на ДНК (High resolution melting analysis, HRMA). Резултатите бяха обработени с програмата за статистически анализи SPSS (v 24.0). Статистически значими резултати бяха установени при разпределение на CYP3A5*3 (6986A>G) rs776746 (p=0.007), ABCB1 (2677G>T/A) rs2032582 (p=0.044) и ABCB1 (3435C>T) rs1045642 (p=0.016) генотипите. При останалите полиморфни варианти статистически значими разлики между носителството на определен

генотип и дозово нормализираните концентрации (C0/доза) на такролимус не бяха установени. При носителите на един активен алел за CYP3A5 - AG генотип, стойностите на C0/доза са по-ниски в сравнение с хомозиготните носители на полиморфния алел - GG, което означава, че те по-бързо елиминират такролимуса. Обратно при хомозиготните носители на ABCB1 (2677G>T/A) и/или ABCB1 (3435C>T) вариантите се наблюдават по-високи стойности на C0/доза в сравнение с носителите на един или два диви алела т.е. те по-бавно елиминират такролимуса и би трябвало употребяват по-ниски дози такролимус за достигане на терапевтичен ефект. При български пациенти с бъбречна трансплантация присъствието на един активен алел CYP3A5 асоциира с изискването на по-високи дози такролимус, докато хомозиготното носителство на ABCB1 2677G>T/A и/или ABCB1 3435C>T - с по-ниски дози от медикамента. Малкия брой пациенти, не позволява да изключим напълно влиянието на други полиморфни варианти в отговора към терапия с такролимус.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 67/2016 Изследване на връзката между полиморфизма *IL-17 rs2275913* и серумните нива на *IL-17* – фактори за развитието на дерматомиозит у възрастни

Изследователски екип: Доц. Любомир Асенов Дурмишев, дм

- Доц. Радка Кънева, дб
- Ас. Мария Христова, дм
- Радослава Саръева, дб

Базова организация: Катедра по дерматология и венерология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследвани бяха 30 пациенти с ДМ и 30 здрави контроли. Посредством ELISA беше определена концентрация на *IL-17*. Получената средна стойност у пациентите с ДМ е 3.1 pg/ml, а у здравите контроли - 5.2 pg/ml. Непараметричният тест на Kruskal-Wallis не показва статистически значими различия между двете изследвани групи. Въпреки установените по-високи нива на *IL-17* сред част от пациентите, не беше наблюдавана статистически значима асоциация по отношение на признаци като фоточувствителност ($p=0.3$), повишени мускулни ензими ($p=0.2$), нарушения в ЕМГ ($p=0.3$), кожно засягане ($p=0.9$), мускулно засягане ($p=0.7$) и наличие на антитела ($p=0.8$). Не се установи връзка между изследвания полиморфизъм *rs2275913* с възникването и развитието на заболяването. Не се наблюдава връзка между полиморфизма и нивата на *IL-17*.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 68/2016 Молекулярно-генетична диагностика при пациенти с амиотрофична латерална склероза

Изследователски екип: Проф. Ивайло Людмилов Търнев, дмн

- Андрей Киров, дб
- Доц. Албена Годорова-Георгиева, дбн
- Стайко Сарафов, дм

Базова организация: Катедра по неврология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящата научна разработка беше да се изяснят молекулните характеристики, лежащи в основата на заболяването при пациенти с амиотрофичната латерална склероза чрез молекулярно генетичен анализ на *SOD1* гена. На база на клиничните данни бяха подбрани 10 пациента с клинична диагноза амиотрофичната латерална склероза. При 9 от подбраните 10 пациенти (90%) не се наблюдава фамилна история. От всички пациенти беше изолирана ДНК и проведехме амплификация и секвенционен анализ на всички кодиращи екзони и екзон-интронни граници на *SOD1* гена. При пациента с фамилната история детектирахме патологичен генетичен вариант в екзон 4 на гена: NM_000454.4(SOD1):c.319C>G (p.Leu107Val). Вариантът е добре известен и с ясна патогенност и обяснява клиничната картина при пациента. Фамилната история на пациента обхваща поне 4 поколения. Прави впечатление по-ниската преживяемост (разлика 3,5 години между втори и четвърто поколение) и по-ранното начало на заболяването (разлика 14 години) във всяко следващо поколение. Интересно е, тази антисипация обикновено е характерна за заболявания, дължащи се на нуклеотидни експанзии и по-рядко при заболявания, причинени от други типове мутации. Може да се предположи влиянието на други генетични и епигенетични фактори върху началото на заболяването и преживяемостта. За изясняването на тези фактори се изисква събиране на големи групи от пациенти с фамилен ALS и събиране на данни за цялото семейство относно фактори на средата, хранене, физическа натовареност и др. Необходимо е и извършването на допълнителни генетични изследвания за търсене на гени модификатори, енхансерни генетични последователности или генетични полиморфни варианти, които имат отношение към тежестта на изява и възраста на начало на заболяването. Това налага използването на големи геномни сканове и NGS платформи за цялостно екзомно или геномно секвениране.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 81/2016 Епигенетични биомаркери при български пациенти с езофагеални тумори

Изследователски екип: Доц. Олег Георгиев Чолаков, дм

- Проф. Александър Червенияков, дм - УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”
- Д-р Мартин Младенов - УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”
- Гл. ас. Ния Сърбянова - УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”
- Гергана Станчева, дб
- Даниела Пенчева, дб
- Калина Михова
- Силва Гирагосян
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Доц. Радка Кънева, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

Базова организация: Катедра по спешна медицина, УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов”, ул. Здраве 2, София

РЕЗУЛТАТИ: В текущото проучване бяха включени 22 туморни тъкани на пациенти с *Ca oesophagi* и *Ca cardiae* и бе проведен анализ на промоторното хиперметиране на

REPRIMO, CpG регион 1 на *APC* гена чрез MS-PCR, и на CpG регион 2 на *APC* гена и *CDKN2A* гена чрез MS-HRM анализ. Всички от изследваните туморни проби показаха хемиметилиране на промоторния регион на *REPRIMO*. Поради тази причина не може да бъде използван за разграничаване на двете подгрупи тумори и вероятно не корелира с клиникопатологичните характеристики. При всички без един от пациентите с Ca oesophagi установихме хемиметилиране на CpG регион 1 на *APC*, докато от пациентите с Ca cardiaе такава беше установено при 5 от пациентите. За разлика от регион 1, регион 2 на *APC* показва неметилиране в 11 от пациентите с Ca oesophagi и в двама от пациентите с Ca cardiaе. По-голяма част от пациентите от двете подгрупи показаха неметилиране по отношение на промоторния регион на *CDKN2A*. За да определим дали изследваните промоторно хиперметилирани маркери могат да разграничат двете групи пациенти, проведехме анализ на ROC кривите. Проведеният анализ показва, че с висока чувствителност и специфичност промоторното хиперметилране на CpG регион 2 на *APC* гена може да разграничи двата подтипа тумори (AUC=0.839, p=0.012). Промоторното хиперметилиране на *CDKN2A* и на регион 1 на *APC* не могат да разграничат надеждно двете подгрупи тумори, но Spearman корелационния анализ показва, че статистически значимо корелират с клиникопатологичните характеристики, показващи агресивността на туморите; туморен стадий, наличие на лимфни и далечни метастази. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 90/2016 Анализ на експресията на микроРНКи в плазма при пациенти с недробенклетъчни белодробни карциноми и обструктивни белодробни болести

Изследователски екип: Проф. Янина Георгиева Славова-Маринова, дм

- Доц. Димитър Костадинов, дм
- Доц. Ваня Юрукова, дм
- Доц. Росен Петков, дм
- Гл. ас. Дора Маринова, дм
- Евгени Меков, дм
- Д-р Александър Лилов
- Д-р Деница Димитрова
- Д-р Мирослав Михайлов
- Дарина Качакова
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Доц. Радка Кънева, дб
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Силва Гиругосян

Базова организация: Клиничен център по белодробни болести, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: МиРНКите представляват важни регулатори на генната експресия. Участват в множество физиологични и клетъчни процеси. Съществуват проучвания, показващи променена експресия на редица миРНКи при рак на белия дроб, ХОББ и астма, но авторските колективи докладват различни миРНКи, които рядко се припокриват. До момента не съществуват и достатъчно изследвания на експресионните нива на миРНКи

при ХОББ и астма, т.нар. обструктивни белодробни болести. В настоящето проучване бяха включени изолирани микроРНКи от плазма на пациенти с НДБК (20 броя), ХОББ (15 броя) и астма (15 броя). Бе проведена обратна транскрипция за синтез на кДНК, експресионен анализ чрез PCR в реално време и статистически анализ на получените резултати. Резултатите от настоящето проучване не показаха статистическа значими разлики между нивата на експресия на miR-223 в плазма на различните групи пациенти, както – помежду им, така и спрямо контролната група. За прецизиране на ролята ѝ като биомаркер за разграничаване на изследваните заболявания е необходимо е да се проведе анализ на по-голяма извадка.

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 96/2016 Съхранение на тъкани за доразширяване на тъканна, плазмена и ДНК банка от пациенти с рак на гърдата

Изследователски екип: Доц. Теофил Ангелов Седлоев, дм

- Мариела Величкова, дм
- Даниела Пенчева
- Доц. Радка Кънева, дб
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Дарина Качакова, дб
- Калина Михова, дб
- Румяна Додова, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Д-р Цветелина Спиридонова
- Д-р Явор Николов
- Д-р Славяна Ушева

Базова организация: Катедра по хирургия, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Съвременните молекулярно генетични изследвания потвърждават голямата хетерогенност на туморите на гърдата, при които често се наблюдават генетични промени в тумор-асоциирани гени като: *PIK3CA*, *BRCA1*, *BRCA2*, *GATA3*, *PTEN*, *RB1*, *CDH1*, *KDM6A*, *MAP2K4*, *NF1*, *GATA3*, *TP53* и др. Технологии за секвениране от ново поколение – NGS (**N**ext **G**eneration **S**equencing) позволяват масивно паралелно секвениране на панели гени и откриване на спектъра от соматични мутации, характерни за отделните подтипове карциноми. Целта на настоящият проект е да се разшири съществуващата в Центърът по молекулярна медицина (ЦММ) биобанка от тъканни, плазмени и ДНК проби от пациенти с рак на гърдата с цел бъдещи молекулярно генетични изследвания със секвениране от ново поколение. Беше събран изходен материал от туморна и нормална тъкан на 32 пациентки чрез тънкоиглена биопсия, изолиране на геномна ДНК от събраните тъкани, качествена и количествена оценка на изолираната геномната ДНК, създаване на клинична и информационна база данни за пациентки с рак на гърдата в ЦММ, МУ–София. За периода 2013–2017 година в ЦММ бяха събрани и съхранени 201 туморни тъкани от карциноми на гърдата и 197 нормални тъкани от млечна жлеза. Всички тъкани бяха съхранени в RNeasy (RNA Stabilization Solution for Tissue), а изолираните

ДНК-и разтворени в елуиращ буфер и съхранение на -80°C за бъдещи изследвания. Съпътстващата биобанката клинична информация беше систематизирана по възраст на пациентките, хистологичен тип, диференциация, и рецепторен статус. Събраната биобанка ще бъде включена в проучвания за изясняване молекулярно генетичните механизми на карциномите на гърдата посредством NGS. Това ще позволи молекулярното профилиране на отделните подтипове тумори на гърдата при български пациенти, откриването на характерния за тях спектър от движещи мутации, засегнатите пътища на сигнална трансдукция и потенциалните прицелни мишени за терапия.

Научни публикации и прояви:

- Додова Р. Изследване на гени, асоциирани с предразположение за развитието на фамилен рак на гърдата и яйчниците със секвениране от ново поколение. Синпозиум Чудомир Начев, БАН, София, 2016
- Sedloev T, M Koleva, T Pirdopska, et al. Staging distribution and choice of therapeutic management in patients with breast cancer in 2016 at the Breast Unit, University Hospital “Tzaritza Joanna – ISUL”, MU-Sofia, Bulgaria. 4th World Congress on Breast Cancer and Women’s Health, 8 -10 May, 2017, Singapore

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 97/2016 Разширяване на биобанката от пациенти с овариален карцином и оптимизиране на условията за съхранение на биологични материали

Изследователски екип: Доц. Румен Георгиев Димитров, дм

- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Доц. Радка Кънева, дб
- Доц. Иванка Димова, дм
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Румяна Додова, дб
- Дарина Качакова, дб
- Калина Михова, дб
- Даниела Пенчева
- Алън Начев, дм
- Сашка Райчева, дм
- Карела Майнхард, дм
- Проф. Иво Кременски, дм

Базова организация: Катедра по акушерство и гинекология, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Съвременните молекулярно генетични изследвания потвърждават голямата хетерогенност на овариалните тумори и налагат нова концепция в тяхната класификация, като ги разделя на две големи групи – тип I и тип II. Към тип I се отнасят серозни, ендометриоидни, муцинозни и светло клетъчни тумори с ниска степен на злокачественост (low grade). Най-често срещаните молекулярно генетични промени, които отличават серозните тумори с ниска степен на малигненост са мутации в MAPK сигналния път и по-специално мутации в *KRAS* и *BRAF* гените. От друга страна серозните туморите на овариума с висока степен на малигненост (high grade) – тип II се характеризира с мутации в гени, участващи в ДНК репариращите механизми, като например *TP53*, *BRCAl*,

BRCA2 CHEK1, CHEK2, ATM, ATR и *RAD51*. Целта на настоящия проект беше да се разшири съществуващата към Центъра по молекулна медицина (ЦММ) биобанка от пациенти с овариален карцином и да бъдат оптимизирани условията за съхранение на биологични материали с цел бъдещи молекулярно генетични изследвания. За изпълнението на целите, заложен в проекта бяха изпълнени следните задачи - разширяване и съхранение на биобанката от туморната и нормалната овариална тъкан в Центъра по молекулна медицина биобанка, изолиране на ДНК от кръв и създаване на клинична и информационна база данни за пациентки с овариален карцином. За периода 2014 – 2017 година в ЦММ е събрана биобанка, включваща ДНК от кръв, туморна и нормална тъкан от 44 пациентки с овариален карцином. Всички тъкани бяха съхранени в RNAlater (RNA Stabilization Solution for Tissue), а получената клинична информация беше систематизирана по възраст на пациентките, хистологичен тип, диференциация, TNM класификация и стадий. Събраната биобанка бъде включена в проучвания за изясняване молекулярно генетичните механизми на овариалните карциноми посредством NGS. Това ще позволи молекулярното профилиране на отделните подтипове тумори на яйчника при български пациенти, откриването на характерния за тях спектър от движещи мутации, засегнатите пътища на сигнална трансдукция и прицелни мишени за терапия.

Научни публикации и прояви:

- Додова Р, А Миткова, И Димова, и др. Генетични изследвания при BRCA-свързан рак на гърдата и яйчниците. София, XX Национална гинекологична конференция, Боровец, 16-18.03.2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ КОНКУРС „ГРАНТ’ 2017”

Договор Д-55/02.05.2017 Ефекти на 5-НТ₂ антагонисти върху хипертермията при модел на серотонинов синдром

Изследователски екип: Доц. Румен Павлов Николов, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящето проучване е да изследва ефектите на 5-НТ₂-рецепторни антагонисти като напр. оланзапин и рисперидон върху хипертермичната реакция при експериментален модел на серотонинов синдром у плъхове. В нашите експерименти беше използван модел на серотонинов синдром, предизвикан от приложение на флуоксетин и транилципромин. По време на експериментите температурата на околната среда се поддържаше 24 ± 1 °С. Телесната температура на животните беше мониторирана чрез използване на ректални термисторни проби (ТХ-8), свързани към работещ с компютърна програма мултиканален апарат Iso-Thermex 16. След лубликация с вазелин термисторните проби се въвеждаха ректално на дълбочина 6 см. Предварителното прилагане на оланзапин (5 mg и 10 mg/kg, i.p.) или рисперидон (1 mg и 2,5 mg/kg, i.p.) намалява или блокира развитието на хипертермичната реакция при модел на серотонинов синдром у плъхове. Настоящите резултати показват, че хипертермичната реакция, наблюдавана при серотониновия синдром, се медира чрез активиране на централните 5-НТ₂ рецептори.

Научни публикации и прояви:

- Николов, Р, Богданов, Г. Ефект на рисперидон върху хипертермия при експериментален серотонинов синдром у плъхове. Медицински преглед. 2018; 54 (4)
- Toteva S, Koleva K, Bogdanov G, et al. Effects of olanzapine on hyperthermia in experimental serotonin syndrome. ICMS, 10-13 May, 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-56/02.05.2017 Проучване токсигенността и макролидната резистентност при клинично значими пиогенни коки *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*

Изследователски екип: Доц. Райна Цветанова Гергова, дм

- Чл. кор. Проф. Иван Митов, дм, дмн
- Адиле Мухтарова
- Д-р Вирна Мария Циту

Базова организация: МУ - София, МФ, Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на това проучване е да се определи честотата и разпространението на гени, кодиращи супер-антигени и токсини в български изолати *Streptococcus pyogenes*

(GAS) и *Staphylococcus aureus* и определяне на тяхната макролидна резистентност. Клиничните изолати (GAS N = 238, и *S. aureus* N = 150) от различни проби бяха изследвани за присъствието на 21 в GAS и 12 гени на вирулентност в *S. aureus* използвайки мултиплекс полимеразна верижна реакция (PCR). Бяха открити гените за макролидна резистентност и бяха определени минималната инхибиторна концентрация (MIC) на еритромицин и клиндамицин. Всички изпитани щамове на GAS са показали, че носят *speB*, *sypCEP*, *sdaB*; повече от 80% имат *mac* и *smeZ*; последвани от *speJ*, *speG* и гени за ДНК-за *sdc*, *sdaD*, *Spd3* (между 50% и 75%). Беше направен опит да се търси връзка между откритите гени на вирулентност на GAS, вида на инфекцията и източника на изолати. Най-честите гени на вирулентност в тестваните *S. aureus* бяха *hlg* (85%), *sei* (81%), *seg* (45%), *seb* (44%), *sec* (42%). Тяхната честота е сравнена с резултати от други страни. Близо 35% от изолатите на GAS и повече от 40% от *S. aureus* от 2017 г. са устойчиви на макролиди. Определени са най-честите фенотипове и генотипове на устойчивост на макролид при стрептококови и стафилококови щамове. За пръв път беше открит по-високият патогенен потенциал на българските изолати на GAS и *S. aureus* в сравнение с други страни. Гените *speA*, *speF*, *speL* и *speM* или техните комбинации се откриват по-често в инвазивни изолати в сравнение с неинвазивни такива. Резистентните към макролид изолати от 2017 GAS са 34% и *S. aureus* 42%.

Научни публикации и прояви:

- Muhtarova A, Gergova R, Setchanova L et al. Distribution of super-antigens and toxins in Bulgarian invasive and non-invasive clinical isolates *Streptococcus pyogenes*. Acta Microbiol Bulg. 2017;33(4):151-6.
- Muhtarova A, Gergova R, Setchanova L et al. Distribution of super-antigens and toxins in Bulgarian invasive and non-invasive clinical isolates *Streptococcus pyogenes*. 10th Balkan Congress of Microbiology Sofia, 16–18 Nov 2017
- Tsitou V, Gergova R, Muhtarova A, et al. The toxic potential of bulgarian clinical isolates *Staphylococcus aureus* determined by multiplex PCR. 10th Balkan Congress of Microbiology Sofia, Bulgaria Nov 16-18, 2017

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-57/02.05.2017 Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към гликопептидни антибиотици на клинични изолати *Enterococcus spp.*

Изследователски екип: Доц. Таня Василева Стратева, дм

- Чл.-кор. Проф. Иван Митов, дмн
- Проф. Енчо Савов, дмн – МДЦ „Дженерали Закрила”
- Доц. Светослав Димов, дг – СУ
- Гл. ас. Иво Сираков, двм
- Ангелина Трифонова – ВМА

Базова организация: Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Петдесет и един нозокомиални vancomycin-резистентни изолати *Enterococcus faecium* (VREFm), идентифицирани чрез *sodA* полимеразно-верижна реакция (PCR), бяха събрани през периода 2013-2017 г. от три големи болници в България. Целите

на изследването бяха: определяне на чувствителността към антимикробни лекарствени средства (АМЛС) (EUCAST-2017); извършване на молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към гликопептиди и епидемиологията на изолатите чрез случайно амплифициране на полиморфна ДНК (RAPD)-PCR и мултилокусно секвениране (MLST); и изготвяне на подходящи препоръки за лечение. Антибиотичната резистентност беше следната: към ampicillin, imipenem, gentamicin (високо ниво на резистентност), vancomycin, teicoplanin, ciprofloxacin, и quinupristin-dalfopristin – 100%; linezolid, tigecycline, и daptomycin (интерпретирана според критериите на CLSI-2016) – 0%. Всички проучени VREFm изолати бяха положителни за *vanA* ген. Чрез RAPD-PCR с AP4 праймер, бяха установени само две клъстерни групи (CGs) с 81% клонална свързаност между тях – CG-I (23 щама, 93% сходство) и CG-II (28 щама, 95%). Приложението на P2 праймер показва: разпределение в пет CGs – CG-I (22 щама, 93%), CG-II (12 щама, 90.5%), CG-III (5 щама, 90%), CG-IV (2 щама, 96%) и CG-V (2 щама, 96%); 8 щама без клъстерна принадлежност и клонална връзка (70%) между 42 от проучените VREFm. MLST определи всички генотипизирани щамове (n=16) като секвенционен тип (ST) 203 (алелни профили: 15-1-1-1-1-20-1). Утвърдените варианти за лечение, включващи linezolid, tigecycline и daptomycin, са предпочитани средства на избор при инфекциите, причинени от vancomycin-резистентни ентерококи. В заключение, за първи път в България е извършено генотипизиране на нозокомиални VREFm изолати. Настоящото проучване демонстрира персистиране на епидемичен клон от *vanA* полирезистентни *E. faecium* ST203 в три български болници за период от четири години и подчертава необходимостта от продължителен епидемиологичен надзор на VRE клонове в болничните отделения. Терапията на VRE инфекции е трудна, но по-новите агенти, като tedizolid, telavancin, dalbavancin и oritavancin; използването на комбинации от АМЛС; подобрените антибиотични дозировки и стратегии за въвеждане в организма са обещаващи за тяхното бъдещо лечение.

Научни публикации и прояви:

- Стратева Т, Димов С, Трифонова А, и др. Епидемиологично типизиране на vancomycin-резистентни нозокомиални изолати *Enterococcus faecium* от три големи болници в България (2013-2017 г.). Медицински преглед. 2018;54(2):34-41.
- Стратева Т. Антимикробна терапия на инфекции, причинени от vancomycin-резистентни ентерококи. Медицински преглед. 2018;54(3):15-23.
- Стратева Т. Генно-географски характеристики на vancomycin-резистентните *Enterococcus* species и ентерококовите клонове. Медицински преглед. 2018;54 (6):3-10.
- Strateva T, Sirakov I, Dimov S, et al. Clonal spread of *vanA* *Enterococcus faecium* sequence type 203 in Bulgarian hospitals. Infect Dis. 2018;50 (9):718-21.
- Трифонова А, Димов Св, Стратева Т. Ендемичен клон от нозокомиални изолати *Enterococcus faecium* с гликопептидна резистентност в български болници – молекулярно-генетични проучвания. Първи младежки семинар по генетика. Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, 24 ноември 2017, София
- Strateva T, Sirakov I, Savov E, et al. Clonal spread of *vanA* *Enterococcus faecium* sequence type 203 in Bulgarian hospitals. Eur Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Madrid, Spain. 21–24 April 2018

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-58/02.05.2017 Молекулярно-генетична диагностика при пациенти с неизяснен тип невромускулни заболявания чрез секвениране от ново поколение

Изследователския екип: Гл.ас Биляна Георгиева Георгиева, дб

- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Мария Глушкова, докторант
- Савина Тинчева, докторант
- Иглика Йорданова, дб
- Андрей Киров, дб
- Тихомир Тодоров, дб

Базова организация: МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящия проект е приложението на секвениране от ново поколение (Next Generation Sequencing, NGS) за диагностични цели при български пациенти с различни форми на невромускулно заболяване. Изследвани са 8 пациента от 8 семейства, при които не е конкретизиран типа на невромускулното заболяване поради сходство в клиничната симптоматика, както и такива с предварително отхвърлени чести и/или някои от по-редките невромускулни заболявания. Биологичният материал е геномна ДНК изолирана от венозна кръв. Методите за анализ включват NGS и секвениране по Сангер. При 7 пациента от 7 семейства (87.5%) NGS анализът доведе до откриване на молекулни дефекти в съответни гени (*LAMA2*, *COL6A1*, *MYH7*, *VAMP1*, *SPAST*), с което поставихме точна молекулярно генетична диагноза. Само при едно семейство геномният анализ не доведе до откриване на мутации и пациентът остава с неуточнена диагноза. Идентифицирахме общо 8 патологични генни варианта, 4 от които са непубликувани (с.5560-2A>C в интрон 37 и с.5746C>T, р.Gln1916* в екзон 39 на *MYH7* гена; с.66delT, р.Gly23Alafs*6 в екзон 2 на *VAMP1* гена; с.1039C>T, р.Gln347* в екзон 7 на *SPAST* гена), с което се обогатява световната база данни и се осветлява въпросът за генотип-фенотипните корелации. Със секвениране по Сангер са определени генотипите и при 16 родственика от седемте семейства с установен молекулен дефект. В две от семействата с автозомно доминантен тип на унаследяване на заболяването са доказани общо трима пресимптоматични хетрозиготни носителя, които към момента са здрави, но ще проявят конкретното заболяване. Работата по настоящия проект доведе до поставяне на точна диагноза на молекулярно-генетично ниво при 7 български пациента с различни форми на невромускулно заболяване. Само при наличие на точна молекулярно-генетична диагноза в семейството може да се предложи адекватна консултация, пренатална диагностика, профилактика и терапия на заболяването, с което да се подобри стандарта им на живот.

Научни публикации и прояви:

- Todorov T, Georgieva B, Kirov A, et al. NGS approach in cases with congenital neuromuscular disorders. 12th Balkan congress of human genetics; 8th National conference for rare diseases; 8-10 Sep 2017 Plovdiv, Bulgaria

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-59/02.05.2017 Проучване на основни механизми на резистентност към бета-лактами и хинолони при резистентни на цефалоспорино трета генерация и/или карбапенеми клинично-значими изолати *Enterobacter spp* в университетска болница “Света Марина” Варна

Изследователски екип: Доц. Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм

- Доц. Теменуга Стоева, дм – МУ-Варна
- Петя Станкова
- Д-р Добромира Димитрова, МУ –Варна
- Доц. Радка Кънева, дб
- Калина Михова
- Чл-кор. Проф. Иван Митов, дмн

Базова организация: МУ - София, МУ–София, МФ, Катедра по медицинска микробиология, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящия проект е да се охарактеризират клинични изолати *Enterobacter spp* резистентни на цефалоспорино трета генерация и/или карбапенеми в УБ – Варна – механизъм на резистентност към бета-лактами, плазмидна хинолонова резистентност, клонална свързаност, видовия видоу състав на *Enterobacter cloacae* complex. Използваните изследователски методи включваха – Дифузионно-дискон метод и МПК за определяне на чувствителността, изоелектрично фокусиране и bioassay, PCR за охарактеризиране на основните типове бета-лактамази и AmpC ензими, секвениране, PCR за определяне на основните механизми на плазмидната хинолонова резистентност, конюгативен трансфер и плазмидно типизиране, епидемиологично типизиране чрез ERIC PCR, определяне на видовия състав на *Enterobacter cloacae* complex чрез *hsp* секвенционен анализ. Бяха изолирани 433 *Enterobacter spp* като 57% от тях бяха резистентни на цефалоспорино трета генерация. Те показаха устойчивост към ceferime – 87%, gentamicin – 86%, ciprofloxacin – 85%, и резистентност към cotrimoxazole - 60%, piperacillin/tazobactam - 65%. Изолатите бяха с висока чувствителност към amikacin – над 96%, imipenem – 100%. Изоелектричното фокусиране и молекулярно-генетичните методи доказаха висок процент на CTX-M ензими в 83% от щамовете, шест изолата (3.4 %) бяха положителни за *bla_{SHV}*, като при 13.6 % се касаеше за хиперпродукция на AmpC ензими. Всички изолати бяха негативни за CMYи FOX бета-лактамази. Нуклеотидното секвениране показва наличието на CTX-M-3 (в 10%), CTX-M-15 (в 72 %), два щама имаха и двете бета-лактамази, а SHV-12 ESBL бяха при 3.4%. Всички 176 изолата *Enterobacter spp*. бяха подложени на PCR детекция на гени, асоциирани с плазмидна хинолонова резистентност: превалираха *qnrB* гените – в 57%. Епидемиологичното типизиране доказва наличието на един основен клон А– (в 56%) – във всички отделения на болницата и през целия период на изследване. При 168те изолата *E. cloacae* complex преобладаваха *E. hormaechei* subsp. *steigerwallti* – в 59%, следвани от *Enterobacter cloacae* cluster III – 23% и *E. hormaechei* subsp. *oharae* (cluster VI) – 13%, както и 1 изолат като *Enterobacter ludwigii*.

Научни публикации и прояви:

- Dimitrova D, T Stoeva, R Markovska, et al. Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Enterobacter spp.*, obtained from patients, hospitalized in Varna University Hospital during the period 2014-2016. J of IMAB 2017;23(4):1828-33

- Markovska R, Stoeva T, Dimitrova D, et al. Quinolone resistance mechanisms among third-generation cephalosporin-resistant isolates of *Enterobacter* spp. in a Bulgarian University Hospital. *Infect Drug Resist.* 2019; 28;12:1445-55.
- Dimitrova D, Stoeva T, Markovska R, et al. Molecular epidemiology of multidrug resistant *Enterobacter cloacae* blood isolates from a University Hospital. *J of IMAV*, 2019;25(2): 2457-64.
- Markovska R, Stoeva T, Stankova P, et al. Mechanisms of beta-lactam resistance among third-generation cephalosporin-resistant isolates from family *Enterobacteriaceae* different from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia, Bulgaria, 16-18 Nov 2017

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-61/02.05.2017 Генетични изследвания при ултразвукови данни за вродени сърдечни аномалии, DiGeorge синдром и синдром на хипопластично ляво сърце

Изследователски екип: Проф. Албена Първанова Тодорова-Георгиева, дбн

- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Славена Цанева, докторант
- Иглика Йорданова, дб

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, гр. София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия нпроект беше да се проучи генетичната причина за вродени сърдечни аномалии на плода, установени чрез ултразвуково изследване. С работата по настоящата научна разработка колективът успешно въведе и оптимизира предварително подобраните молекулярно-генетични техники за диагностика на вродени сърдечни малформации. Подбраните техники включваха MLPA анализ за детекция на делеции в DiGeorge критичните региони, MLPA анализ за големи делеции/дупликации по дължината на гени, свързани с вродени сърдечни аномалии и секвенционен анализ за търсене на молекулни дефекти в гените *GJA1* и *NKX2-5*. Всички подобрани ДНК проби (20 на брой) бяха негативни за най-честите хромозомни аномалии. Проведените молекулярно-генетични изследвания в настоящата научна разработка, доведоха до установяване на причината за възникналата сърдечна малформация при 8 от изследваните 20 ДНК проби (40%). При 5 от изследваните 11 ДНК проби с ултразвукови данни за синдром на DiGeorge установихме делеция включваща генния локус 22q11.21, което потвърждава диагнозата синдром на DiGeorge. При една от тестваните ДНК проби установихме допълнителен генетичен материал включващ региона 22q11-q13. При една от подобраните ДНК проби установихме наличие на микродупликация в региона 22q11.21 (екзон 5 на *SNAP29* гена). При един фамилен случаи установихме микроделеция в региона 22q11.21 в ДНК проба от бащата, което обяснява появата на сърдечната малформация в поколенията. При изследваните ДНК проби с ултразвукови данни за хипопластично ляво сърце не открихме молекулни дефекти в гените *GJA1* и *NKX2-5*. Напредването на ултразвуковите технологии в последните години и възможностите за молекулярно-генетична диагностика допринасят за установяване на генетичната причина за пренатално установената сърдечна малформация. Това дава възможност за адекватно генетично консултиране в засегнатите

семейства, адекватна терапия и манипулация след раждането на пациент с вроден сърдечен дефект.

Научни публикации и прояви:

- Tsaneva S, Todorov T, Genova J, et al. The role of molecular genetic analysis in the diagnostics of congenital heart diseases. 12th Balkan congress of human genetics; 8th national conference for rare diseases, 8-10 Sep 2017, Plovdiv, Bulgaria

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-62/02.05.2017 г. Секвениране от ново поколение на пациенти с наследствена невросензорна слухова загуба за изясняване на генетичната причина за слуховата увреда

Изследователски екип: Проф. Диана Петрова Попова, дмн

- Доц. Радка Кънева
- Дарина Качакова-Йорданова, дб
- Калина Михова
- Рени Цвеова, дб
- Д-р Венера Добриянова

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по УНГ болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването е клиничното и генетично диагностициране на семейства с фамилна история за невросензорна слухова загуба (NSHL), определяне на клиничната и генетична характеристика на слуховата увреда чрез провеждането на таргетно новогенерационно секвениране. Изследвани са пациенти с NSHL, при които са отхвърлени чести генетични мутации, каквито са мутациите в конексиновите гени- Sx26, Sx30, Sx31 и носителство на митохондриални мутации. Бяха подбрани петима пациента и техните семейства. Генетична причина за слуховата загуба установихме в двама от тях. При DF210 се откри в хетерозиготно състояние вариантът с.853G>A(p.Gly285Ser) в екзон 6 на гена KCNQ4. Мутациите в него се свързват с развитието на автозомно доминантна слухова загуба. Генетична причина за NSHL се предполага и при пациент DF139 ,при който с помощта на CNV анализ проведен на VarSeq се откри дупликация на 51 базови двойки в ОТОА гена (16:21679026-21679076), засягащ екзон 3 и частично интрон 1-2 и интрон 2-3. Свързва се с клиничен фенотип при автозомно рецесивна слухова загуба. Необходим е и друг метод за потвърждение на резултата, получен при CNV анализа, който да се приложи първо при пробанда, а после и при останалите членове на семейството. При останалите пациенти- DF60 и DF182 откритите варианти са недостатъчни, за да се свържат с проявената клинична картина. При DF84 не се откриват патологични варианти, предполага се АД унаследяване. Причини за неоткриването на генетични причини за възникналата слухова загуба у семейства при семейства 1, 2 и 4 могат да бъдат неясни. До този момент не са открити всички гени, водещи до глухота. Не се изяснени напълно структурните, мутационните и епигенетичните промени свързани с развитието на глухота.

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-63/02.05.2017 г. Експресионен профил на фактори на ангиогенезата при спонтанни аборти

Изследователски екип: Доц. Иванка Исталианова Димова, дм

- Екатерина Николова, дб
- Мариела Христова-Савова
- Наталия Тръпчевска, докторант
- Магдалена Димитрова - САГБАЛ „Д-р Щерев“
- Момчил Ризов - МЦ „Репробиомед“

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Медицинска генетика, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: С настоящето изследване, за първи път в България е проведен експресионен анализ за фактори на ангиогенезата в децидуални тъкани от спонтанни аборти без изяснена причина в сравнение с контроли от аборти по желание, чрез метода на real time PCR. Средните нива на експресия на VEGFA при спонтанните аборти бяха 2.97 пъти по-високи в сравнение с тъканите от абортите по желание, а тези на VEGFR2 – 9.8 пъти по-високи. По отношение нивата на експресия на SDF-1 намерихме средно 22.2 пъти повишение в сравнение с контролите, а за неговия рецептор – 2.3 пъти средно повишение. Като се има предвид, че VEGFR2 и SDF-1 са молекули, които се експресират в ендотелните клетки, бихме могли да заключим, че е налице повишена ангиогенеза, т.е. гъстота на съдовата мрежа, при спонтанните аборти в сравнение с контролните тъкани. Това би могло да е отговор на повишената експресия на VEGFA от екстрацелуларните тъкани или на повишен брой специфична субпопулация uNK клетки, които експресират CXCR4. Обратно, последните биха могли да се натрупват в резултат на хемотаксичното действие на SDF-1 свръхекспресията от ендотела. Установена е повишена експресия на есенциални фактори за ангиогенезата, което предполага ексцесивна ангиогенеза в патогенезата на спонтанните аборти с неясна причина. Съвременни проучвания подчертават важността на ангиогенните фактори както в диагностиката, така и за терапията на спонтанните аборти.

Научни публикации и прояви:

- Rizov M, Kachakova D, Belemezova K, et al. Expression of angiogenic factors VEGFA/VEGFR2 and chemokines SDF-1/CXCR4 in spontaneous abortions. Eur Human Genetics Conference 2018, Milan, Italy

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-64/02.05.2017 Клонирание гените за токсигенност на шигатоксин продуциращи изолати *Escherichia coli* и проучване тяхното взаимодействие с клетъчния рецептор CD77

Изследователски екип: Чл.-кор. Проф. Иван Гергов Митов, дмн

- Гл. ас. Ирина Александрова, дб - БАН
- Гл. ас. Иво Сираков, дмн

- Ралица Попова-Илинкина, дvm – ОДБХ, Бургас
- Д-р Гургана Мизгова - Болница „Лозенец“.

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Медицинска Микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Инфекциите с ЕРЕС и STEC (ЕНЕС) са от съществено значение за човешката популация поради това, че най-често източник са храни, което е предпоставка за ендемични взривове. Във връзка с това, цел на проекта е проучване на български *stx* и *eae* изолати *E.coli*, чрез PCR – за определяне вида на интимин токсина, RAPD, MLST и въз основа на това да извършим клониране гените на токсигенност и включването им в дрождена двухбридна система за проучване на взаимодействието им с клетъчния рецептор CD77. Разработихме праймери и протоколи за разграничаване на *eae* гена. Определихме за първи път в България RAPD и MLST профила на *stx* и *eae* изолати, като установихме филогенетична връзка между някои от тях. Субединици А и В на гена *stx1* бяха клонирани успешно, но не получихме задоволителен резултат при използването им в дрождена двухбридна система. Една от вероятните причини може да е генетичният профил на използваните изолати, но са нужни допълнителни опити с изолати, носители на друг генетичен профил за потвърждение за това.

Научни публикации и прояви:

- Борисова Б, Александър И, Стратева Т, и др. Алгоритъм за определяне вида на интимин токсина кодиран от *eae* гена на *Escherichia coli*, SGIP 2018, Sofia, 3-5 October 2018;
- Sirakov I, Strateva T, Popova R, et al. Protocols for intimin toxin encoding genes differentiation and characterization in *Escherichia coli*. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria, Hisarya, 10-13 Oct 2018;
- Alexandrova I, Popova R, Mizgova G, et al. Analysis of protein-protein interactions of shiga toxins and their host cell receptor CD77 by yeast two hybrid system. Int Scientific Conference Kliment's Days, Sofia, 8-9 Nov 2018

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-65/02.05.2017 г. Изследване ефекта на третиране с агомелатин през епилептичен статус индуциран с каинова киселина върху механизмите регулации мозъчната реактивност при модел на темпорална епилепсия

Изследователски екип: Проф. Николай Еленков Лазаров, дмн

- Доц. Яна Чекаларова, доктор - БАН
- Ангел Дандов, докторант
- Доц. Димитринка Атанасова-Димитрова - БАН
- Ас. Лидия Кортенска - БАН
- Ас. Тодор Киров
- Полина Димитрова, студент
- Алберт Градев, студент
- Мария Динкова, студент
- Събина Митова

Базова организация: Катедра по анатомия, хистология и ембриология, Медицински университет, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: През последните години в научната литература се появиха данни за антиконвулсивна активност на антидепресанта агомелатин /Аго/ при остри гърчови тестове върху интактни животни. Настоящият проект имаше за *цел* да се изследва ролята на Аго, прилаган през кайнат /КА/-индуцирания епилептичен статус /ЕС/ върху епилептиформената активност през острата и хронична фаза на епилепсия, невроналната загуба и съпътстващите възпалителни отговори /активирана микроглия и астроцити/ у Wistar плъхове. За осъществяване на поставената цел бяха приложени следните методики: имплантиране на електроди за ЕЕГ регистрация, КА-индуциран ЕС, фармакологичен подход, денонощно видео-наблюдение ЕЕГ регистрация, морфологичен и имунохистохимичен метод. В *Експеримент #1*, Аго /40 мг/кг, и.п./, прилаган в определени интервали на ЕС /15 мин, 6, 24 и 48 час/ не показва ефективност по отношение на броя на ЕЕГ регистрираните пароксизми и тяхната продължителност в сравнение с лакозамид /50 мг/кг, и.п./, използван по същата схема като позитивна контрола. Не бе отчетена ефикасност на препарата и срещу спонтанната епилептиформена активност в сравнение с лакозамид при видео- и ЕЕГ регистрация 4 месеца след ЕС. В *Експеримент #2*, Аго и лакозамид бяха еднократно инжектирани през хроничната фаза на епилепсия с цел изследване на антиконвулсивна ефективност при еднократен прием. ЕЕГ-регистрираните пароксизми и тяхна продължителност не бяха повлияни от Аго, за разлика от лакозамида, който намали продължителността им в сравнение с групата, инжектирана с разтворител. Спектралният анализ на ЕЕГ регистрираната активност показва, че Аго и лакозамид намаляват относителните стойности на гама вълните във фронтална и париетална кора в сравнение с КА-третираната с разтворител група. Многократното прилагане на Аго оказва мощен невропротективен и анти-инфламаторен ефекти, потискайки КА-индуцираната микро- и астроглиоза в СА1 и СА3с полета на дорзален хипокамп. В заключение, Аго не повлиява епилептиформената активност при КА-индуциран пост-ЕС модел на темпорална епилепсия, но оказва невропротекция и потиска активираната глия и астроцити селективно в СА1 и СА3с полета на дорзален хипокамп. Бъдещи изследвания са необходими за установяване на конкретните механизми участващи в ефектите на изследваното лекарство.

Научни публикации и прояви:

- Atanasova D, Tchekalarova J, Ivanova N, et al. Losartan suppresses the kainate-induced changes of angiotensin AT₁ receptor expression in a model of comorbid hypertension and epilepsy. *Life Sci* 193 (2018) 40-46.
- Tchekalarova J, Atanasova D, Atanasova M, et al. Chronic agomelatine treatment prevents comorbid depression in kainate model of epilepsy through suppression of inflammatory signaling. *Neurobiol. Dis.* 2018;115:127-144.
- Stoyanova T, Ivanova N, Tchekalarova J, et al. Effects of Agomelatine and Lacosamide on kainate-induced status epilepticus, epileptogenesis and EEG seizure activity in Wistar rat. *Acta Morphol Anthropol.* 2018
- Lazarov N, Tchekalarova J, Atanasova D. Chronic agomelatine treatment suppresses the kainate-induced glial reaction during epileptogenesis in rats. XXIII Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Oct 5-7, 2017, Varna, Bulgaria.
- Dandov A, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Kainate-induced changes and the effect of losartan on angiotensin AT₁ receptor expression in limbic structures in a rat model of

comorbid hypertension and epilepsy. XXIII Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Oct 5-7, 2017, Varna, Bulgaria

- Tchekalarova J, Atanasova D, Atanasova M, et al. Antidepressant effect of chronic agomelatine treatment in kainate model of epilepsy-associated depression involves suppression of inflammatory signaling. Symposium Neurogenesis in the Developing and Adult Primate Brain - Challenges for Therapeutic Applications, May 19-20, Varna, Bulgaria.
- Tchekalarova J, Atanasova D, Kortenska L, et al. Agomelatine exerts neuroprotection against kainate-induced epileptogenesis without preventing the development of status epilepticus and spontaneous seizure activity in Wistar rats. Scientific Conference dedicated to the 70th Anniversary of the Inst Neurobiol Bulg Acad Sci 30.X.-01.XI.2017 Sofia
- Goranova P, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Effects of chronic treatment with agomelatine on seizure activity, comorbid behavioral changes and neuronal damage in the kainate model of temporal lobe epilepsy. XVI Int Congress of Medical Sciences, Breaking the barriers of Science, transforming Medicine. May 11-14, 2017, Sofia, Bulgaria
- Dinkova M, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Antidepressant effect of chronic agomelatine treatment in kainate model of epilepsy in rats involve suppression of inflammatory signaling. II Int Biomedical Congress of Sofia, Nov 17-19, 2017.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-66/02.05.2017 Image-based high content screening анализи на участието на протеин киназа СК2 в сигнализацията, обуславяща TGF β 2-индуцирания епително-мезенхимен преход на човешки епителни лещни клетки (LECs), изолирани от anterioren субкапсуларен катаракт

Изследователски екип: Акад. проф. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

- Гл. ас. Антония Исаева
- Ас. Виолета Димитрова, докторант
- Гл. ас. Олга Белчева
- Проф. Ива Петкова
- Доц. Иван Танев
- Васил Хайкин, докторант

Базова организация: МУ-София, МФ, катедра Медицинска Химия и Биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В настоящето изследване, за първи път у нас, бяха получени първични клетъчни култури от епителни клетки в лещата (LECs), изолирани от 10 броя пациентски оперативно премахнати anteriорни субкапсуларни катаракти (5 пациента с възрастоообусловена катаракта и 5 пациента с катаракта вследствие на диабет тип 2, на възраст 55 – 75 години). Беше установено, че времето за получаване на първични култури, изолирани от двете пациентски групи е различно - култивационния период за достигане на 70% клетъчна конфлуентност на LECs, изолирани от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта беше една седмица по-дълъг спрямо този на LECs, изолирани от пациенти с

възрастообусловена катаракта. Установената разлика във времето на удвояване на клетъчните популации е ценна нова информация, която индиректно доказва, че LECs, изолирани от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта се характеризират с по-слаби миграционна и пролиферативна активности *in vitro*. Същевременно, беше наблюдавана спонтанна диференциация *in vitro* на LECs, изолирани от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта – в 3 от първичните култури беше установена промяна в морфологията от кубична във фибробластоподобна. В хода *in vitro* култивирането на хетерогенните култури (съставени от LECs и фибробластоподобни клетки) беше наблюдавано формирането на празни пространства между фибробластоподобните клетки и колонии от LECs, които мимикрират *in vitro* Elschnig's Pearls, наблюдавани в множество постоперативни лещни капсули *in vivo*. Получените *in vitro* хомогенни LECs култури бяха подложени на 24-часова стимулация с човешки рекомбинантен TGFβ2 растежен фактор и индуцираните от това промени във функционирането на ERK1/2 и реорганизацията на цитоскелета – експресия на LECs цитоскелетния белтък vimentin и на характерния за трансдиференциралите LECs - αSMA, бяха установени чрез автоматизиран едновременен скрининг в реално време на мултифлуоресцентна микроскопия (Image-based high content screening анализи). Анализите показаха, че TGFβ2 статистически достоверно стимулира активността на ERK1/2, което корелира с появата на експресиран αSMA. Същевременно, успешно беше манипулирана каталитичната субединица (α) на протеин киназа CK2 чрез siRNA-медирано заглушаване на ендегенната ѝ експресия в LECs културите и последващите от това ефекти върху TGFβ2-индуцираната трансдиференциация бяха изследвани чрез Image-Based High Content Screening анализи. Проведените анализи доказаха, че заглушаването на експресията на CK2α статистически достоверно потиска TGFβ2-индуцираната повишена активност на ERK1/2 и понижава TGFβ2-индуцираната експресия на αSMA. Обобщено, тези оригинални данни доказват, че сигналът на TGFβ2 се трансдуцира по ERK1/2-зависима сигнализация, регулирана от протеин киназа CK2, която води до експресията на неепителния цитоскелетен белтък αSMA в *in vitro* култивирани LECs, изолирани от пациентски експланти.

Научни публикации и прояви:

- Хайкин В, И Танев, И Петкова, и др. Изследване на миграционна и пролиферативна активност и спонтанна диференциация на човешки първични лещно-епителни култури от пациенти с възрастообусловена и диабет тип II-индуцирана катаракта. „Новости в офталмологията. Катаракта – Рефрактивни аспекти“ 23-25 ноември 2018, Правец.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-67/02.05.2017 Роля на канабиноидната и серотонинергичната невротрансмитерни системи върху ноцицепцията, предизвикана от студов стрес при плъх

Изследователски екип: Гл. ас. Христина Христова Ночева-Димитрова, дм

- Проф. Александър Стойнев, дм
- Доц. Роман Ташев, дм
- Гл. ас. Радка Тафраджийска, дм

- Ас. Мимоза Цветкова
- Ас. Зафер Сабит
- Д-р Димитър Кочев
- Алекса Андонов, студент

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по патофизиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Функционалните и структурни промени в организма, настъпващи в условия на стрес в резултат на сложното взаимодействие между ендокринната, имунната и централната нервна системи, могат да отключат различни, т.нар. „стрес-индуцирани състояния и заболявания”, някои от които социално значими: исхемична болест на сърцето, артериална хипертензия, захарен диабет, язвена болест, Базедова болест, онкологични заболявания, депресия, нарушения на съня, апетита, репродуктивните функции и др. Изучаването на механизмите на развитие на стреса би дало практически насоки за намаляване отрицателното му въздействие върху организма. Целта на проекта бе изучаване ролята на канабиноидната и серотонинергичната невротрансмитерни системи върху болковата перцепция след стрес при плъхове с помощта на експериментални ноцицептивни методи. Използван бе метод за предизвикване на студов стрес. Болковата перцепция бе определяна посредством методи с прилагане на механично (*Paw pressure test*) и термично (*Hot plate test*) дразнене. Получените резултати потвърдиха хипотезата на научния екип: ендогенната канабиноидна и серотонинергичната невротрансмитерни системи си взаимодействат и взаимно повлияват болковата перцепция след стрес. Съвместното въвеждане на АЕА и DPAT при животни след 1ч СС повишава болковия праг на експерименталните животни спрямо този на животните след 1ч СС. Антагонизирането както на канабиноидните CB1-рецептори с AM251, така и на 5HT_{1A}-рецепторите с NAN непосредствено след края на 1ч СС и преди въвеждането на АЕА и DPAT променя описаното по-горе взаимодействие между агонистите и понижава болковия праг спрямо този на животните след 1ч СС . Получените резултати подсказват, че във взаимодействието между двете системи – ендогенна канабиноидна и серотонинергична, вероятно участват и други системи – напр. опиоидната, адренергичната, азотно-окисната и др., които променят описаното взаимодействие между двете изследвани системи. Подобни взаимодействия биха могли да залегнат в основата на бъдещи научни проекти – така например би било интересно проследяването на взаимодействието на двете системи – ендогенна канабиноидна и серотонинергична, като въвеждането на агонистите/антагонистите на съответните рецептори става преди индуцирането на стрес, а не след – както заложено по настоящия проект.

Научни публикации и прояви:

- Tzvetkova M, Sabit Z, Vidinova C, et al. Cannabinoid and serotonergic systems in modulation of stress-induced analgesia. CR Acad Bulg Sci 2019

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-68/02.05.2017 г. Модулиране на паметовите процеси от ангиотензин II и лосартан въведени в амигдала на плъхове с модел на депресия

Изследователски екип: Доц. Роман Емилов Ташев, дм

- Проф. Александър Стойнев, дмн
- Гл. ас. Радка Тафраджийска, дм
- Гл. ас. Христина Ночева, дм
- Ас. Мимоза Цветкова
- Ас. Зафер Сабит, дмн
- Димитър Кочев, докторант
- Тодор Тороманов, студент
- Людмила Янкова

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Патолофизиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Ангиотензин II (Ang II) е един от най-основните ангиотензинови пептиди, който свързва селективно AT1 и AT2 рецепторите. Голямата депресия е една от основните причини, която води до инвалидност в световен мащаб. Двустранната олфакторна булбектомия (ОВХ) е широко използван модел на депресия при животни. Бяха проучени ефектите на Ang II (0.5 µg) и лосартан (100 µg), специфичен антагонист на Ang II тип I (AT1) рецепторите, инфузирани едностранно или двустранно в централното ядро на амигдала (CeA) върху авойданс обучението на ОВХ плъхове като бяха използвани тест за активно избягване (shuttle box) и тест за пасивно избягване (step through). В групата, която не е с ОВХ (sham operated), беше установено, че Ang II микроинжектиран двустранно или в лявото CeA влошава обучението и паметта (shuttle box and step through) в сравнение с контролите, третирани с физиологичен разтвор. Ang II инфузиран в дясното CeA не повлиява критериите за обученост. Лосартан, микроинжектиран двустранно или в лявото CeA, подобрява обучението и паметта, докато лосартан приложен в дясното CeA не ги повлиява в сравнение със съответните контроли (shuttle box and step through). Ang II инфузиран двустранно или само в лявото CeA на фона на развито депресивно-подобно състояние (ОВХ) влошава обучителните и паметовите процеси, докато лосартан приложен двустранно или в ляво, подобрява паметта на ОВХ плъховете, в сравнение със съответните ОВХ контроли (shuttle box and step through). Паметта се подобрява след инхибиране на AT1 рецепторите в лявата амигдала в сравнение с дясната амигдала. Установено е, че лосартан обръща паметовия дефицит, вследствие на булбектомията, за разлика от Ang II, което го задълбочава. В заключение, това проучване за първи път предоставя информация за латерализиран модулиращ ефект на лосартан, инфузиран в CeA върху паметовите дефицитите на ОВХ плъховете. Предимно лявото CeA е включено в положителния ефект на лосартан върху обучението и паметта. Предлага се възможната роля на AT1 рецепторите в депресиите.

Научни публикации и прояви:

- Sabit Z, Tashev R. Effects of angiotensin II and losartan infused into amygdala on learning and memory in rats with a model of depression. 70 years Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, Scientific Conference, 30 Nov-1 Dec 2017, Sofia, pp.22.
- Sabit Z, Tzvetkova M, Nocheva H, et al. Role of angiotensin II and losartan infused into amygdala on learning and memory in rats with a model of depression. VIII Bulgarian Peptide Symposium, 8 -10 Jun 2018, Stara Zagora, Bulgaria.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-69/02.05.2017 Пост-ваксинален ефект на 10-валентната пневмококова конюгирана ваксина (PHiD-PCV10) върху етиологията на заболяването остър среден отит (АОМ) и носителство на отопатогенни бактерии при деца с АОМ през 2015-2016 г.

Изследователски екип: Проф. Лена Петрова Сечанова, дм

- Гл. ас. Иво Сираков, дм
- Ас. Вирна-Мария Циту
- Калина Михова

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на темата беше да се определи етиологичната структура и антимикробната резистентност на причинителите на детския остър среден отит (АОМ) и носителството на отопатогенни бактерии от деца с АОМ след старта на масовата имунизация с 10-валентната пневмококова конюгирана ваксина PCV10. Анализирани бяха серотиповете и клоналната структура на полирезистентни (MDR) *S. pneumoniae* изолирани в периода след включването на ваксината у нас в имунизационния календар. Секрет от средното ухо (MEF) след спонтанна перфорация или парацентеза беше изследван от 240 деца с усложнен АОМ в периода 2012-2016. Най-честите причинители бяха: *S. pyogenes* (31%), *S. aureus* (21%), *S. pneumoniae* (20%) и *H. influenzae* (12%). Назофарингеален секрет (НФГ) беше взет от 185 деца с неусложнен АОМ епизод през 2015-2017 г. Сред изолираните бактерии от НФГ секрета, най-честите отопатогени бяха: *S. pneumoniae* (42%), *H. influenzae* (26%), *M. catarrhalis* (23.0%) и *S. pyogenes* (14%). Клинично-проблемна беше антибиотичната резистентност при *S. pneumoniae* и макролидната резистентност при *S. pyogenes* (32%). От 79 пневмококи изолирани от деца с АОМ, 52% бяха нечувствителни към penicillin, macrolides и полирезистентни щамове. Рязко спадане, до 11% на ваксиналните PCV10 серотипове в НФГ секрета на деца с АОМ беше установено през последните две години. Пропорционално се увеличиха неваксиналните серотипове (NVTs) пневмококи. Най-честите MDR *S. pneumoniae* серотипове принадлежаха към неваксиналните 19A, ново-появили се серотип 6C, 6A, 15A и 23A. MLST генотипирането на 79 MDR серотипове показва че, 75% от тях принадлежаха към международно-известни eBURST клонални комплекси (CCs), като най-честите MLST секвенционни типове (STs) бяха ST320 (19A и 19F), ST386 (6C), ST8029 (23A), и ST180 (серотип 3). Широко разпространение на високо-резистентния и вирулентен клонален комплекс CC320 (Taiwan^{19F}-14), свързан със серотип 19A беше изолиран често сред деца. В пост-ваксиналния период беше наблюдавано смяна на генотипа на серотип 19A при сигнификантно намаление CC230 (Denmark¹⁴-32), който преобладаваше преди включването на PCV10 в България. Клоналното разпространение беше една от причините за високо ниво на резистентност сред пневмококите понастоящем.

Научни публикации и прояви:

- Комитова Р, Сечанова Л, Боев И. За серотиповото заместване и конюгираните пневмококови ваксини. Педиатрия. 2017;LVII (2):49-52.
- Alexandrova A, Setchanova L, Mitov I, et al. Emerging serotype 6C *Streptococcus pneumoniae* isolates after the implementation of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. CR Acad Bulg Sci. 2019

- Setchanova L, A. Alexandrova, D. Pencheva, et al. Rise of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones expressing nonvaccine serotypes among children after introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Dec;15:6-11
- Сечанова Л. Пневмококови конюгирани ваксини - ефективен инструмент на общественото здраве и перспективи. Симпозиуми „Акад. Чудомир Начев”, 5, 27 май, 2017
- Setchanova L, Alexandrova A, Sirakov I, et al. Rise of multidrug resistant non-vaccine *Streptococcus pneumoniae* clones after implementation of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. X Balkan Congress of Microbiology (Microbiologia Balkanica' 2017), 16-18 Nov 2017, Sofia, Bulgaria.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-70/02.05.2017 Влияние на промоторния полиморфизъм rs266729 върху транскрипционната регулация на адипонектиновия ген (ADIPOQ) при нормално протичаща бременност и гестационен диабет

Изследователски екип: Гл. ас. Олга Живанова Белчева, дб

- Ас. Мария Бояджиева-Владиминова, дм
- Д-р Яна Христова
- Рени Цвеова, дб - Селскостопанска Академия
- Д-р Мария Гичева-Еленкова - Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда
- Доц. Виолета Димитрова, дм
- Проф. Радка Кънева, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн

Базова организация: МУ-София, МФ, катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Адипонектинът е специфичен за мастните клетки секреторен белтък, който играе важна роля за регулацията на метаболизма. Нарушения в адипонектиновата секреция и сигнализация са един от факторите допринасящи за появата на инсулинова резистентност, метаболитен синдром и диабет тип 2. Предходни проучвания на нашия колектива, целящи изясняване на генетичните фактори с роля в патогенезата на гестационния диабет, показаха наличие на асоциация между rs266729, полиморфизъм разположен 5' upstream от гена за адипонектин, ADIPOQ и индивидуалния риск от инсулинова резистентност по време на бременността. Еднонуклеотидният вариант се намира в позиция -11 377 бд, в рамките на секвенция, за която се предполага, че съдържа енхансерни или силенсерни елементи, участващи в регулацията на експресията на ADIPOQ. Целта на настоящето изследване бе да се установи дали в ядрени екстракти от мастна тъкан се съдържат белтъчни фактори, които специфично разпознават и свързват секвенцията около rs266729. Изолирани бяха ядрени екстракти от мастна тъкан на бременни жени (ГДМ и нормално протичаща бременност), взети по време на планирано родоразрешение, секцио. Белтъчните проби бяха използвани за провеждане на електрообилно изместване, EMSA, с биотин белязани ДНК сонди комплементарни на секвенцията непосредствено оградяща rs266729. Резултатите от изследването показват,

че секвенцията около rs266729 действително е място за свързване на белтъчни фактори от ядрени екстракти от мастна тъкан на бременни жени. Това взаимодействие е специфично и засяга малък участък от около 35 бд. Това потвърждава предположението, че 5' upstream секвенцията на ADIPOQ съдържа енхансерни/силенсерни елементи и има отношение към регулацията на неговата експресия. До този момент единствените данни в подкрепа на тази хипотеза бяха събрани в хода на експерименти с клетъчни линии, а не с първичен биологичен материал от тъкан, характеризираща се с естествена активност на изследвания ген. Настоящото проучване изяснява още един елемент от комплексния механизъм за регулация на активността на гена за адипонектин, адипоцитокин с ключова роля за патогенезата на ГДМ.

Научни публикации и прояви:

- Белчева О. Вариации в регулацията на адипонектиновия ген и индивидуален риск за развитие на диабет. Симпозиуми „Акад. Чудомир Начев“: Генетика и епигенетика на човешките болести. София. 24.10.2018

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-71/02.05.2017 Проучване на ефекти на мезембринови алкалоиди, медиранни от серотонин и цАМФ, върху поведението на плъхове при експериментален модел на захарен диабет тип 1

Изследователски екип: Проф. Александър Георгиев Стойнев, дмн

- Проф. Страхил Берков - БАН
- Доц. Даниела Пехливанова - БАН
- Доц. Яна Чекаларова - БАН

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Патолофизиология, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Захарният диабет повишава риска от развитие на коморбидно депресивно разстройство. Наши предходни изследвания показаха депресивно-подобно поведение при женски плъхове с нетретиран захарен диабет тип 1. Мезембриновият тип алкалоиди (МЗМ) с високо съдържание в някои растителни източници имат предполагаем антидепресивен и стимулиращ ефект. Настоящият проект има за цел за изясни последствията от хроничното третиране с МЗМ екстрахирани от *Narcissus cv. "Hawera"* върху възникналите като усложнение от захарния диабет депресивен тип поведение у женски плъхове от порода Wistar. Експериментите бяха проведени върху женски плъхове от порода Wistar и мишки ICR от двата пола. Поведенчески методи: "Forced swimming"; "Sucrose preference"; „Open field; „Elevated plus maze“; "Tail suspension"; SMART PanLab software. Биохимични методи: газова хроматография, GC-MS; SOD Assay Kit-WST; Карбонилирани протеини; COP; DPPH, HPLC за определяне на нива на серотонин и цАМФ в мозъчни структури. Алкалоидната фракция, екстрахирана от *Narcissus cv. "Hawera"* има уникално съотношение на мезембринови алкалоиди, които приложени еднократно в дози 25 и 50 мг/кг имат стимулиращ двигателната активност и инхибиращ депресивно-подобното поведение у мишки от двата пола. Хроничното третиране с мезембриновата фракция у женски контролни плъхове предизвика антидепресивно и анксиолитично поведение, подобрена хабитуация към непозната среда, без да промени

съществено общата двигателна активност. Хроничното третиране с MZM понижи диабет-индуцираната полидипсия и полиурия, подобри хабитуацията към непозната околна среда, без съществен ефект върху диабет-индуцираната депресия и понижена двигателна активност. Тези резултати ни дават основание да считаме, че мезембриновата фракция алкалоиди има благоприятен ефект върху емоционално обусловените форми на поведение при здрави индивиди, вероятно с механизъм на действие различен от този при диабет-индуцираните усложнения, свързани с хипоактивност и депресивно-подобно поведение. Тези първоначални изследвания дават насоки за бъдещи проучвания и потенциално приложение на този тип алкалоиди като стимуланти и в терапията на депресивните разстройства.

Научни публикации и прояви:

- Pechlivanova D, Nikolova M, Berkov S. Effects of mesembrine fraction from *Narcissus cv. "Hawera"* on anxiety and depression-like behavior in mice. Scientific Meeting of Bulgarian Society of Physiological Sciences, Sofia, Bulgaria, 03 Nov 2017.
- Каранук R, Pechlivanova D, Berkov S, et al. Effects of mesembrine alkaloids isolated from *Narcissus cv. "Hawera"* on depressive-like behavior in healthy and diabetic female rats. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 10–13 May 2018.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-72/02.05.2017 Фармакологично проучване на ефекти на пиоглитазон в експериментален модел на аутизъм

Изследователски екип: Доц. Мирослава Георгиева Варадинова, дм

- Проф. Надка Бояджиева
- Гл.ас. Георги Богданов
- Калина Каменова
- Росица Методиева
- Женя Стефанова, студент
- Таня Стефанова, студент

Базова организация: Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Създаден е експериментален модел на аутизъм в поколението на женски плъхове, третирани по време на бременността с валпроева киселина (600 мг/кг, i.p.). Проследиха се ефектите от 21-дневно приложение на пиоглитазон (2 мг/кг, p.o.), рисперидон (1 мг/кг p.o.) и пробиотик (1%, p.o.) самостоятелно и в комбинация върху метаболитни показатели (телесно тегло, нива на кръвна глюкоза на гладно), параметри на ноцицепция (време за реакция на топлинен болков стимул в tail-flick тест), показатели на обучение и памет (латентно време и брой грешки в shuttle-box тест), стойности на проинфламаторни цитокини (серумни нива на IL-1beta и IL-6) и концентрация на невротрофични фактори BDNF и GDNF в серум на опитните животни. Преди третиране на животните с изследваните субстанции се наблюдава значително по-ниско тегло в групите с експериментален аутизъм в сравнение с контролните животни. В допълнение, след третиране на плъхчетата с експериментален аутизъм с комбинация от рисперидон с пробиотик, както и пиоглитазон с пробиотик беше отчетено повишаване на средното телесно тегло на плъхчетата, сравнено с това при контролните групи. Плъхчетата с

експериментален модел на аутизъм демонстрираха понижен болков праг, но след приложение на изследваните субстанции се наблюдава благоприятен ефект по този показател. Най-съществено удължаване на времето за реакция на болка се наблюдава в групите, третирани с комбинация от рисперидон + пиоглитазон и рисперидон + пробиотик. При провеждане на shuttle-box тест в периода на обучение, най-съществено скъсяване на латентното време се регистрира при контролните плъхчета, третирани с пиоглитазон, следвани от групите с аутизъм, третирани с комбинация от пиоглитазон и рисперидон или рисперидон и пробиотик. Най-значимо понижаване на нивата на IL-6 в сравнение с контролната група се регистрира в групата с аутизъм, приемала комбинация от пиоглитазон и пробиотик, а на IL-1 beta – в групите с експериментален аутизъм, получавали комбинация от пиоглитазон и пробиотик или пиоглитазон и рисперидон. Най-високи стойности на BDNF и GDNF се регистрират в групата с експериментален модел на аутизъм, третирана с комбинация от пиоглитазон и рисперидон. Взети заедно, нашите резултати допускат важна роля от комбинираното приложение на пиоглитазон, рисперидон и/или пробиотик, за подобряване на невропластичността, при пациенти с разстройства от аутистичния спектър. В допълнение, нашите данни показват значимостта на невровъзпалението, микробиома, функцията на оста ГИТ-ЦНС и потенциалното благоприятно действие на използваните субстанции в терапията на симптоми на аутизъм и други разстройства на невроналното развитие.

Научни публикации и прояви:

- Stefanova T, Stefanova Z, Bogdanov G, et al. Experimental treatment of autistic rats: effects on learning and memory. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, May 2018.
- Stefanova Z, Stefanova T, Bogdanov G, et al. Metabolic parameters after combined treatment in an experimental model of autism. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, May 2018.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-73/02.05.2017 Сравнително изследване на антидепресивните и имуномодулиращите ефекти на Escitalopram в условия на обогатена и изолирана среда за живот

Изследователски екип: Гл. ас. Евгений Юриев Харитов, дм

- Доц. Весела Райкова, дм

Базова организация: МУ – София, МФ, МУ-София, Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящето изследване е оценка на антидепресивния и имуномодулиращия ефект на антидепресанта есциталограм при самостоятелно прилагане или комбинирано с метода „обогатена среда за живот”. Експерименталните животни бяха обект на поведенчески тестове за депресивност (тест за принудително плуване-FST и тест за консумация на захароза-SPT), последвани от ELISA на мозъчен хомогенат за определяне нивата на IL-1beta.

Резултатите от изследването показаха, че самостоятелното прилагане на есциталограм или метода „обогатена среда”, респективно, водят до редуциране времето на неподвижност в

теста за принудително плуване (FST), в сравнение с резултатите от групата животни със самостоятелно прилагане на LPS. Тези данни ясно показват антидепресивните ефекти на двата подхода. От особено значение е факта, че най-изразено редуциране на времето за неподвижност в FST се наблюдава в групата със комбинирано прилагане на антидепресанта и метода „обогатена среда”. В SPT-теста, свързан с анхедонията при животните се наблюдаваха същите тенденции, както в FST. От друга страна резултатите от ELISA-метода за IL-1beta от мозъчен хомогенат, проведен след поведенческите тестове, показаха също най-изразено редуциране в нивата на IL-1beta в групата с комбинирано прилагане на есциталопрам и „обогатена среда”. Взети заедно, резултатите от поведенческите тестове и ELISA-метода, показват, че ефекта от прилагането на антидепресанта зависи от условията на средата за живот. Нашите резултати показват, че в основата на това влияние на средата за живот, стои нейното усилващо действие върху антиинфламаторните свойства на антидепресанта прилаган в настоящето проучване. В заключение, нашите резултати дават основание да се допуска, че манипулирането на средата за живот по време на антидепресивната терапия е нова и атрактивна стратегия за повлияване на фармакорезистентните форми на депресия.

Научни публикации и прояви:

- Харитов Е, Кирков В, Киркова М и др. Механизми и ефекти на средата за живот върху ЦНС и психичните заболявания. Топмедика, бр. 2, 2018
- Харитов Е, Ангелов Т, Кирков В и др. Синергични ефекти от комбинираното прилагане на есциталопрам и обогатена среда за живот при LPS-индуциран неонатален модел на депресия при плъхове. Неврология и психиатрия, бр. 2, 2018
- Харитов Е, Ангелов Т, Ангелеска Е и др. Обогазената среда и активния начин на живот: морфологични и функционални ефекти върху ЦНС. Неврология и психиатрия, бр. 2, 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-74/02.05.2017 Сравнителна оценка на ефекти на 2Н-хромен- и кумарин-субституирани хидразид-хидразони върху нивата на експресия на провъзпалителни цитокини при гърчов модел с максимален електрошок (MES test) и при тест за ноцицепция с формалин при мишки

Изследователски екип: Проф. Славина Кирилова Сурчева, дм

- Доц. Павлина Гатева, дм
- Доц. Виолина Стоянова
- Гл. ас. Юлиан Войников
- Доц. Яна Чекаларова – БАН
- Проф. Румяна Цонева – БАН
- Валентин Карабельов, студент
- Борян Спасов, студент

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Селектирани са пет наскоро синтезирани 2Н-хромен и кумарин-субституирани хидразид-хидразони с установена противогърчова активност и определени

стойности на ED50, които са тествани за аналгетична активност с тест гореща плоча и с формалиновия тест в дози, еквивалентни на ED50 за MES теста. С помощта на Mouse Cytokine Array Panel A kit (R & D systems, a biotechne brand) полуколичествено е сравнена експресията на 40 различни цитокина в пулове от мозъчни хомогенати от мишки при предизвикване на гърчове с MES-теста, при предизвикване на болка с формалиновия тест, съответно със или без предварително третиране на опитните животни с тестваните вещества. В търсене на възможни обяснения на наблюдаваните противогърчови и аналгетични ефекти, е направен и in silico анализ на тестваните вещества с помощта на PASS Way2Drug. Като общ механизъм на действие за 5-те тествани вещества беше предсказан ефект на активиране на митохондриалния ензим HMGCS2 – ключовият ензим в синтеза на кето-тела. Имайки предвид факта, че кетогенната диета е един от успешните методи за лечение на епилепсия при част от пациентите, приемаме, че вероятно и при тестваните от нас вещества един от възможните механизми за установената противогърчова активност би могло да бъде повишената кетогенеза – механизъм, който би следвало по-нататък да бъде по-подробно проучен с оглед и на връзката му с намаляване продукцията на редица цитокини.

Научни публикации и прояви:

- Karabelyov V, Andreeva-Gateva P, Kamenova K, et al. In silico evaluation and in vivo testing of hydrazide-hydrazones bearing 2H-chromene and coumarin scaffold for analgesic activity. Национална студентска конференция по фармацевтични и химични науки 19-20 април 2018, София, България
- Marchev S, Andreeva-Gateva P, Tzonev A, et al. Experimental study on the analgesic and antiseizure activity of newly synthesized hydrazide-hydrazones derivatives bearing 2H-chromene and coumarin scaffolds. XVIII World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 1-6 Jul 2018, Kyoto, Japan
- Tsonev A, Marchev S, Andreeva-Gateva P, et al. An evaluation of the antinociceptive properties of newly synthesized hydrazide-hydrazone derivatives. ICMS 2018

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-75/02.05.2017 Изясняване ролята на подобрени полиморфни варианти в гени, асоциирани със стойностите на артериалното налягане, по отношение на риска за развитие на исхемична болест на сърцето

Изследователски екип: Доц. Радка Петрова Кънева, дб

- Доц. Добрин Василев, дм
- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Ас. Лилия Владимирова
- Гл.ас. Теодора Янева-Сиракова, дм
- Рени Цвеова, дб
- Моника Шумкова, докторант

Базова организация: МУ-София, МФ, катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия проект е да се анализира приноса на полиморфни варианти, показали асоциация със стойностите на артериалното налягане при

провеждането на геномни асоциативни проучвания в или в близост до гените и хромозомни локуси *CYP17A1* и *PLEKHA7* за развитието на исхемична болест на сърцето и/или миокарден инфаркт при пациенти от български произход. Изследвани бяха 100 последователни пациенти с доказана ангиографски ИБС, които отговарят на включващите критерии. На всички се проведе: анамнеза, статус, лабораторен минимум, ЕКГ, ЕхоКГ и ултразвук на каротиди, артериално налягане, индекс глезен-мишница. Генотипен анализ се осъществи чрез 7900 HT Fast Real-Time PSR (Applied Biosystems) посредством TaqMan® метод. За контролна група бяха използвани генотипния анализ на здрави индивиди от базата данни на Центъра по молекулярна медицина. Статистически програми: PRINk и SPSS19 при ниво на значимост <0.05 и доверителен интервал 95%. Средна възраст - 63.71±9.35 г; жени 35 (35%). Преживели миокарден инфаркт - 38 (38%); с едноклонова коронарна болест 39 (39%); с двуклонова – 28 (28%) и с триклонова – 34 (34%); 43 (43%) - със захарен диабет; с артериална хипертония - 92 (92%); с дислипидемия - 77 (77%); 42 (42%) са пушачите; 25 (25%) – със затлъстяване. Анализът на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми: rs11191548 в близост до гена *CYP17A1* и rs381815 в гена *PLEKH7* не показва значима разлика в разпределението при пациенти с ИБС в сравнение със здравите контроли ($p>0.05$). Изследва се връзката между гени, свързани с артериална хипертония и множество метаболитни пътища на половите хормони, кортикостероидите (*CYP17A1*); калциева мембранна обмяна и междуклетъчните свързвания (*PLEKHA7*) и ИБС. При тестване зависимостта между полиморфизмите rs11191548 *CYP17A1* и rs 381815 *PLEKHA7* от една страна и наличието на доказана ИБС с ранно начало и/или фамилност от друга, не беше открита асоциация. Резултатът е с важно практическо значение т.к. спомага за изясняване на генетичните аспекти на ИБС при българи, дава насоки за бъдещи изследвания; обогатява базата данни.

Научни публикации и прояви:

- Янева-Сиракова Т, Цвеова Р, Кънева Р и др. Могат и да имат роля полиморфни варианти на *CYP17A1* и *PLEKHA7* гените в развитието на исхемичната болест на сърцето – гледната точка на клинициста. Сърдечно-съдови заболявания. 2018;1:3-7.
- Tzveova R, Yaneva-Sirakova T, Kaneva R, et al. Population study of the frequencies of *CYP17A1* rs 11191548 and *PLEKHA7* rs 381815 in Bulgarians (Eastern European Population). Eur meeting on Hypertension and Cardio-vascular Protection. Jun 2018. Barcelona, Spain.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-77/02.05.2017 Изследване на копийни варианти при пациенти с болест на Паркинсон

Изследователски екип: Доц. Албена Кирилова Йорданова, дб

- Чл.-кор. Проф. Лъчезар Трайков, дм, дмн
- Доц. Шима Мехрабиан-Спасова, дмн
- Гл. ас. Мария Петрова, дм
- Доц. Маргарита Райчева, дм
- Калина Михова
- Доц. Радка Кънева, дб

- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Основната цел на настоящето изследване е анализ на копийни варианти при български пациенти с болест на Паркинсон (БП). 80 пациента и 100 контролни индивида бяха подбрани, като 69 от тях бяха изследвани с MLPA китове P051-D1, P052-D1 Parkinson, P275-C3 MAPT-GRN и P471-A1 EOFAD, а всички бяха изследвани за шест нуклеотидни GGGGCC повтори, водещи до експанзии в *C9orf72*. При 9 пациента бяха открити копийни варианти – 11.6% чрез МЛПА анализа и при 1 пациент експанзия. При предишни проекти бяха открити малки делеции и инсерции и точкови мутации при 52% от пациентите чрез новогенерационно секвениране в гени *LRRK2*, *PINK1*, *PARK7*, *ATP13A2*, *FBXO7*, *PSEN1*, *PSEN2*, *CHMP2B*, *GRN*, *MAPT*, *EIF4G1*, *PARK2* и *PARK7*. Изследването за големи копийни варианти подпомогна директно изясняване на генетичната диагноза при трима от пациентите, както и поставяне на генетична диагноза чрез откритите варианти в комбинация с открити варианти в хетерозиготно състояние при рецесивен тип на унаследяване от предходни изследвания. Така процентът на пациенти, при които е изяснена генетичната диагноза се повишава до 65%. Шест нуклеотидните експанзии в ген *C9orf72* са с ниска честота в българската популация. Откритите копийни варианти са в гени *UCHL1*, *PSEN2*, *APP* и *PARK2*. Откритите варианти допринасят за изясняването на молекулните основи на заболяването, както и разпространението им в българската популация. Обобщаването с получените резултати с данните от предходни проекти ни позволи да направим системен ход при изследване на пациенти с БП и тяхното генетично консултиране и диагностициране.

Научни публикации и прояви:

- Mihova K, Verstraeten A, Theuns J, et al. Targeted genetic analysis of Parkinson disease in Bulgarian patients, Eur Human Genetics Conference, 16-19 Jun 2018, Milan, Italy

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-78/02.05.2017 *In vitro* и *in vivo* изследвания на новосинтезирано производно на галантамина с мощна антихолинестеразна активност

Изследователски екип: Проф. Ирини Атанас Дойчинова-Цекова, дхн

- Проф. Вирджиния Цанкова
- Доц. Георги Ставраков
- Доц. Весела Вичева
- Доц. Румяна Симеонова
- Гл. ас. Ива Вълкова
- Гл. ас. Деница Алуани
- Ас. Иванка Костадинова

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Ацетилхолинестеразните (AChE) инхибитори с двойно свързване към ензима са предназначени да инхибират както каталитичния център, така и периферния анионен домейн, свързан с амилоидогенезата, и да действат като многоцелеви лиганди. В настоящото изследване прилагаме серия от *in vivo* и *in vitro* тестове на нов AChE

инхибитор с двойно свързване с цел оценка на токсичност, анти-AChE активност *in vivo*, антиоксидантни свойства и ефект върху когнитивните функции като обучение и памет. Новият инхибитор е по-малко токсичен от галантамин (GAL) и има сходни антиоксидантни свойства. Въпреки, че новият инхибитор е 1008 пъти по-активен *in vitro* от GAL, *in vivo* активността му срещу AChE е по-ниска. Той преминава КМБ чрез пасивна дифузия, но не и чрез активен транспорт, в резултат на което се получава по-ниска бионаличност в мозъка от тази на GAL. Това препятствие трябва да се има предвид при създаването на AChE инхибитори с двойно свързване.

Научни публикации и прояви:

- Simeonova R, Vitcheva V, Kostadinova I, et al. *In vivo* and *in vitro* studies on novel potent acetylcholinesterase inhibitor with dual-site binding for treatment of Alzheimer's disease. Mol. Pharm.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-79/02.05.2017 Елицитиране продукцията на арилтетралинови лигнани в клетъчни системи *in vitro*

Изследователски екип: Проф. Илиана Илиева Йонкова, дфн

- Янчо Зарев, докторант
- Павлинка Попова
- Вилма Пошева

Базова организация: МУ-София Фармацевтичен факултет, Катедра по фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на този проект е да се определи влиянието на 50, 100 и 150 μM метил жасмонат върху натрупването на биомаса и върху производството на арилтетралин лигнани в суспензионни култури на *Linum thracicum* ssp. multiflorum. Количеството на подофилотоксин (РТОХ), 6-метокси подофилотоксин (6-МТТОХ) и ацетил подофилотоксин (ацетил РТОХ) бе изследват чрез LC-MS анализ. Нашите резултати показват, че най-голямо количество биомаса ($GI = 2,53$) на растителните клетки на *Linum thracicum* ssp. multiflorum се наблюдава при 136-ия час от култивирането в пробата, нетретирана с метил жасмонат, докато най-ниското количество ($GI 0.28$) се открива на 72-ия час в пробата, третирана с 50 μM метил жасмонат. Производството на РТОХ се увеличава 5 пъти чрез предизвикване с 100 μM метил жасмонат на 48-ия час от култивирането на растителните клетки в сравнение с необработените култури. Най-висока концентрация на 6-МРТОХ ($8.5 \times 10^{-5} \text{ g / gDW}$) се наблюдава на 48-ия час от развитието на суспензионни култури на *Linum thracicum* ssp. multiflorum, третиран с 50 μM метил жасмонат. Производството на ацетил подофилотоксин се увеличава 1.2 пъти чрез отделяне с 50 μM метил жасмонат на 48-ия час от култивирането на растителните клетки в сравнение с необработените растителни клетки. Резултатите от проучването показват *Linum thracicum* ssp. multiflorum може да служи като алтернативен източник за производство на лигнани.

Научни публикации и прояви:

- Ionkova I, Sasheva P, Popova P, et al. Cytotoxic activity of podophyllotoxin and its analogues, produced by plant tissue cultures of *Linum thracicum* ssp. multiflorum Degen,

elicited with methyl jasmonate, III Int Conference on Natural products utilization: from plants to the pharmacy shelf, 18-21 Oct 2017, Bansko-Bulgaria
Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-80/02.05.2017 Възможности за продукция на флавоноиди от *in vitro* култури на *Astragalus monspessulanus* L. и изследване на тяхната биологична активност

Изследователски екип: Гл. ас. Петранка Крумова Здравева, дф

- Проф. Илиана Йонкова, дфн
- Проф. Илиана Манова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Гл. ас. Александър Шкондров, дф
- Павлинка Попова

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра по Фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Получени са *in vitro* култури – надземни части, калус и суспензии – от българска популация *Astragalus monspessulanus* subsp. *monspessulanus*. Анализът на флавоноидното им съдържание е проведен чрез ВЕТХ метод при сравняване с надземни части от диворастващи индивиди. Наблюдават се значителни разлики в състава на флавоноидната смес в отделните конвенционални култури. Данните от проучването са основа за по-нататъшна оптимизация на условията на култивиране *in vitro*, в т.ч. състава на културалната среда, с оглед получаване на високо продуктивни, по отношение на фармацевтично значими флавоноиди, клетъчни линии. В настоящото проучване установихме, че в изолирани плъши чернодробни микростоми, екстракта от култивиран *A. monspessulanus* показва по-изявен статистически значим антиоксидантен ефект при модел на не-ензимна липидна пероксидация, в сравнение с диворастващия *A. monspessulanus*. Сравнихме ефектите на култивирана надземна част, калус и суспензия от *A. monspessulanus* и установихме, че единствено култивирана надземна част от *A. monspessulanus* проявява изявен статистически значим антиоксидантен ефект, съизмерим с този на силимарина, спрямо Fe/AA.

Научни публикации и прояви:

- Zdraveva P, Popova P, Shkondrov A, et al. Investigation of *in vitro* cultures of *Astragalus monspessulanus* L. CR Acad Bulg Sci. 2017;70(8):1131-6.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-81/02.05.2017 Проучвания на близкородствени и редки за българската флора видове от род *Astragalus* L.

Изследователски екип: Проф. Илиана Николаева Манова, дф

- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Гл. ас. Петранка Здравева, дф

- Ас. Александър Шкондров, дф

Базова организация: МУ-София, ФФ, Катедра по Фармакогнозия, ул. „Дунав“ 2, София 1000,

РЕЗУЛТАТИ: Проведено е фитохимично изследване върху флавоноидния състав на *Astragalus glycyphylloides* DC. От метанолния екстракт, получен от надземната част на растението, чрез колонна и високоефективна течна хроматография (ВЕТХ) е получено едно ново природно съединение – флавонолов тетрагликозид. Резултатите от изследването са принос за изясняване на хемотаксономичния статус на *Astragalus glycyphylloides* DC., както и установяване на еволюционната му връзка с морфологично сходния му и широко прилаган в народната медицина вид *Astragalus glycyphyllos* L. Изолираните от *A. spruneri* съединения приложени самостоятелно, не проявяват статистически значим хепатотоксичен ефект *in vitro*. При *in vitro* модел с механизъм на хепатотоксичност метаболитно биоактивиране, флавоноидите проявяват изявен статистически значим цитопротективен и антиоксидантен ефект. Съединенията имат потенциал за приложение като хепатопротектори и антиоксиданти.

Научни публикации и прояви:

- Kondeva-Burdina M, Shkondrov A, Simeonova R, et al. *In vitro/ in vivo* antioxidant and hepatoprotective potential of defatted extract and flavonoids isolated from *Astragalus spruneri* Boiss. (Fabaceae). Food Chem Toxicol. 2018;111(3):631-40.
- Shkondrov A, Krasteva I, Pavlova D, et al. Flavonoids in populations of *Astragalus monspessulanus* subsp. *illyricus* in Bulgaria. III Int Conference on Natural Products Utilization. Bansko, Bulgaria.18-21.10.2017
- Kondeva-Burdina M, Simeonova R, Vitcheva V, et al. Pharmacological investigation of *Astragalus spruneri* Boiss. (Fabaceae). III Int Conference on Natural Products Utilization. Bansko, Bulgaria.18-21.10.2017

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-83/02.05.2017 Аналитично охарактеризиране на някои Омега ненаситени мастни киселини в хранителни добавки, чрез използване на газхроматографски метод

Изследователски екип: Проф. Данка Петрова Обрешкова, дм, дн

- Гл. ас. Добрина Цветкова, дф
- Ас. Стефка Иванова, дф
- Божидарка Хаджиева, МУ – Пловдив

Базова организация: МУ-София, ФФ, Катедра по Фармацевтична химия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проучването е приложение на газхроматографски метод за разделяне на метилови естери на мастни киселини в хранителни добавки. Хидролизата и метилирането на свързаните и свободните форми на мастните киселини са осъществени чрез преестерифициране с 14 % метанолен разтвор на бортрифлуорид (инкубиране при 65 °С), екстракция с хексан и газхроматографски анализ при температурна програма: 5 min. (140 °С), 4 °С/min. до 240 °С, 20 min. (240 °С), 6 °С/min. до 280 °С, 10 min. (280 °С). Валидиран е газхроматографски метод за определяне на Docosahexaenoic acid и са

изследвани аналитичните параметри: линейност, чувствителност и повтаряемост: RSD вътрешен стандарт = 0.851 %, RSD външен стандарт = 0.318 %. Надеждността на хроматографската система е потвърдена от липсата на статистически значима разлика между стойностите на хроматографския параметър време на задържане (t_R): RSD = 0.05 %. Обобщени са данни за t_R , площи и съдържание на метиловите естери на мастните киселини, определени по процентния метод в хранителни добавки: Doppelherz aktiv Омега-3 + Vit. E caps., Omega-3, 6, 9 caps., Omega-3 + Vit. E solution, Norwegian Fish Oil 18/12 1000 mg caps. и Omega 3 Forte 1000 mg caps. Максимални са количествата на Methylеicosapentaenoate (20.58 %), Methylpalmitate (20.35 %), Methyloleate (16.43 %), а минимални са: Methylnonadecanoate (0.3 %), Methylheptadecanoate (0.66 %), Methylpentadecanoate (0.69 %). Methyllinolenate е 58.12 % във Vitaflax oil и 52.68 % в Organic Flax, а Methyllinoleate е 44.02 % в Linseed oil. Надеждността на системата е потвърдена от липсата на разлика между стойностите на t_R при анализа на проби с Methyl-docosahexanoate (RSD: 0.05 %), Methylеicosapentaenoate (RSD: 0.04 %); Methylpalmitoleate (RSD: 0.94 %), Methylpalmitate (RSD: 0.34 %), Methyloleate (RSD: 0.36 %), Methyllinoleate (RSD: 0.36 %), Methylstearate (RSD: 2.0 %), Methyllinolenate (RSD: 0.39 %). Разработването и валидирането на газхроматографския метод има практическа приложимост за рутинен контрол на съдържанието и качеството на Омега ненаситени мастни киселини.

Научни публикации и прояви:

- Ivanova SA, Tsvetkova DD, Hadzhieva BR, et al. GC determination of Palmitoleic, Palmitic, Oleic, Linoleic, Stearic and α -Linolenic acids in flaxseed food supplements. Asian Acad Res J Multidiscipl 2018;5(4):51-64.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д 84/02.05.2017 LC-HRMS аналитичен профил на биологичноактивни вторични метаболити в листа от *Solanum schimperianum* Hochst

Изследователски екип: Гл. ас. Юлиан Тенчев Войников, доктор

- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Доц. Ренета Гевренова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дф
- Доц. Параскев Недялков, дф
- Раяна Динкова, студент
- Станислав Сотиров, студент

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра Химия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: При проведения фитохимичен анализ на екстракт от листа на растението *Solanum schimperianum*, Hochst, чрез течна хроматография и масспектрометрия с висока резолюция (LC-HRMS) бяха идентифицирани следните три групи вещества: стероидни гликоалкалоиди (ГА), фенолни киселини, както и хидроксиканелени амиди (НСАAs). Сред ГА, бяха идентифицирани соламаргин и соланин, както и агликоните соланидин, соланопубамин и соладуналинидин. Бяха открити мас фрагменти специфични за спиросолановия скелет, което позволи диференцирането на изобарните съединения соланопубамин и соладуналинидин характеризиращи се със спиросоланов и соланиданов

скелет, съответно. Беше изолиран мажорният компонент в ГА фракция – соланопубамин. Бяха идентифицирани 21 фенолни киселини и 12 НСАAs. Определените DPPH и ABTS радикалулаващата активност на екстракта от листа на *S. schimperianum* ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.2$ $\mu\text{g/ml}$ за DPPH и $IC_{50} = 3.5 \pm 0.3$ за ABTS тестовете) показват, че гликолкалоидният екстракт притежава 45 и 140 пъти по-висока активност спрямо тоталния метанолен екстракт, в тестовете за DPPH и ABTS антиоксидантна активност, съответно. Общото съдържание на полифеноли е 0.40 ± 0.04 mg GAE/100 g. Екстрактът притежава умерена ацетилхолинестеразна инхибиторна активност ($36.43\% \pm 7.08\%$), по-ниска от тази на контрола галантамин.

Научни публикации и прояви:

- Voynikov Y, Fadlelmula N, Yagi S, et al. LC-HRMS profiling of hydroxycinnamic acid amides and steroid alkaloids from leaves extract of *Solanum schimperianum*, Hochst. 3rd Int Conference on Natural Products Utilization; 18-21 Oct 2017; Bansko, Bulgaria.
- Voynikov Y, Nedialkov P, Zheleva-Dimitrova D, et al. LC-HRMS profiling of some steroid alkaloids from leaves extract of *Solanum schimperianum*, Hochst. Presented at: 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast Eur Countries; 20-24 May 2018; Split, Croatia.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-85/02.05.2017 Синтез, спектрално охарактеризиране и изследване на фармакологичната активност на нови метокси-заместени ароилхидразони

Изследователски екип: Проф. Георги Цветанов Момеков, дф

- Гл. ас. Боряна Николова-Младенова, дх
- Доц. Мая Георгиева, дф
- Доц. Лили Пейкова, дф
- Габриела Митев, студент
- Елина Петрова, студент

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Синтезирани са 9 нови метокси-производни хидразони чрез кондензация в етанол на 3-метоксисалицилалдехид, 4-метоксисалицилалдехид и 5-метоксисалицилалдехид с хидразидите – 2-метоксибензхидразид, 3-метоксибензхидразид и 5-метоксибензхидразид. Съединенията са охарактеризирани чрез елементарен анализ, HR ESI-MS мас-спектри, термо-гравиметрични изследвания, ИЧ-спектроскопия, ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР. Определени са брутните формули и структурата на диметокси заместените хидразони. Новите хидразони са изследвани с „Правилото 5 на Липински”, за да се оцени лекарственото им подобие. Установено е, че всички диметокси производни имат балансирана липофилност и добра пропускливост през клетъчната плазмемембрана. Цитотоксичното действие на диметокси производни хидразони е изследвано върху спектър от човешки туморни клетъчни линии, с различен произход и клетъчен тип за определяне на антипролиферативната активност и стойностите на IC_{50} с помощта на МТТ тест. Резултатите показват, че въвеждането на метокси-група и в алдехидната и в хидразидното ядро води до получаването на съединения с изразена цитотоксична активност. Веществата

проявяват концентрационно-зависима цитотоксична активност при всички изследвани клетъчни линии. Различното място на метокси групите променя активността на диметокси хидразоните. Съединения 44m, 33m и 43m могат да се разглеждат като подходящи кандидати за по-задълбочени проучвания както и като удачни изходни структури за генериране на библиотека от биологично активни аналози с противотуморна активност.

Научни публикации и прояви:

- Nikolova-Mladenova B, Momekov G. Design, drug-like properties and cytotoxic activity of methoxysalicylaldehyde-based hydrazones. 46 Euro Congress on Drug Synthesis and Analysis. Bratislava, Slovak Republic. 5–8 Sep 2017
- Митев Г, Николова-Младенова Б. Синтез и охарактеризиране на диметокси производни хидразони. Студентска научна сесия по фармация, Фармацевтичен факултет, МУ-София. 4 ноември 2017
- Mitev G. Cytotoxic activity of methoxy-derived hydrazones. II Int Biomedical congress. Sofia, Bulgaria. 17-19 Nov 2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 86/02.05.2017 *In vitro* и *in vivo* ефекти на алцесефолизид (кверцетин-3-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-[α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)]- β -D-галактопиранозид) при различни модели на интоксикация

Изследователски екип: Проф. Николай Дамянов Данчев, дм

- Проф. Илиана Йонкова, дфн
- Проф. Илиана Манова, дф
- Доц. Румяна Симеонова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Гл. ас. Александър Шкондров, дф

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, ул. Дунав 2, гр. София 1000

РЕЗУЛТАТИ: В настоящото проучване са проследени *in vitro/in vivo* ефектите на алцесефолизид, изолиран от *A. monspessulanus ssp. monspessulanus*. Самостоятелно приложен, тетрахлорметан проявява статистически значим *in vitro/in vivo* токсичен ефект. Върху изолирани хепатоцити, при модел на тетрахлорметанова интоксикация, алцесефолизид проявя статистически значим цитопротективен и антиоксидантен ефект, като съхранява клетъчната жизнестойност и нивото на редуциран глутатион и намалява освобождаването на ензима лактат дехидрогеназа и продукцията на малондиалдехид. Ефектите му са съизмерими с тези на силимарин като върху освобождаването на лактат дехидрогеназата даже са по-изявени. Хепатопротективните ефекти на алцесефолизид се потвърждават и при *in vivo* експериментите. Пред-третирането с алцесефолизид повишава активността на антиоксидантните системи, съхранява нивото на GSH и намалява продукцията на MDA статистически значимо спрямо чистия тетрахлорметан. Нашето проучване доказва *in vitro/in vivo* хепатопротективните ефекти на алцесефолизид, изолиран от *A. monspessulanus ssp. monspessulanus* при модел на тетрахлорметанова интоксикация.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-87/02.05.2017 Анализ на сесквитерпенови лактони в арника с различен произход чрез газ хроматография-масспектрометрия с висока резолюция

Изследователския екип: Гл. ас. Димитрина Живкова Желева-Димитрова, дф

- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб
- Доц. Нико Бенбасат, дф
- Доц. Ренета Гевренова, дф
- Гл. ас. Юлиан Войников, дф
- Люси Стефанова, студент
- Яница Русенова, студент

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен Факултет, Катедра по Фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: В това проучване имаме за цел развитие на стратегия за газова хроматография-Orbitrap-масспектрометрия с висока резолюция (GC-Orbitrap-HRMS) за анализ на сескитерпенови лактони (СТЛ) в цветни кошнички от *Arnica montana* с различен произход. Естерите на СТЛ хеленалин (X) и 11a, 13-дихидрохеленилин (ДХ) с късоверижни мастни киселини са смятани за основните активни вещества в официалната растителна субстанция. Пробите за анализ произхождат от български, полски, финландски и немски култивирани колекции и една, закупена от аптека. Пробоподготовката е извършена съгласно Европейската фармакопея 7.0 (2011). Последващата процедура на твърдо-фазова екстракция е извършена върху патрони Strata C18-E (Phenomenex, USA). Последващото хроматографско определяне се извършва с Trace 1310 GC, система Exact Orbitrap GC-MS (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). Данните са обработени с Excalibur Software (Thermo Fischer Sci.). Въз основа на точните маси и теоретичните фрагменти, генерирани с софтуера Mass Frontier 7.0 (ThermoScientific), са оценени и количествено определени 13 СТЛ и са предложени моделите на фрагментация както на X, така и на ДХ производни. Най-високото общо съдържание на СТЛ е намерена в пробата от Полша (4.892 mg/g dw), следвана от тази, култивирана на Витоша (4.057 mg/g dw). X е доминиращ СТЛ в закупената от аптека субстанция (0.110 mg/g dw), както и в пробата от Ботаническата градина в Университета Joensuu, Финландия (0.549 mg/g dw), докато ДХ-изобутират е основен СТЛ в арниката от Полша (0.660 mg/g dw), Ботаническата градина в Университета Turku, Финландия (0.245 mg/g dw) и сорт ARBO, Германия (0.405 mg/g dw). Пробите от България се характеризират с високо съдържание на X-изовалерат (0.703 mg/g dw; Витоша пл.) и X-тиглат (0.314 mg/g dw; Beglika). В заключение, надеждният метод на GC-Orbitrap-HRMS би бил важен за мониториране качествения и количествен състав на растителни лекарствени продукти от арника с култивиран и естествен произход.

Научни публикации и прояви:

- Toteva V, Russenova Y, Balabanova V, et al. Evaluation of herbal drug quality of *Arnicae* flos based on the analysis of sesquiterpene lactones content by gas chromatography- high resolution mass spectrometric method (GC-HRMS). II Int Biomedical Congress. Sofia, Bulgaria, 17-19 Nov 2017.

- Rusenova Y, Balabanova V, Benbassat N, et al. GC-HRMS determination of sesquiterpene lactones in *Arnica montana* L. 41st EPSA Annual Congress. 23–29 Apr 2018, Baarlo, Netherlands
- Balabanova V, Benbassat N, Voynikov Y, et al. State of the art method on the base of GC-Orbitrap-HRMS for sesquiterpene lactones in *Arnica montana* L. 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast Eur Countries, May 20-24, 2018, Split, Croatia.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 88/02.05.2017 Проучване на невропротективните ефекти на 3,4,5-трикафеилхинна киселина, изолирана от *Geigeria alata* (Asteraceae) в модел на алкохолен оксидативен стрес при плъх

Изследователски екип: Доц. Весела Бисерова Вичева, дф

- Доц. Румяна Симеонова, дф
- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Доц. Ренета Гевренова, дф
- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб,
- Петър Арнаудов, студент

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящата разработка е да се изолира и идентифицира един от основните вторични метаболити 3,4,5-трикафеилхинна киселина (ТСQA) в корени от Африкански вид *Geigeria alata*, Asteraceae и да се проучи неговата антиоксидантна и невропротективна активност в модел на етанол-индуцирано мозъчно увреждане при плъх. Експериментите са проведени с мъжки плъхове, порода Wistar. Мозъчното увреждане се индуцира чрез 5-дневно перорално прилагане на 50 % разтвор на етанол (1 mL/100 g, p.o.). 3,4,5-трикафеилхинната киселина (ТСQA) и хлорогеновата киселина (CGA), използвана като позитивна контрола, се прилагат в продължение на 14 дена (5 mg/kg bw, p.o.) самостоятелно и в комбинация с етанол. В комбинираните групи, ТСQA и CGA се прилагат първоначално самостоятелно в продължение на 9 дена, след което до 14 ден се прилагат в комбинация с етанол. В началото, средата и края на експеримента е проследено телесното тегло на животните. В края на експеримента са проследени биохимични параметри в урина, след което животните се декапитират и мозъците се отпрепарират за определяне на биохимични параметри. Активността на ензима невронална азот-оксид синтаза (nNOS), количество на редуциран глутатион (GSH), малондиалдехид (MDA), както и активността на антиоксидантните ензими: глутатионпероксидаза (GPx), каталаза (CAT) и супероксиддисмутаза (SOD) се определят спектрофотометрично в мозъчна тъкан. Петдневно перорално прилагане на 50 % разтвор на етанол на мъжки плъхове порода Wistar води до статистически значимо ($p < 0.05$) повишаване активността на nNOS с 72 %, съпроводено с повишена продукция на MDA с 48 %, с намалено ниво на GSH с 81 % и с понижена активност на антиоксидантните ензими GPx, SOD и CAT. Тези резултати доказват, че е разработен адекватен модел на етанол-индуцирано мозъчно увреждане.

Самостоятелното прилагане на ТСQA не оказва влияние върху изследваните параметри. Трябва да се отбележи, обаче, че в комбинираната група, деветдневното пред-третиране на животните с ТСQA и последващото ѝ петдневно едновременно прилагане с етанол не позволява на етанола да прояви своето прооксидантно действие. За това свидетелстват стойностите на биомаркерите на оксидативен стрес (nNOS, MDA и GSH) и активността на антиоксидантните ензими в комбинираната група, които са близки до контролните нива. Ефектите на ТСQA а съизмерими с тези на позитивната контрола CGA. Получените резултати доказват невропротективна активност на 3,4,5-трикафеилхинната киселина в модел на етанол-индуцирано мозъчно увреждане, която най-вероятно се дължи на нейното антиоксидантно действие. Ефектът ѝ е съизмерим с този на позитивната контрола хлорогенова киселина, която е с доказан невропротективен ефект, в основата на който е нейната радикал-улавяща активност, както и способността ѝ да инхибира високите нива на вътреклетъчен калций, резултат от повишената активност на глутаматната NMDA/NO каскада в пост-синаптичните мембрани на мозъчните клетки. Нашите резултати предполагат подобен механизъм на невропротекция и за 3,4,5-трикафеилхинната киселина.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-89/02.05.2017 Токсикологично охарактеризиране на екстракт от *Clinopodium vulgare* (Lamiaceae)

Изследователски екип: Доц. Румяна Любомирова Симеонова

- Доц. Весела Вичева
- Доц. Ренета Гевренова
- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова,
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка
- Виолина Тотева, студент

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Водният екстракт от *Clinopodium vulgare* е анализиран чрез ултра високо-ефективна течна хроматография комбинирана с високо разделителна мас спектрометрия (UHPLC-HRMS). Въз основа на MS и MS/MS спектрите, сравнение с референтни стандарти и литературни данни за първи път във вида са идентифицирани или е предложена предварителна структура за лутеолин-7-глюкозид, лутеолин-*O*-неохесперидозид, лутеолин-8*C*-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, нарингенин-*O*-хексуронид, изосекуранетин-7-неохесперидозид, заедно с неохлорогенова, 4-кафеилхинна, 1,3- и 3,4-дикафеилхинна киселин. Установени са клиноподиевите киселини А, В и С; основно съединение е розмаринова киселина. Определена е острата и подостра токсичност на екстракта при два вида гризачи – мишки и плъхове и при два пътя на въвеждане – орален и интраперитонеален. LD₅₀ при интраперитонеално въвеждане на мишки е 675 mg/kg тегло. За плъхове LD₅₀ = 500 mg/kg тегло. Острото интраперитонеално приложение (идентично с интравенозното), води до проява на токсични ефекти от страна на ЦНС. При острото орално въвеждане е установено LD₅₀ по-голямо от 2000 mg/kg тегло и за двата вида животни. Всички животни остават живи до 14 ден от наблюдението, без промени в поведението и начина на хранене. При 14-дневното орално приложение на екстракта в

доза 100 mg/kg, не се наблюдават токсични ефекти при условията на експеримента. Няма хистоморфологични данни за увреждане на вътрешни органи. Не се отчитат и промени в пълната кръвна картина, биохимията и в урината от експерименталните животни. Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-90/02.05.2017 Синтез на 1-заместени метилксантинови производни, молекулно моделиране и изследване за предполагаема антихолинестеразна активност

Изследователски екип: Проф. Александър Борисов Златков, дф

- Проф. Ирини Дойчинова, дн
- Доц. Мая Георгиева, дф
- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Доц. Румяна Симеонова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Доц. Весела Вичева, дф
- Гл.ас. Лилия Димитрова, дф
- Гл.ас. Ива Вълкова, дф
- Гл.ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра по Фармацевтична химия, ул. Дунав 2, София, 1000

РЕЗУЛТАТИ: Серия метилксантинови производни, съдържащи арил/аралкил пиперазинов фрагмент в структурата си са синтезирани в нашата лаборатория. Получените съединения са структурно охарактеризирани с помощта на подходящи спектрални методи, включващи IR и ¹H NMR спектроскопия. Чистотата им е потвърдена със съответните температури на топене и ТСХ характеристики. За целта на изследването така получените производни бяха оценени за вероятна ацетилхолинестеразна (AChE) инхибиторна активност чрез *in silico*, *in vitro* и *in vivo* методи. Като моделно съединение за провеждане на първоначална оценка с помощта на молекулен докинг бе избрано метилксантиновото производно 1-(3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)-3,7-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione (LA₁). При проведените докинг бе установено, че начина на свързване на LA₁ с rhAChE зависи от протонирането на молекулата, като във протонираната си форма в каталитичният център на ензима дълбоко навлиза ксантиновият фрагмент, а пиперазиновата част остава в позиция PAS, докато в непротонирана форма, свързването се осъществява в противоположна конформация. В допълнение бе изследвана *in vitro* AChE инхибиторната активност с помощта на два метода: колориметричен метод на Ellman и изотермична титрационна колориметрия (ИТС). От проведените експерименти по метода на Ellman бе установено, че съединения LA₁ и LA₇ проявяват най-ярко изразен афинитет към AChE, съответно с стойности за IC₅₀ (mM) от 0,708 и 0,299, съизмерим с този на използвания за контрола galantamin. От проведените ИТС анализ бе установено, че съединение LA₁ проявява най-ярко изразен AChE ефект, като се свързва с ензима в съотношение 1:1, което потвърждава резултатите от предварителния молекулен докинг. Допълнително беше изследвана *in vitro* хепатотоксичността на всички синтезирани молекули и *in vivo* острата токсичност (изразена като LD₅₀) на най-активните производни,

както и ацетилхолинестеразната и бутирилхолинестеразната активност. При оценката на параметрите, включени в модела за изследване на хепатотоксичността на новосинтезирани молекули бе установено, че от тестваните метилксантинови производни съденения LA₆ и LA₁₂ проявяват най-висок хепатотоксичен ефект върху изолирани плъщи хепатоцити, а LA₃ и LA₉ – най-нисък по всички проследявани параметри. *In vitro* експериментите показаха, че съединение LA₇ е с висока остра токсичност, но от друга страна приложено самостоятелно проявява съизмерим с използваният за сравнителен продукт скополамин по отношение на инхибирането на АСhЕ, докато при изследването за ВСhЕ бе установено, че LA₇ проявява по-нисък афинитет. Получените резултати сочат, че LA₁ и LA₇ са перспективни структури при разработването на нови инхибитори на ацетилхолинестеразата (АСhЕ) основани на метилксантинов скелет.

Научни публикации и прояви:

- Hristova M, Atanasova M, Valkova I, et al. Molecular docking study on 1-(3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)-3,7-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione as acetylcholinesterase inhibitor. CBU Int Conference on innovations in science and education 21-23 Mar 2018, Czech republic

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-91/02.05.2017 Синтез, охарактеризиране, химични свойства и оценка на потенциални невропротективни ефекти и възможна инхибиторна активност върху човешка рекомбинантна МАО-В на новосинтезирани хидразидхидразони на кофеин-8-тиопропанова киселина

Изследователски екип: Доц. Бойка Георгиева Цветкова, доктор

- Проф. Александър Златков, дф
- Доц. Мая Георгиева, дф
- Гл. ас. Явор Митков, дф
- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Александра Касабова
- Атанас Лукарски
- Юсеф Султан

Базова организация: МУ – София, Фармацевтичен факултет, Катедра „Фармацевтична химия”, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Синтезирани са 13 нови производни на 8-кофеинтиогликоловата киселина. Структурата им е доказана с ¹H-NMR, FTIR, UV- и LC-MS инструментални методи. Изчислени са молекулните дескриптори на съединенията и е извършена виртуална оценка на лекарственото подобие с Правилото на Липински и Уеб базирания сървър OSIRIS, като прогноза за фармакокинетичните свойства. В настоящото проучване са оценени *in vitro* ефектите на новосинтезирани производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина върху човешка невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y, както и възможната им инхибиторна активност върху човешки рекомбинантен МАОВ ензим (hMAOB). Ефектите са сравнени с тези на кофеин-8-тиогликоловата киселина, кофеин и Депренил. Върху SH-SY5Y

клетъчната линия, всички от веществата проявяват статистически значими невротоксични ефекти, сравнени с тези на контролата (не-третираните клетки). Три от веществата: J α -6, J α -7 и J α -9 проявяват по-слаб невротоксичен ефект, в сравнение с останалите и са изследвани за възможни невропротективни ефекти при модел на 6-ОН-допамин (6-ОНДА)-индуциран оксидативен стрес. При този модел две от веществата: J α -7 и J α -9 (в концентрация 100 μ M) проявяват статистически значим невропротективен ефект, в сравнение с 6-ОНДА. Ефектите са съизмерими с тези на кофеин-8-тиогликоловата киселина и кофеин. Върху SH-SY5Y клетъчната линия, в условията на 6-ОНДА-индуциран оксидативен стрес, J α -6 не проявява статистически значим невропротективен ефект, спрямо 6-ОНДА. Всички вещества (в концентрация 1 μ M) са изследвани за възможна инхибиторна активност върху човешки рекомбинантен MAOB ензим. Единствено J α -7 и J α -9 проявяват добра инхибиторна активност, близка с тази на Депренил. J α -7 и J α -9 инхибират hMAOB активността с 29 % и с 36 %, респективно, докато Депренил инхибира активността на hMAOB с 42 %, спрямо чист hMAOB. Предполагаме, че невропротективните ефекти на J α -7 и J α -9 най-вероятно се дължат на възможна инхибиция на hMAOB, който катализира метаболизма на 6-ОН-допамина до невротоксичния p-хинон, който води до повишена продукция на ROS, водещи до увреждане на невроналните клетки. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-92/02.05.2017 Антиоксидантна протекция на кверцетин, енкапсулиран в полизахаридни наночастици върху модели на оксидативен стрес *in vitro*

Изследователски екип: Доц. Вирджиния Йорданова Цанкова, дф

- Проф. Красимира Йончева
- Проф. Николай Данчев
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина
- Гл. ас. Борислав Цанков
- Ас. Деница Алуани
- Йордан Йорданов

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Основна цел на този проект е разработването и оценката на профила на безопасност на хитозан / алгинатни наночастици, като лекарство-доставяща система за антиоксиданта от природен произход кверцетин. Наночастиците са приготвени чрез промяна на съотношенията между двата биополимери, което предполага получаване на частици с различен размер и заряд. Биосъвместимостта на получените системи е изследвана *in vitro* в клетки от различен произход: култивирана клетъчна линия НерG2 и изолирани първични хепатоцити от плъх. Антиоксидантните свойства на енкапсулирания кверцетин са изследвани в различни клетъчни модели на оксидативен стрес. Протективните ефекти на натоварените с кверцетин наночастици бяха изследвани в модели на индуциран от H₂O₂ оксидативен стрес в НерG2 клетки, и в условията на оксидативен стрес, предизвикан от трет-бутил хидропероксид в изолирани хепатоцити на плъх. Резултатите дават полезна информация за липсата на токсичност на хитозан / алгинатните наночастици, които могат да се приемат за лекарство-доставяща система за

кверцетин с добър профил на безопасност и с добри протективни свойства в условия, свързани с оксидативния стрес.

Научни публикации и прояви:

- Yordanov Y, Tzankova V, Aluani D, et al. Encapsulated Quercetin Provides High Antioxidant Protection in Oxidative Stress Models in Vitro and in *Drosophila melanogaster* In Vivo. World Summit in Toxicology, 11-12 June 2018 Rome, Italy

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-93/02.05.2017 Синтез на N-пиролил хидразид-хидразони и оценка на вероятен инхибиторен MAO-B ефект

Изследователски екип: Доц. Мая Боянова Георгиева, дф

- Проф. Александър Златков, дф
- Доц. Лили Пейкова, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Гл. ас. Станислава Владимирова, дф - ХТМУ
- Диана Цанкова, докторант
- Мария Христова, студент

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра Фармацевтична химия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящото изследване е получаването на нов N-пиролил-хидразид и четири нови негови хидразона, извършване на предварителна оценка за приложимостта на новосинтезираните продукти с помощта на два подхода: оценка на лекарственото подобие с Правилото 5 на Липински и *in silico* предсказване на вероятният им фармакологичен ефект. В допълнение така получените нови молекули са изпитани за вероятен инхибиторен ефект върху рекомбинантна човешка MAO-B. За постигени на поставената цел, прилагайки класическата циклизация на Паал-Кнор бе получен целевият N-пиролил хидразид. В последствие в апаратура за микросинтез бяха получени четири нови негови хидразона. Структурите на новополучените съединения бяха доказани с помощта на IR и ¹H NMR спектрални характеристики, а чистотата им бе потвърдена със съответните температури на топене и ТСХ характеристики. С помощта на Правилото 5 на Липински, бе извършена предварителна оценка на лекарственото подобие и фармакокинетичното поведение на изследваните молекули при което бе установено, че съединения Ia-c и Pa-c следват ограниченията на параметрите на Липински. Това заключение бе потвърдено и от получените теоретични стойности за % ABS. Прилагайки достъпни *in silico* скрининг подходи за предсказване на вероятният фармакологичен ефект на тестовите хидразид-хидразони бе определено, че всички съединения проявяват добра активност като GPCR лиганди и ензимни инхибитори, като съединения IIIa и IIIb проявяват най-добре изразен ефект. В допълнение серия аналози на новополучените N-пиролил хидразид-хидразони бяха изследвани за потенциална инхибиторна активност спрямо човешки рекомбинантен MAO-B ензим. От получените резултати бе установено, че от тестваните групи, съединения 11 и 111 от I-ва група и 12 и 121 от II-ра група проявяват добра инхибираща активност върху човешки рекомбинантен MAO-B ензим.

Научни публикации и прояви:

- Tzankova D, Peikova L, Vladimirova S, et al. Synthesis, drug likeness estimation and prediction of possible pharmacological effects of new pyrrole hydrazones. Scripta Scientifica Pharmaceutica, 2017;4(2):27-33.
- Tzankova D, Georgieva M, Vladimirova S. N-pyrrolyl hydrazide-hydrazones as a target molecule for fighting neurodegenerative diseases. XIV Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти на ХТМУ. София, България, 19 Май, 2017,13
- Tzankova D, Peikova L, Vladimirova S, et al. Synthesis and structural characterization of pyrrole derivatives as possible selective MAO-B inhibitors. Четвърти фармацевтичен бизнес форум и научно-практическа конференция „Иновации и перспективи във фармацевтичната практика“. Варна, България, 27 – 29 Октомври, 2017,20

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-94/02.05.2017 Разработване на мезопорести силикатни наночастици като носител на прамипексол

Изследователски екип: Проф. Красимира Павлова Йончева, дф

- Проф. Николай Ламбов, дф
- Доц. Вирджиния Цанкова, дф
- Гл. ас. Борислав Цанков, дф
- Йордан Йорданов, докторант
- Гл. ас. Деница Алуани, дф

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра „Технология на лекарствените средства с биофармация“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Прамипексол е допаминов агонист, използван при лечение на болест на Паркинсон. Приложението му често е свързано с прояви на различни централни и периферни дозо-зависими нежелани реакции, което би могло да се преодолее чрез включването му в лекарствени системи с удължено освобождаване, например наночастици. Прамипексолът е хидрофилно лекарствено вещество, което налага разработването на специфична процедура за натоварване и подход за ограничаване на бързото му освобождаване от наночастиците. В настоящата работа бе разработен метод за натоварване на прамипексол в мезопорести силикатни наночастици от типа МСМ-41 чрез инкубиране във водна среда. Данните от рентгенографските анализи и азотната физисорбция показаха успешното включване на лекарственото вещество в мезопорите на силикатния носител. Установено бе, че оптималното изходно съотношение между прамипексол и мезопорест силикатен носител е 1:1. Чрез трансмисионна електронна микроскопия бе установено, че натоварването с лекарственото вещество не води до промени в мезопорестата структура. Натоварените частици бяха обвити с натриев алгинат, хитозан или тяхна комбинация с цел модифициране на процеса на освобождаване на хидрофилното лекарствено вещество. Установено бе, че чрез обвиването се намалява началното бързо освобождаване на прамипексол от частиците в буферни среди с рН 1.2 и 6.8. Протективните ефекти на свободен и натоварен в частиците прамипексол бяха оценени и сравнени в модел на H₂O₂-индуциран оксидативен стрес на невронална клетъчна линия SH-SY5Y. Натовареният в силикатните наночастици прамипексол проявява значително по-висока протекция в сравнение с ненатоварения прамипексол. Най-

силен протективен ефект показаха натоварените частици обвити с хитозан или с хитозан/алгинат, което разкрива предимствата на тези частици като лекарство-доставяща система за прамипексол.

Научни публикации и прояви:

- Цанков Б, Алуани Д, Йорданов Й, и др. Разработване на лекарство-доставяща система с удължено освобождаване на прамипексол на базата на мезопорести силикати от типа МСМ-41 и HMS. III-та национална конференция, “Фармацевтични технологични дни“, Цигов Чарк, 13-15 октомври 2017.
- Aluani D, Tzankov B, Yordanov Y, et al. Pramipexole loading in mesoporous silica nanoparticles protect the human neuroblastoma SH-SY5Y cells from oxidative damage in vitro. 19 Int Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, Sofia, 21-22 Nov 2017
- Tzankov B, Spassova I, Yoncheva K, et al. Development and physico-chemical characterization of pramipexole loaded MCM-41 mesoporous particles as drug delivery system. Proc. 11th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, 2018.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-95/02.05.2017 Експериментално изследване за противотуморна и антипролиферативна активност на Адмирал инжекционен разтвор

Изследователски екип: Доц. Нико Йосиф Бенбасат, дф

- Гл. ас. Любомир Маринов, дф
- Гл. ас. Юлиан Войников, дф
- Доц. Стоян Шишков, дб - СУ
- Гл. ас. Антон Хинков, дб - СУ
- Гл. ас. Калина Шишкова, дб - СУ
- Гл. ас. Даниел Тодоров - СУ
- Петя Ангелова, докторант
- Проф. Ренета Тошкова, дмн - БАН
- Ас. Ани Георгиева, дб - БАН

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра по фармакогнозия, София 1000, ул. Дунав 2

РЕЗУЛТАТИ: Способността на туморните клетки да проникнат и разрушат базалните мембрани и прилежащите тъкани играе централна роля в комплексния многоетапен процес на метастазиране. Изследваните вещества показват различна по степен антитуморна /антипролиферативна активност към използваните 3 човешки туморни линии - цервикален аденокарцином (HeLa), аденокарцином на дебело черво (HT-29) и рак на гърдата (MCF-7). Diclofenac понижават клетъчната пролиферация (жизненост) и при трите човешки туморни линии (MCF-7, HT-29, HeLa), установено чрез МТТ тест. Ефектът на Diclofenac е време- и дозозависим. Той реализира антитуморния/антипролиферативен ефект чрез индукция на апоптоза в третираните клетки, доказано с флуоресцентни методи на изследване. Изследваните помощни вещества (натриев хидроксид, глицин и лимонена киселина) не са токсични за MCF-7, HT-29 и HeLa туморни клетки в изследваните концентрации, кореспондиращи на концентрациите в търговските препарати.

Наблюдаваните единични понижени или повишени стойности на витални туморни клетки е под 10% (стойностите в биологичните опити, които се приемат за антипролиферативен/антитуморен/цитотоксичен ефект са около и над 30%). Необходими са последващи подробни проучвания на различните представители относно антитуморните им ефекти при разширен спектър на човешки туморни клетъчни линии с цел по-прецизно установяване на техните потенциални антитуморни ефекти. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-97/02.05.2017 Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Клинични, имунологични и микробиологични изследвания

Изследователски екип: Доц. Теодора Николаева Болярова-Конова, доктор

- Проф. Златимир Коларов, дмн
- Проф. Мария Николова, дмн - НЦЗПБ
- Радослава Грозданова, дм -НЦЗПБ
- Владимир Толчков, дм - НЦЗПБ
- Д-р Яна Здравкова
- Д-р Любомир Стефанов
- Д-р Гергана Христова

Базова организация: МУ-София, Факултет по дентална медицина, Катедра по пародонтология, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването е търсене на връзка между пародонтит и ревматоиден артрит (РА) на базата на клинични и лабораторни характеристики. В изследването участват 81 пациента, на средна възраст 55,23 г.(SD± 10,90), разделени в три групи: I група – пациенти с пародонтит и остеоартроза – 26 човека; II група – пациенти с пародонтит и РА – 30 човека; III група – пациенти с пародонтално здраве и с РА – 25 човека. На всички пациенти са приложени методи за диагностика на РА и на пародонтит; определяне на IgM – RF и anti – CCP (Anti-cyclic citrullinated peptide antibody) чрез ELISA в гингивална кревикуларна течност, периферна кръв, на 6 от пациентите – в синовиална течност; определяне на наличие на пародонтопатогени в субгингивална плака чрез Polymerase chain reaction. При пациентите от II група установихме по-голяма активност и тежест на пародонтита, оценена с по-високи стойности на: средна дълбочина на джоба (PD), кървене при сондиране, PISA (Periodontal inflamed surface area), както и значително по-често наличие на *T. denticola* в субгингивална плака в сравнение с пациентите от I група. При пациентите с пародонтит и наличие на *P. gingivalis* и *T. denticola* в субгингивална плака установихме значимо по-високи: брой зъби с дълбоки пародонтални джобове, PD, PISA, загуба на аташман, по-често фуркационни лезии в сравнение с пациентите с пародонтит и липсващи тези микроорганизми в субгингивална плака. Определихме мъжки пол, възраст, тютюнопушене като рискови фактори за тежест на пародонтита. Установихме значима зависимост между броя загубени зъби и Активност DAS28 CRP на РА. Потвърдихме връзката между пародонтита и РА на основата на по-високи клинични показатели на пародонтита и по-често присъствие на *T. denticola* в субгингивална плака при пациентите с пародонтит и РА в сравнение с пациентите с пародонтит, без РА. Установихме зависимост на пародонтални показатели от наличие на

пародонтопатогени и от наличие на рискови фактори. Вероятно лечението на пародонтита би допринесло за контрол и на РА.

Научни публикации и прояви:

- Болярова-Конова Т, Стефанов Л, Коларов З, и др. Клинични данни за връзка между пародонтит и ревматоиден артрит (предварителни резултати). Ревматология 2018; 4
- Болярова Т, Стефанов Л. Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит (обзор), Обща Медицина, 2017; XIX(2):31-40
- Толчков В, Стефанов Л, Христова Г, и др. Доказване на видове от оралната анаеробна микрофлора чрез РСР. 16-ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, 10-12 май, 2018, 67-8

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-115/02.05.2017 Изследване на полиморфизмите rs1799782 и rs25487 в XRCC1 гена като фактори за развитието на дерматомиозит у възрастни

Изследователски екип: Доц. Любомир Асенов Дурмишев

- Проф. Радка Кънева, дб
- Мария Христова, дм

Базова организация: МУ-София, УМБАЛ “Александровска”, Катедра по дерматология и венерология, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследвани са 30 пациенти с ДМ, 55 контроли със СЛЕ и 94 здрави контроли посредством генотипиране в реално време (Taqman). Наблюдава повишено носителство на генотипа XRCC1 399Arg/Arg сред пациенти с ДМ (48.5 vs 38.4%, OR 1.5, 95% CI 0.7-3.4). Не се наблюдава асоциация на този полиморфизъм със СЛЕ, нито с клиничните признаци на двете заболявания. Полиморфизмът Arg194Trp не показва асоциация нито с възникването нито с клиничните признаци на заболяванията.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ “ГРАНТ’ 2016”

Договор 9/2016 Съвременни тенденции в конвенционалните и молекулярно-биологични методи при видовата идентификация на микроорганизми, причиняващи вулво-вагинална кандидоза, бактериална вагиноза и техните хронични форми

Изследователски екип: Доц. Весела Васкова Райкова, дмн

- Ас. Радослав Байкушев
- Чл.-кор. Проф. Иван Митов, дмн

Базова организация: Катедра по Медицинска Микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящето изследване е приложението на PCR методиката за откриване на БВ-свързани организми и микотични агенти в симптоматични и безсимптомни жени и оценка на необходимостта от използването ѝ в диагностичния алгоритъм на тези състояния. Изследвани са по две вагинални проби, взети от 98 жени (74 симптоматични, 24 контроли). За оценка на секретите бяха използвани критериите на Amsel и скалата на Nugent, определяне на вагиалното рН, оцветяване на натривки по Грам, рутинно култивиране, както и култивиране върху декстрозен агар с Gentamycin и Chromagar candida. Бе проведена и PCR идентификация на *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Eggerthella-like bacterium*, *Leptotrichia*, BVAB1, BVAB2 и *Megasphaera* type1. В симптоматичната група 17 материала бяха с вулвовагинална кандидоза (VVC); 24 с BV, 8 с интермедиерна форма на BV, 13 с ко-инфекции и 12 с други инфекции. В контролната група 2 секрета бяха са с VVC, 1 с BV и 1 с друга инфекция. Използвайки PCR в групата с оплаквания *G. vaginalis* се открива в 59 проби (79.7%), *A. vaginae* в 21 (28.4%), *Eggerthella*-подобни бактерии в 15 (20.3%), *Leptotrichia* в 21 (28.4%), BVAB1 в 3 (4.1%), BVAB2 в 16 (21.6%), *Megasphaera* тип 1 в 25 (33.8%). В контролната група *G. vaginalis* бе идентифицирана в 4 проби, *A. vaginae* в 2, PCR за други бактерии остана отрицателна. За разлика от *G. vaginalis* *Eggerthella* подобните бактерии, *Leptotrichia*, BVAB2 и *Megasphaera* тип1 могат да се използват като сигурни маркери за наличието на БВ. Технологиата, базирана на PCR, е чувствителна и специфична, въпреки това е необходим комбиниран подход при диагностиката на вагиналните смущения, които могат да са с микотичен, аеробен или анаеробен причинител, както и комбинации, водещи до ко-инфекции.

Научни публикации и прояви:

- Райкова В, Овнарска Д, Байкушев Р. Роля на пробиотиците в схемата на терапия на бактериалната вагиноза. Медицински Преглед, 2016;52(5):29-33.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 22/2016 Клинично значение на серумния хепсидин при възпалителни и туморни заболявания на червата

Изследователски екип: Доц. Милена Георгиева Велизарова, дм

- Гл. ас. Виктор Манолов, дм

- Проф. Камен Цачев, дмн
- Проф. Огнян Георгиев, дм
- Проф. Диана Стефанова-Петрова, дмн
- Ас. Радослава Църнчева
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

Базова организация: Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В хода на проекта бяха използвани различни методологични подходи за диагностика на пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт, както и оценка на желязния статус при изследваните пациенти. Използван е имунологичен ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) метод с осъществяване на специфичен комплекс антиген-антитяло, отчитан спектрофотометрично за количествено определяне на хепсидин и интерлвекин-6 в серум при пациенти с пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт. Получените резултати са сравнени с набор от вече известни стойности при контролна група. Използван е турбидиметричен метод за определяне на С-реактивен протеин (за определяне на възпалението при пациенти с улцерозен колит, болест на Крон и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт); трансферин и разтворими трансферинови рецептори (за оценка на степента на нарушена обмяна на желязо). Получените резултати са сравнени с набор от вече известни стойности при контролна група. Използван е имунологичен CLIA (Chemiluminescence immuno assay) метод за определяне на серумен феритин (за оценка на нивото на натрупване на желязо в депата при пациенти с пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт). Подбрана бе група от 49 пациента, диагностицирани със заболяването пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт от специалист – гастроентеролог в УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по Гастроентерология и с наличие на промени в желязния статус, установено чрез изследване на показателите общ брой еритроцити, цитометрични показатели – MCV, MCH, MCHC, хемоглобин, брой ретикулоцити, хемоглобин в ретикулоцити, С-реактивен протеин, серумно желязо и ТIBC, интерлвекин-6, серумен трансферин, феритин и разтворими трансферинови рецептори извън съответните нормални граници за пол и възраст. Количествено е определено серумното ниво на хепсидин по ELISA метод при всички пациенти с пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт. Получените резултати са обработени чрез съответните статистически методи за определяне на значимост. Установихме статистически значимо повишено ниво на серумен хепсидин при пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт ($71.1 \pm 10.6 \mu\text{g/l}$) спрямо контролната група ($21.5 \pm 2.1 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. Серумното ниво на интерлвекин-6 показва статистически значимо повишение при пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт ($10.6 \pm 3.4 \text{ pg/ml}$) спрямо включените клинично здрави индивиди ($1.5 \pm 0.7 \text{ pg/ml}$), което потвърди участието на възпалителните цитокини в регулацията на синтеза на хепсидин, $P < 0.001$. Количественото определяне на хемоглобин в ретикулоцити при пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт ($22.5 \pm 0.9 \text{ pg}$) показва статистически понижени нива, поради съпровождащото се изчерпване на желязо в организма, в резултат на възпалението, спрямо контролната група ($30.9 \pm 2.1 \text{ pg}$); $P < 0.001$. Феритинът в серум при пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт ($67.6 \pm 17.5 \text{ ng/ml}$) показва значително намаление спрямо

контролната група (198.7 ± 21.4 ng/ml), $P < 0.001$. Установена бе негативна корелационна зависимост между концентрациите на серумен хепсидин и феритин ($r = -0.718$; $P < 0.05$), както и между хепсидин и серумни нива на желязо ($r = -0.669$; $P < 0.001$), хепсидин и хемоглобинова концентрация ($r = -0.696$; $P < 0.001$) и между серумен хепсидин и хемоглобин в ретикулоцити ($r = -0.742$; $P < 0.001$) при пациентите с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт. Серумните концентрации на хепсидин показаха положителна корелационна връзка с нивата на трансферин ($r = 0.733$; $P < 0.001$), разтворими трансферинови рецептори ($r = 0.659$; $P < 0.005$), IL-6 ($r = 0.883$; $P < 0.001$) и CRP ($r = 0.762$; $P < 0.001$) при пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт показва положителна зависимост. В заключение: установихме статистически значимо нарастване на серумните нива на хепсидин при пациенти с възпалителни и туморни заболявания на стомашно-чревния тракт, вероятно поради синергичното действие на възпалителните цитокини и нарушения статус на желязото в организма. Преразпределянето и натрупването на желязото в макрофагите и паренхимните клетки оказва съществено влияние върху степента и скоростта на прогресия на органните увреждания. Концентрацията на хепсидин е важна за индивидуализиране на терапията на анемията. Хепсидиновите нива определят ефективността на терапията на анемията.

Научни публикации и прояви:

- Manolov V, Georgiev O, Petrova J, et al. Iron homeostasis in inflammatory bowel diseases. MRJMMS 2017;5(3):123-125.
- Manolov V, Petrova J, Hadjidekova S, et al. Serum hepcidin quantification in stroke in β -thalassemia and rheumatoid arthritis patients. Austin J Cerebrovasc Dis Stroke. 2017;4(2):1056.
- Manolov V, Velizarova M, Georgiev O, et al. Hepcidin in some diseases with impaired iron homeostasis. 10th National Clinical Laboratory Conference. 29.09-01.10.2016, Golden Sands
- Velizarova M, Manolov V, Georgiev O, et al. Evaluation of serum hepcidin concentration in inflammatory bowel diseases and intestinal tumor diseases. 12th Euro Global Gastroenterology Conference (Gastro Congress 2017) Sep 11-12, 2017 Paris, France.
- Velizarova M, Manolov V, Vasilev V, et al. Serum hepcidin quantification in inflammatory bowel diseases. 22nd Congress of EHA Jun 22-25, 2017 Madrid, Spain.
- Velizarova M, Manolov V, Georgiev O, et al. Quantification of serum hepcidin in inflammatory bowel diseases. 22nd Eur Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC – EFLM) & 25th Meeting of BCLF Jun 11-15, 2017 Athens, Greece.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 28/2016 Клинични и демографски характеристики и тяхната връзка с някои биомаркери на системно възпаление при пациентите с астма-ХОББ припокриващ синдром

Изследователски екип: Проф. Васил Димитров Димитров, дм

- Доц. Мария Стаевска-Коташева, дм
- Ас. Денислава Недева
- Ас. Елена Петкова

- Ас. Анна Димитрова, докторант
- Ас. Аделина Цакова

Базова организация: Клиничен център по алергология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В проекта бяха включени 66 пациента, които бяха разделени в три групи-пациенти с астма (Asth), с ХОББ (COPD) и с астма-ХОББ припокриване (АСО), като броят участници е съответно 28, 16 и 22. Бяха изследвани техните клинични и демографски характеристики и нивото на системно възпаление сред трите групи. Установи се сигнификантна разлика по отношение на средната възраст на пациентите в трите групи ($p=0.000248$), като пациентите с астма-ХОББ припокриване и ХОББ са по-възрастни от тези с астма. По отношение на разпределението по пол не се установиха значими разлики. Хоспитализациите за една година са по-чести при пациентите с COPD (2.5625 ± 1.209) и АСО (2.04545 ± 0.99892) и сигнификантно по-редки при групата Asth (1.67857 ± 0.6696) ($p=0.01397$). Липсва сигнификантна разлика между групите на АСО и COPD ($p=0.158$). Тютюнопушенето, изразено като брой пакетогодини се явява рисков фактор за развитие на астма-ХОББ припокриване ($p=0.000357$) при пациентите с астма. Установи се по-честа употреба на орални КС при пациентите с астма и астма-ХОББ припокриване, в сравнение с тези само с ХОББ. Честотата на сенсibiliзация към инхалаторни алергени е еднаква сред пациентите с АСО -54% (12 от 22) и съответно 50% (14 от 22) при пациентите с астма, като всички пациенти с атопия в групата на АСО имат сенсibiliзация към поне един целогодишен алерген (микрoкърлежи в дом. прах, плесени, фунги), а при пациентите с астма, честота е 78 % (11 от 14). По отношение на инсулиновата резистентност и индексът на телесна маса (ВМІ), не се установиха статистически значими разлики между трите групи (съответно $p=0.6891$ и $p=0.226$, но пациентите с АСО са с най-висок среден ВМІ и НОМА-индекс. От изследваните маркери на системно възпаление, най-високите стойности на TNF-alpha и IL-6 очаквано бяха измерени в групата на пациентите с ХОББ, съответно 6.09 и 5.89, а на IL-1beta в групата с АСО, съответно 3.71. Не се установиха сигнификантни разлики за нито един от трите параметъра между трите изследвани групи (TNF-alpha, $p=0.926$; IL-6, $p=0.392$, IL-1beta, $p=0.465$). От проведените изследвания може да се обобщи, че пациентите с астма-ХОББ припокриване са с най-изразен риск от развитие на Метаболитен синдром (най-висок ВМІ и НОМА-index), като последният от своя страна може да се окаже рисков фактор за развитие на АСО при пациентите с астма.

Научни публикации и прояви:

- Недева Д. Астма-ХОББ overlap синдром. Алергии, Хиперсензитивност, Астма 2016;13(2): 73-8

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 37/2016 Установяване на асоциации между свръхчувствителност към хранителни алергени и полиморфизъм в локус HLA-DRB1

Изследователски екип: Доц. Иван Димитров Димитров, дх

- Проф. Ирини Дойчинова-Цекова, дхн
- Таня Кадийска, дб
- Доц. Албена Тодорова-Георгиева, дб
- Михаела Младенова

- Венцислав Йорданов, докторант

Базова организация: Катедра „Химия”, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Създадена е база данни за 30 пациента с алергии към хранителни и инхалаторни алергени и отрови. Пациентите са генотипизирани по HLA-DRB1. Трима пациенти от изследваната група са носители на алели HLA-DRB1*14:19/14:21. Двама от тях – деца на 6-и и 14-месечна възраст, проявяват алергия към протеините на кравето мляко Bos d5 (лактоглобулин) и Bos d6 (говежди серумен албумин). При третият пациент – дете на 5-годишна възраст, не се наблюдава алергична реакция към краве мляко. Структурно най-близкият до HLA-DRB1*14:19/14:21 алел, е HLA-DRB1*03:01. Той е известен като протективен за алергия към протеините на кравето мляко. Проведена е *in silico* ензимна хидролиза на Bos d5 и Bos d6 с храносмилателни ензими пепсин, трипсин и химотрипсин. Определени са намерените пептиди, произхождащи от изследваните алергени и свързващи се към HLA-DRB1*14:19/14:21 и HLA-DRB1*03:01. Ензимната хидролиза с комбинация от трите храносмилателни ензима не оставя нито един свързващ пептид и към трите алела. Концентрацията и активността на храносмилателните ензими при децата имат по-ниски нива в сравнение с тези при възрастните. Получените резултати предполагат, че алелите HLA-DRB1*14:19 и HLA-DRB1*14:21, също като HLA-DRB1*03:01, са протективни за алергия към протеините на кравето мляко. Проявената алергия на двамата пациенти към протеините на кравето мляко по-вероятно се дължи на понижени нива на храносмилателните ензими, обусловени от възрастта на пациентите, отколкото на HLA специфичност. Липсата на достатъчно информация за генотипа на останалите 27 пациенти не позволява установяване на асоциации между свръхчувствителност към хранителни алергени и полиморфизъм в локус HLA-DRB1.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 57/2016 Проучване ролята на имуногенетични биомаркери при пациенти с пренеоплазии и спиноцелуларен карцином на устната лигавица

Изследователски екип: Доц. Елица Георгиева Деливерска-Александрова, дм

- Доц. Милена Шиварова, дм
- Проф. Радомир Угринов, дмн
- Проф. Елисавета Наумова-Григорова, дмн
- Д-р Христо Стоянов
- Д-р Лъчезар Петков
- Д-р Велизар Шиваров - УМБАЛ Софиямед
- Иван Павлов, докторант

Базова организация: Катедра по орална и лицево-челюстна хирургия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящето проучване е да се анализира връзката между MICA полиморфизма и оралния спиноцелуларен карцином. Изследвани са 27 пациента с хистологично доказан орален спиноцелуларен карцином. Преобладаваща група от пациенти са с G2-G3 тумори съгласно класификацията по Anneroth. Контролната група включва здрави индивиди от българската популация. MICA генотипизирането е извършено чрез PCR-SSO метод (LABType SSO MICA, OneLambda). Получените

резултати показват статистически- значима протективна асоциация за MICA*12:01 алела ($P < 0.05$, OR=0.07), кодиращ протеин с пълна дължина. Допълнително този алел се характеризира с по-висока честота в здравата българска популация в сравнение с други европейски популации. На-чест при пациентите с орален спиноцелуларен карцином е MICA*08:01 алела, кодиращ скъсен протеин. Разликата с контролната група, обаче не е статистически значима ($P = 0.053$). Въпреки че, поради сравнително малкия брой изследвани пациенти резултатите от проучването могат да се разглеждат като предварителни, те подкрепят модела, според който алели, кодиращи скъсени и разтворими MICA молекули функционират като негативни регулатори на NKG2D върху NK и CD8+ T клетките. Това от своя страна води до аберантен имунологичен надзор.

Научни публикации и прояви:

- Ал Хадра Б, Шиварова М, Деливерска Е, и др. MICA –характеристика и роля при спиноцелуларния карцином в устната кухина сп. Здраве и наука, юни 2017, стр 2-6
- Al Hadra B, Deliverska E, Stoianov H, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. 31st EFI & 25th DGI Joint Meeting, 30.05-03.06.2017, Mannheim/Heidelberg
- Ал Хадра Б. Дипломна работа: Проучване ролята на MICA полиморфизъм за развитие на орален спиноцелуларен карцином. Ноември 2016.
- Deliverska E, Ivanova M, Stefanov L, et al. MICA as a Biomarker of Predisposition to Oral Squamous Cell Carcinoma. 29-th Eur Congress of Pathology, Pathology for patient care. 2-6 Sep, 2017, Amsterdam

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 60/2016 Референтни граници за оксидазна активност на церулоплазмин за българската популация. Меден статус – нови лабораторни аспекти при пациенти с болест на Уилсън

Изследователски екип: Доц. Бисера Димитрова Атанасова, дм

- Ирена Иванова, дм
- Ас. Анна Костадинова
- Соня Драгнева, дм
- Д-р Таня Петкова

Базова организация: Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Характеризирането на медния статус в организма означава възможност за измерване на показатели, свързани с медната обмяна. Най-често използван лабораторен показател за това е серумна/плазмена концентрация на медта. В по-голямата си част (70-95%) медта (Cu) се намира в комплекс с белтъка церулоплазмин (Cp). Последният може да бъде определян като концентрация (iCp g/L) или да бъде измерена неговата оксидазна ензимна активност (eCp IU/L). Стойностите за eCp дават информация за функционалния капацитет на Cp и в сравнение с iCp имат по-голяма специфичност и чувствителност при диагностиката на състояния с вроден дефект в медната обмяна, като болестта на Уилсън (БУ). За определяне на референтни граници на eCp в българска популация са изследвани 42 пациенти (мъже:жени=16:26; средна възраст 43 ± 13 г.). eCp е определена чрез

автоматичен ензимен метод с хромоген субстрат o-dianisidine на ABX Pentra. Използвана е програмата REFVAL. В проучването още са включени общо 27 болни с БУ с предимно чернодробна изява (мъже:жени=13:14; средна възраст 38±12г.), и 21 здрави контроли (мъже:жени=10:11; средна възраст 43±8 г.). На всички тях са определени следните показатели: серумна мед (sCu), цинк (sZn) и желязо (sFe), iСр, трансферин(Tf), феритин (Fer) и Ср/Tf отношение. Референтните граници за eСр за българската популация са 82 – 144 IU/L. Значима разлика между болните с БУ и здравите контроли е установена при: sCu(p<0.001), sZn (p<0.001), iСр (p<0.001), Tf (p=0.007) и Ср/Tf (p<0.001). Без статистическа разлика са sFe (p=0.13) и Fer (p=0.54). Настоящото проучване е първото съвременно установяване на референтен интервал за eСр в здрави българи. Получените стойности са близки до цитираните в литературата (60 – 140 IU/L). eСр е актуален показател, който заедно с другите физиологично свързани протеини в микроелементният метаболизъм (трансферин, феритин и хепсидин), дават нови надежди за диагностични и прогностични маркери не само при рядко диагностицирани болести, като БУ, но и при широк кръг патологични състояния свързани с повишен оксидативен стрес – невродегенеративни процеси, хронични състояния и стресови реакции.

Научни публикации и прояви:

- Атанасова Б, Иванова И, Костадинова А и др. “Iron and copper”. Микроелементи – съвременни аспекти в клиничното им приложение. УМБАЛ „Св. Иван Рилски” София. Семинар. 29 Септември 2016.
- Иванова И, Атанасова Б, Драгнева С и др. Сравнителен анализ на мед и цинк в серум и урина при български пациенти с чернодробна изява на болестта на Уилсън и с други хронични чернодробни заболявания. VII Национална конференция по редки болести и лекарства сираци. Пловдив. 9-10 Септември 2016. Редки болести и лекарства сираци, брой 3, 2016.
- Ivanova I. Copper status – laboratory aspects and clinical application in different diseases. PhD thesis. Sofia, 2016.
- Ivanova I. Copper status – Clinical application: Wilson disease and neurodegenerative disorders. Expert Round table, Regional meeting for Patients and Doctors – Advanced in the treatment of Wilson’s disease; Skopje, 25 November 2016
- Ivanova I, Siotto M, Genova M et al. Study of ceruloplasmin activity in healthy Bulgarians. EUROMEDLAB Athens. 11-15 Jun, 2017.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 61/2016 Ниво на витамин Д сред пациенти с дихателни нарушения по време на сън

Изследователски екип: Проф. Даниела Стоичкова Петрова-Николова, дм

- Проф. Огнян Георгиев, дм
- Ас. Даниела Милетиева
- Гл. ас. Аделина Цакова
- Ас. Радослав Билюков
- Ас. Цанко Мондешки
- Гл. ас. Венцислава Пенчева-Генова, дм

Базова организация: Катедра по пропеедвтика на вътрешните болести, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследвани са пациенти с умерена и тежка степен на ОСА. Пациентите имат значително по-високи резултати на ИТМ и обиколката на шията, в сравнение с контролната група здрави лица. Резултатите от ESS показват статистически значимо по-високи стойности при ОСА. Пациентите със ОСА са с дефицит и тежък дефицит на витамин D. Това е причина за вторичен хиперпаратиреоидизъм и повишено костно разграждане. Тежката степен на ОСА се асоциира с по-голяма продължителност на средното десатурационно ниво по време на сън и тежък дефицит на витамин D. Започване на лечение с Неинвазивна вентилация е свързано със сигнификантно повишаване нивата на Витамин D, като се взима в предвид и значението на различните сезони. Ниските нива на витамин D участват в патогенезата на ОСА. Дефицитът на Витамин D е причина за вторичен хиперпаратиреоидизъм. ОСА е рисков фактор за вторична остеопороза и повишен фрактурен риск, независимо от възрастта. Ниските нива на 25(OH) D се асоциират с по-тежка степен на обструктивна сънна апнея, по-голяма продължителност на десатурационните епизоди, по-висок ИТМ и обиколка на шията. Пациентите със затлъстяване (ИТМ над 30) и по-голяма обиколка на шията са с тежък витамин D дефицит. При сезонно проследяване след започване на лечението с Неинвазивна вентилация сигнификантно нараства нивото на витамин D. Препоръчително е пациентите с ОСА да подлежат на задължителен скрининг за остеопороза. За да се намали фрактурния риск под 22%, стойността на витамин D през зимата трябва да е по-голяма от 24нмол/л, т.е да се касае за умерен витамин D дефицит. Данните са сравними с изнесените данни от други автори. Резултатите потвърждават установената зависимост между нивата на витамин D, тежестта на сънната апнея и резултата от лечението с Неинвазивната вентилация. Получените от нас данни подчертават необходимостта от бъдещи проучвания на ефектите от Неинвазивната терапия върху хормоналните и костни промени при при по-голям брой пациенти с ОСА.

Научни публикации и прояви:

- Красиминова Д, Д Петрова, О Георгиев и др. Витамин D -известното и неизвестното - Торакална медицина, 2016,8(1),58-75
- Красиминова Д, Д Петрова, О Георгиев, и др. Ниво на паратиреоидния хормон и витамин D при пациенти с обструктивна сънна апнея в зимния сезон. Торакална медицина, 2017,9(3):38 -55
- Красиминова Д, Д Петрова, О Георгиев, и др. Ниво на паратиреоидния хормон и витамин D при пациенти с обструктивна сънна апнея в зимния сезон. Международен конгрес ERS- Милано, 9-13 септември 2017.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 62/2016 Проучване на диагностичното и прогностично значение на някои нови биомаркери (ССА-СА и М2-РК в кръвен серум и IGF-1 в жлъчка) при пациенти с механичен иктер

Изследователски екип: Проф. Виолета Димитрова Маринова, дмн

- Владислав Стоянов, докторант

- Елена Арабаджиева, дм
- Драгомир Дарданов, дм
- Д-р Лилия Симонова
- Доц. Атанас Йонков, дм
- Доц. Димитър Буланов, дм
- Доц. Сашо Бонев, дм

Базова организация: Катедра по обща и оперативна хирургия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проекта е да се проучи диагностичното и прогностично значение на изследването на ССА-СА и IGF-1 в кръвен серум и жлъчка, при пациенти с механичен иктер. За периода 2016-2017, се извърши клинично-лабораторно изследване на серумната и жлъчната концентрация на ССА-СА и IGF-1 при 30 пациенти с механичен иктер. В зависимост от причината за иктера, пациентите са разделени на 3 групи: I – 9 пациенти с карцином на екстрахепаталните жлъчни пътища (КЕХЖП); II – 11 пациенти с карцином на панкреаса и III – 10 пациенти с доброкачествени заболявания на жлъчните пътища и жлъчния мехур. При всички пациенти бе взета кръв предоперативно, както и жлъчен сок по време на оперативното лечение. Получените материали се съхраниха според изискванията за стандартите на Клиничната лаборатория. Използвани бяха специални китове и метода на ELISA. За установяване на ССА-СА и IGF-1 в серума и жлъчния сок бяха използвани human CCA_tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial (TRNT1) ELISA Kit и human IGF-1 ELISA. Получените резултати се обработиха статистическа с помощта на SPSS 19.0.0. От изследваните 30 пациенти 17 са жени (56,7%) и 13 – мъже (43,3%). Съответно съотношението мъже:жени е 1:1,3 Средната възраст в извадката е 63 години. Установи се статистически значима разлика, както на серумната, така и на билиарната концентрация на туморните маркери между групата пациенти с КЕХЖП и карциномите на панкреаса, КЕХЖП и групата на доброкачествените заболявания на жлъчните пътища, както и между КЕХЖП и останалите две групи взети заедно. Получените от нас първоначални резултати имат теоретична, методологична и практическа стойност. Потвърждават теоритичната хипотеза, че при пациентите с КЕХЖП се установяват завишени стойности на ССА-СА и IGF-1 в жлъчен сок и кръвен серум. Практически, изследването на тези маркери при пациенти с механичен иктер дава допълнителна информация за разграничаването на малигнена от бенигнена етиология. Могат да служат и за диагноза и потвърждение на КЕХЖП.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 64/2016 Изследване на серумни антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с муковисцидоза и сравнение на резултатите от стандартно микробиологично изследване на секрети от дихателните пътища

Изследователски екип: Доц. Гергана Петрова Стоянова, дм

- Доц. Таня Стратева, дм
- Снежина Лазова, докторант
- Д-р Димитринка Митева
- Д-р Спаска Лесичкова

- Проф. Пенка Переновска, дм

Базова организация: Катедра по педиатрия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Инфектирането с *P. aeruginosa* (РА) е крайъгълен момент в естествения ход на заболяването муковисцидоза (МВ), тъй като неговото наличие е свързано с влошаване на белодробните показатели и е значителен прогностичен белег за смъртността. Освен с култивиране на бактериите, инфекция с РА може да се открие и чрез имунния отговор на макроорганизма. От 140 пациента с МВ (на средна възраст от 0 до 61 години) критерии за хронична РА инфекция покриват 91 (65,4%). На случаен принцип на част от тях, както и на всички останали пациенти (49), след получаване на информирано съгласие бе извършено изследване за антитела срещу РА чрез готов ELISA – кит в серума. Извършена е и прецизна микробиологична диагностика. Резултатите от двата метода са анализирани и съпоставени. При 10 пациента с поне еднократно изолиран РА, съобразно получените комбинирани резултати е започнато антибиотично лечение. Серологичното изследване е повторено на 3-ти и 6-ти месец от началото на лечението, а микробиологичното – на 6-тия месец. В изследваната група от 49 пациенти, при които не се доказва причинител в храчката, при 25 се установи завишен титър на антителата (39.06%), като при почти половината от тях (12 пациента) титрите са в нива, отговарящи на хронична инфекция. При тях в рамките на 3 до 12 месеца след първоначалното изследване) при 8 се доказва наличие на РА и в храчка. При 10-те деца на 3-ти и 6-ти месец след начало на лечението се установи сигнификантен спад на титъра на антителата и подобрене на показателите от функционалното изследване на дишането за всички пациенти / с изключение на пациента без промяна в терапията, при когото бе наблюдавана обратната тенденция/. Резултатите потвърждават ролята на изследването на антителата като полезен маркер за прогреса на инфекцията и отговора на антибиотичното лечение при пациенти с МВ.

Научни публикации и прояви:

- Петрова Г, Переновска П, Лесичкова С, др. Мястото на изследване на серумните антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с муковисцидоза, сп. Наука пулмология 11, 2016, N 4, с. 22-27
- Митева Д, Переновска П, Лесичкова С, и др. Псевдомонас Антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с муковисцидоза, сп. Здравен Навигатор брой 2017;2(10):14-16
- Петрова Г, Переновска П, Лесичкова С, и др. Проследяване на титъра на антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с муковисцидоза – клинично приложение, Торакална медицина брой 2 (9)2017, стр. 44-55
- Петрова Г, Переновска П, Лесичкова С, и др. Инфекция с *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с муковисцидоза – съвпадение на резултатите от микробиологичното и имунологичното изследване, сп. Наука пулмология брой 3, 2017, стр. 4-13
- Митева Д, Переновска П, Лесичкова С, и др. Псевдомонас Антитела срещу *Pseudomonas aeruginosa* при пациенти с муковисцидоза, XVIII-та Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, 19-21.05.2017 Сл. бряг
- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Is diagnostic of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in Bulgarian CF patients? *J Cyst Fibros* 2017;16:S108
- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Imperfection of Sputum Examination for Chronic Lung Infections in Bulgarian CF Patients. *Pediatr Pulmonol* 2017;52:S132-S133.

- Cholakova K, Petrova G, Perenovska P, et al. Possible early detection of *Pseudomonas aeruginosa* in CF patients in Bulgaria could help prevent a chronic infection. XVI Int Congress Of Medical Sciences, 1-14.05.2017 Sofia.
- Petrova G, Tzotcheva I, Perenovska P, et al. 35th Annual Meeting of the Eur Society for Paediatric Infectious Diseases, 23-27.05.2017, Мадрид, Испания The sputum sample alone is not enough for chronic *Pseudomonas* infection detection in cystic fibrosis patients, ESP17-0700
- Petrova G, Perenovska P, Zafirovski Lj, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in bulgarian CF patients, is the sputum examination enough. 47 Pedijatrijski Dani Srbije sa međunarodnim učešćem, 6-8. 10. 2016. Ниш, Сърбия
- Petrova G, Zafirovski L, Lesichkova S, et al. Clinical application of the antibodies against *Pseudomonas aeruginosa*. 48 Pedijatrijski Dani Srbije sa međunarodnim učešćem, 5-7. 10. 2017 Ниш, Сърбия

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 65/2016 Изследване на белодробната функция при деца със сколиоза

Изследователски екип: Проф. Пенка Илиева Переновска, дм

- Снежина Лазова, дм
- Доц. Гергана Стоянова, дм
- Христина Рафаилова
- Доц. Васил Яблански, дм – МБАЛ Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда
- Д-р Евгени Влаев - МБАЛ Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда
- Д-р Стаматис Прифтис

Базова организация: Катедра по педиатрия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Сколиозата е честа деформация, засягаща гръдната клетка, с потенциално тежки и необратими ефекти върху белодробната функция. Причинява се от странично разместване и ротация на прешлените тела. Най-често възниква в периодите на бърз соматичен растеж. Гръбначното изкривяване оказва ефект върху анатомията и функциите на гръдната клетка, върху функцията на дихателните пътища и белодробния паренхим, както и върху останалите вътрегръдни органи. Белодробната функция при децата с ранно начало на гръбначното изкривяване е най-тежко засегната. Установяването на бронходилататорна обратимост при децата със сколиоза се асоциира с по-тежък рестриктивен вентилаторен дефект и с по-чести прояви на лесна физическа уморяемост и намален толеранс при физическо натоварване. Показателите от спирометрията показват много добра корелация с оценката на физическия толеранс и с установяването на хипоксемия (кислородна сатурация, оценена с пулсоксиметрията и с КГА). При използване на метода *arm span* за определяне на ръста, чувствителността на спирометрията като скринингов тест за детекция на ранни рестриктивни нарушения при деца със сколиоза нараства и се доближава до тази на плетизмографското изследване. Спирометрията е най-достъпният и широко разпространен в медицинската практика метод за функционално изследване на дишането – добре стандартизиран и не изисква скъпа и специално оборудвана функционална лаборатория. Включването му в протокола за цялостен подход (проследяване и лечение) при деца с гръбначни изкривявания е

практически лесно приложимо и би имало голям медицински (биологичен, психологичен) и социален ефект. Според наша информация към момента в страната не са извършвани такива изследвания при деца със сколиоза и получените резултати допълват успешно европейската и световната литература (теоретичен принос) като допринасят и за оптимизирането на процеса на проследяване на тези деца (практически и приложен принос).

Научни публикации и прояви:

- Лазова С, В Яблански, П Переновска и др. Оценка и сравнение на спирометричните индекси на деца със сколиоза и с бронхиална астма. Педиатрия, брой 26;2017, 6-11 стр.
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. Lung Function parameters in asthma, severe asthma and scoliosis in children. Int Severe Asthma Forum. Manchester, UK. 17-19 Nov 2016
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. The impact of scoliosis on lung function in children. 16th Int Congress on Pediatric Pulmonology. Lisbon, Spain Jun 22-25, 2017.
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. Pulmonary function tests in children with scoliosis – oral presentation. 47 Pedijatrijski dani Srbije sa medunarodnim ucescem. Nish, Serbiq. 6-8 Oct 2016
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. Pulmonary function tests in children with scoliosis – oral presentation. Congress of Respiratory Medicine of the Republic of Macedonia. Ohrid, Macedonia. 6-9 Oct 2016
- Papochiev K, Lazova S, Yablanski V et al. Lung in distress - asthma vs. scoliosis. VI Int Congress of Medical Sciences. Sofia, Bulgaria. 11-14 May 2017.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 66/2016 Клинико-морфологичен разрез и анализ на мекотъканни тумори с ретроперитонеална локализация; проучване и оценка на диагностична, клинична и прогностична стойност на имунохистохимичната експресия на P53 и MDM2

Изследователски екип: Доц. Атанас Стефанов Йонков, дм

- Самиа-Надин Катибова, докторант
- Гл. ас. Иванка Станчева, дм
- Ас. Тихомир Диков
- Весела Тодорова, дм
- Тихомир Петков, студент

Базова организация: Катедра по обща и оперативна хирургия, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: При анализ на документацията на пациентите с ретроперитонеални тумори, оперирани в клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия на УМБАЛ „Александровска“ за периода 2005-2016 год., се селектираха 18 пациента с диагноза „липосарком“ (12 добре диференцирани към момента на дебют и 6 дедиференцирани към същия момент), подходящи за фенотипни и молекулярни изследвания. От тях мъже – 20, на възраст от 37.6 до 76.1 г. /средна възраст 57.1 г./; жени – 8, на възраст от 27 до 81.9 г. /средна възраст 55 г./. Размерите на туморните формации варират от 4 до 30 см, средно 15

см. 11 от 18-те случая с липосаркомната група са с един или повече рецидиви. Като контролна група бяха определени 10 случая с най-близки мекотъканни диференциални диагнози (липом с размер над 15 см – 2 бр., дезмоид – 1; лейомиосарком – 3; малигнен тумор от обвивките на периферните нерви - 2, недиференциран плеоморфен сарком - 2). Имунохистохимична експресия на MDM2 се установи при 89% от случаите в групата на изследваните липосаркоми, респективно 20% от случаите в контролната група. Потвърди се тенденцията за увеличаване експресията на MDM2 в хода на дедиференциацията на липосаркомите, като най-висок е дялът на позитивните случаи при рецидивите – 91%. Имунохистохимично детектируемата експресия на протеинно ниво отразява завишен брой *MDM2* генни копия върху хромозома 12, което е успоредно на етапите на дедиференциация на липосаркомите с устойчиво по-висок среден брой на генните копия при дедиференциран липосарком – средно 16 броя спрямо 9 броя генни копия при добре диференциран липосарком. В нелипосаркомната, контролна група не се установиха *in situ* хибридационни данни за амплификация в *MDM2* генния локус върху хромозома 12. Селектираните за молекулярни изследвания парафинови блока представляват база данни – временна биобанка, която да послужи за следващи проучвания, най-вече изследване на имунохистохимичната експресия на p53 с последващ анализ на взаимодействието MDM2-p53.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 69/2016 Синдром на поликистозните яйчници и сърдечно-съдов риск

Изследователски екип: Гл. ас. Антоанета Трифонова Гатева, дм

- Проф. Здравко Каменов, дмн
- Ас. Цветелина Великова, дм

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В проучването бяха включени 80 пациентки – 25 със затлъстяване, 35 със СПЯ без затлъстяване и 20 със СПЯ и затлъстяване. Групите бяха сходни по възраст, но жените със СПЯ без затлъстяване имаха значимо по-ниски ИТМ, обиколка на талията, WHR и WSR отколкото жените със затлъстяване с и без СПЯ. Пациентките със затлъстяване със или без СПЯ имаха значимо по-висока честота на висцерално затлъстяване от тези със СПЯ без затлъстяване, въпреки че около 1/3 от тях имаха висцерално преразпределение на мастната тъкан. При пациентките с висцерално затлъстяване се установиха значимо по-високи нива на кръвната захар в хода на ОГТТ, на ИРИ на 0, 60 и 120 мин, НОМА-индекса, HDL-холестерола, VLDL-холестерола и триглицеридите, АЛАТ и ГГТ, пикочна киселина, левкоцити и СУЕ. Пациентките със СПЯ и затлъстяване имаха най-лоши показатели по отношение на въглеhidратната обмяна, като статистическа значимост се установи по отношение на ИРИ на 0 и 60 мин от ОГТТ, НОМА-индекса и честотата на инсулинова резистентност. Наблюдавахме тенденция към по-ниски нива на пероксиредоксин 4 при жените със СПЯ без затлъстяване (5674.8 ± 3822.4 pg/ml), по-високи при жените със СПЯ и затлъстяване (6588.9 ± 3731.0 pg/ml) и още по-високи при жените със затлъстяване без СПЯ (7724.6 ± 4840.4 pg/ml). Пациентките с абдоминален обезитет според обиколката на талията и WSR имаха значително по-високи нива на Peroxiredoxin 4 в сравнение с тези без (7108.2 ± 4568.0 vs.

5079.8±2555.4 pg/ml; p=0.015 and 7310.6±2646.2 vs. 4785.0±2646.2 pg/ml; p=0.013). Не се наблюдаваше разлика в нивата на Peroxiredoxin 4 при пациентки с и без инсулинова резистентност, артериална хипертония, дислипидемия, хиперандрогенемия и метаболитен синдром. Peroxiredoxin 4 показва слаба позитивна корелация с теглото ($r=0.228$; $p=0.044$) и VAI ($r=0.278$; $p=0.031$) и по-силна със СУЕ ($r=0.4$; $p<0.01$), но не и с хормоналните параметри и индексите за инсулинова чувствителност. В заключение жените със СПЯ без затлъстяване имат най-ниски нива на класически и нови (пероксиредоксин 4) сърдечно-съдови рискови фактори.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 70/2016 Неврологични, съдови и биохимични фактори в еволюцията на диабетното стъпало

Изследователски екип: Проф. Здравко Асенов Каменов, дмн

- Проф. Иван Поромански, дм - УМБАЛСМ „Пирогов“
- Проф. Юлия Петрова, дмн
- Доц. Добрин Василев, дм
- Цветан Гатев, докторант
- Силвия Начева, докторант
- Ас. Явор Асьов, дм
- Гл. ас. Антоанета Гатева, дм
- Ас. Цветелина Великова, дм - УБ „Лозенец“.

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на нашия проект е да се анализира участието на някои неврологични, съдови и биохимични фактори в еволюцията на диабетното стъпало, чрез използване на въпросници, инструментални и лабораторни изследвания. В изследването бяха включени 84 диабетика над 40 години, от които 56 мъже (66.7%) и 28 жени (33,3%) със средна възраст 55.8 ± 9.3 години и разделени в 3 групи – с новодиагностициран захарен диабет ($n=31$; 36.9%), със ЗДТ2 и доказана диабетна полиневропатия ($n=33$; 39.3%) и с диабетно стъпало ($n=20$; 23.8%). На пациентите бяха проведени рутинни кръвни изследвания на серумни биомаркери (ЦистатинЦ, Васпин и ТромбоксанА2), апаратни изследвания (индекс глезен/мишница, дебелина на интима-медия, биотезиометър, EZ скан, оценка на Neuropathy Disability Score, ЕМГ, ЕНГ, симпатиков кожен отговор, ендотелен тракинг, капиляроскопия), антрометрия, оценка чрез въпросници – NSS (Neuropathy Symptom Score) и MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument). Като резултат се установиха статистически значимо по-високи нива на Цистатин Ц в групата с диабетно стъпало и в групата със захарен диабет тип 2 и доказана полиневропатия в сравнение с тези, които са с новодиагностициран захарен диабет. Допълнително се доказва предиктивната роля на този биомаркер за еволюцията през диабетна полиневропатия до диабетно стъпало ($AUC=0,683$; CI_{95} ; 0,566-0,799, $p=0,005$). Установи се по-изразена асиметрия на електрохимичната проводимост на краката (EZscan) при пациентите с диабетно стъпало в сравнение с новодиагностицираните диабетници и тези със ЗДТ2 с давност и доказана полиневропатия. Също така се потвърди и по-дебел интима-медия слой на общата каротидна артерия при пациентите с диабетно стъпало в сравнение с

групата на новооткритите диабетици. От използваните въпросници и полуколичествени методи се доказва предиктивна стойност за развитие на диабетно стъпало на Мичиганския скринингов инструмент (MNSI >10.5 има 83.3% чувствителност и 70% специфичност за риск от диабетно стъпало) и NDS (>6.5 има 95% чувствителност и 80% специфичност за същия риск). В заключение нивата на Цистатин Ц, асиметрията на стъпалата (EZ scan), дебелината на интима-медия слоя, в допълнение с информацията от MNSI и NDS могат да имат практическа полза за по-ранно идентифициране на хората с риск да развият диабетно стъпало.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 71/2016 Проучване значението на имунологични и имуногенетични фактори за развитието на ВКV репликация след трансплантация

Изследователски екип: Проф. Елисавета Йорданова Наумова, дмн

- Доц. Снежина Кандиларова, дм
- Атанаска Георгиева
- Яна Кръстева
- Валентина Атанасова
- Цветелин Луканов
- Проф. Анастасия Михайлова

Базова организация: Катедра клинична лаборатория и клинична имунология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящото проучване беше да се анализират данните от ВК вируса (ВКV) мониторинга на пациенти след БТ с оглед оценка на рисковите фактори, свързани с появата на вирус-индуцирани усложнения. За тази цел наред с ВК репликацията при реципиентите изследвахме и анализирахме имунологични фактори като HLA антигените, алореактивността, клетъчният имуногенетичен статус преди и в ранния след-трансплантационен период, тъканната несъвместимост, наличие на CMV, EBV ко-инфекции, време на диализа, кръвопреливания и някои демографски особености. Резултатите от настоящото изследване показаха, че ВКV се реплицира както в урина, така и/или в плазма във всеки един период след трансплантация, което налага оптимизиране на схемите за проследяване. Развитието на други ко-инфекции при трансплантираните не е взаимосвързано с наличието на ВК вiremия и обратно. Установи се тенденция за повишен риск от ВКV инфекция при по-възрастни реципиенти, при такива от мъжки пол, при индивиди с по-висока степен на тъканна несъвместимост и при такива на продължително хемодиализно лечение. Видът на донора и носителството на определени HLA алели, както и алореактивността от хуморален тип не предопределят повишен риск за ВК реактивация. Увеличеният абсолютен брой на НКТ клетките в ранния след-трансплантационен период е свързан с повишен риск от развитие на ВК вiremия/вирурия ($p=0.013$), което насочва и към роля на неспецифичния имуногенетичен отговор в патогенезата на инфекцията. Установените от нас имунологични и други фактори, асоциирани с репликация на ВКV биха подпомогнали индивидуалното и насочено проследяване на пациенти с повишен риск от неефективен отговор срещу ВК вируса, което от своя страна би подобрило профилактиката и терапията.

Научни публикации и прояви:

- Георгиева А, С Михайлова, Я Кръстева, и др. Роля на вирусологичния мониторинг на ВКV репликация при бъбречно трансплантирани пациенти. Годишник на БАКИ 2016, 79-84.
- Кръстева Я, Георгиева А, Михайлова С, и др. Персистираща ВКV инфекция при пациентка след бъбречна трансплантация-клиничен случай. Годишник на БАКИ, Юбилейна научна конференция, 28-29 октомври 2016, София. Сборник резюмета, 52.
- Георгиева А, С Михайлова, Я Кръстева, и др. Роля на вирусологичния мониторинг на ВКV репликация при бъбречно трансплантирани пациенти. Годишник на БАКИ, Юбилейна научна конференция, 28-29 октомври 2016, София. Сборник резюмета, 13.

Научният отчет е приет с *ДОБРА* оценка по скалата на СМН.

Договор 72/2015 Връзка на стреса като невроендокринен фактор с клиничния ход на болестта при пациенти с хронична уртикария

Изследователски екип: Доц. Мария Тончева Стаевска-Коташева, дм

- Проф. Васил Димитров, дм
- Ас. Елена Петкова
- Ас. Денислава Недева
- Ас. Анна Димитрова, докторант
- Ас. Аделина Цакова

Базова организация: Клиничен център по алергология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: При 41 болни с остра и хронична уртикария определихме нивата на лептин, АКТХ и инсулин и ги сравнихме според тежестта на протичане на уртикарията. Изследваните пациенти бяха помолени да попълнят въпросници за определяне нивата на стрес, тревожност и активност/тежест на заболяването. Според хода и тежестта на болестта дефинирахме 3 пациентски групи: остра, лека/средно тежка и тежка/много тежка уртикария. Изследваните пациенти бяха определени по демографски характеристики и сравнени според получените стойности на изследваните показатели. Най-много пациенти (31,7%) от групата с тежка/много тежка уртикария са посочили стреса като основен фактор за настъпване на екзацербация на заболяването. По отношение на приема на НСПВС и вирусните инфекции не се наблюдава подобна разлика. По отношение на хода на протичане на заболяването, статистически значими разлики се откриха за възпалителните маркери D-димер ($p=0,04$) и СУЕ ($p=0,045$) в зависимост от тежестта на болестта, като най-високи стойности за D-димер се установиха в групата на тежка/много тежка уртикария (1,15 mg/l), а за СУЕ – в групата на остра уртикария (10,05 mm/h). Забелязва се тенденция към по-високи стойности на hsCRP (27,01 mg/l) в групата на тежка/много тежка уртикария и в групата на остра уртикария (11,21 mg/l). Средните стойности на общи IgE са най-високи и над нормалните стойности в групата на тежка/много тежка уртикария (141,8 IU/ml). По отношение на нивата на лептин, АКТХ и инсулин не бяха открити сигнификантни разлики в зависимост от клиничния ход на болестта. По отношение на стойностите на DHEA-S, като цяло се наблюдава тенденция

към долна граница на нормата във всички групи (остра: 2,80 mkmol/l; лека/средно тежка: 3,91 mkmol/l и тежка/много тежка 3,60 mkmol/l). Установява се сигнификантна разлика според тежестта на уртикарията и резултатите от проведените тестове за тревожност ($p = 0,02$) и за активност на уртикарията ($p = 0,04$). Не се открива статистически значима разлика за теста за стрес на Холмс Рае, но се наблюдава тенденция към по-висок брой точки в групата на пациентите с тежка/много тежка уртикария (остра: 150,3 т.; лека/средно тежка: 187,9 т. и /много тежка 238,3 т.). Установява се, че пациентите, които са посочили стреса като провокиращ екзацербация на заболяването фактор имат най-висок брой точки от въпросниците за стрес и тревожност (съответно 232,9 т. и 24,3 т.).

Научни публикации и прояви:

- Петкова Е, Стаевска М, Валериева А, и др. Връзка на стреса като невроендокринен фактор с клиничния ход на болестта при пациенти с хронична уртикария. Алергии, хиперсензитивност, астма 2016, 13 (2):34-40

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 73/2016 Оценка на NT-proBNP при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност

Изследователски екип: Доц. Рая Стефанова Иванова, дм

- Доц. Добрин Василев, дм
- Гл. ас. Аделина Цакова, дм
- Гл. ас. Теодора Янева-Сиракова, дм
- Ас. Зоя Васкова
- Ас. Ценка Бонева
- Ас. Галина Златанчева, докторант
- Д-р Пламен Дунев
- Проф. Румяна Къдрева

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на нашето проучването бе да оценим диагностичната и прогностична стойност на сърдечно-съдовия биомаркер NT-proBNP при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност (ХСН). В проучването са включени общо 60 пациента с ХСН (46 м, 14 ж, mean age 66.27 ± 12.65 г, 7- II-ри, 44-III-ти и 9-IV-ти ФК по NYHA). Базалните стойности на NT-proB изследвахме при всички случаи, а при 38 от тях контролно, най-малко един месец след включване в проучването, на фона на оптимизирана терапия за ХСН. При 11 пациента бе регистрирано сърдечно-съдова смъртност за периода на проучването. Диагнозата на ХСН бе поставена на базата на стандартни клинично-лабораторни и ехокардиографски параметри. Резултати: Базалните нива на NT-proBNP бяха повишени (над 125 pg/ml) при 56 пациента (93%), вариращи в широки граници ($88,71 - 34995,07 \text{ pg/ml}$). Средната стойност на биомаркера бе значимо по-висока при пациентите с IV ФК по NYHA в сравнение с тази на пациентите с II-ри и III-ти ФК по NYHA ($p=0.012-0.001$). При пациентите с летален изход нивото на NT-proBNP бе значимо по-високо в сравнение с останалите пациенти ($18260,82 \pm 12483,49 \text{ pgl/ml}$ и $5730,14 \pm 9148,78 \text{ pg/ml}$, $p < 0.0001$). Чрез ROC крива определихме, че cut-ff стойността от $5952,04 \text{ pg/ml}$ е с чувствителност 90% и специфичност 78%, (area under the curve 0.855).

Средната стойност на контролния NT-proBNP бе значимо по-ниска в сравнение с тази на базалния NT-proBNP ($p=0,032$), като само при 3 случая бе отчетено нарастване на биомаркера. Стойностите на базалния NT-proBNP корелираха позитивно с тези на креатинина ($p=0,0001$), калия ($p=0,021$) и hs тропонина ($p=0,0001$), както и с ехокардиографските параметри ЛКСР ($p=0,046$), ЛКТСО ($p=0,008$) и диаметър на в.кава инфериор ($p=0,045$). Обратна връзка установихме със стойностите на хемоглобина ($p=0,042$), eGFR ($p=0,003$) и натрия ($p=0,001$), както и с ЛКФИ ($p=0,023$). В заключение, нашите резултати показват че NT-proBNP е ценен сурогатен маркер за определяне на прогнозата и мониториране на отговора на терапията на пациентите с хронична сърдечна недостатъчност.

Научни публикации и прояви:

- Бонева Ц, Иванова Р, Василев Д. Натрийуретичните пептиди като прогностичен маркер в диагностиката, прогнозата и терапията на сърдечната недостатъчност. Медикарт, 2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 74/2016 Възпаление и тиреоиден аутоимунитет при пациенти с фибромиалгия

Изследователски екип: Проф. Рашо Колев Рашков, дмн

- Гл. ас. Валентина Решкова, дм
- Проф. Здравко Каменов, дмн
- Гл. ас. Антоанета Гатева, дм
- Гл. ас. Аделина Цакова

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Урвич 13, София 1612

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването е да се установи връзката между нивата на някои възпалителни маркери, наличието на тиреоиден аутоимунитет и прага на болката при пациенти с фибромиалгия. В проучването са включени 43 болни жени (фибромиалгия и остеоартроза с фибромиалгия) на средна възраст 46.1 ± 10.5 години и 18 здрави контроли. От тях 23 жени са във възрастовата граница 43-49 години. Двадесет и три от жените (53,5%) са в менопауза, нито една от тях не приема хормонално-заместителна терапия. От включените в проучването жени с фибромиалгия 74.4% са еутиреоидни, 23.1% - хипотиреоидни (10.3% медикаментозно компенсирани, 12.8% - некомпенсирани) и само една жена е хипертиреоидна. Макар да не можем да потвърдим наличие на статистически значима разлика в проявата на връзка между интерлевкин 17 и автономната невропатия при болните с остеоартроза и фибромиалгия (p -корелационен коефициент 0,237), се установява наличие на ясно изразена различна корелация. Не се установи значима връзка между нивата на IL-17 между жени с фибромиалгия / фибромиалгия и остеоартроза и здрави контроли, въпреки тенденцията към по-високи нива при ФМ (33.1 ± 128.7 vs. 9.1 ± 9.8). Тези резултати означават, че оценката на тиреоидния статус на при болните е важна при пациенти с фибромиалгия. Разликата в концентрация на серумния кортизол при болни с и без аутоимунен тиреоидит не оказва достоверно влияние върху болката при фибромиалгия. Не се установи разлика в нивата на IL17 между жени с и без тиреоиден аутоимунитет. Не се установява значима корелация между нивата на IL-17 и ТСХ.

Проведеното клинично наблюдение и изследването на болните води до практически резултати, свързани с установяването на хипотиреоидизъм като причина за фибромиалгия при повече от 30% от болните. Установява се ясно отчетлива, макар и не статистически значима разлика в концентрацията на интерлевкин 17 – по-висока при болни с фибромиалгия, сравнени със здрави контроли. Това показва, че наличието на процес на възпаление може да е свързано с клиничните показатели при фибромиалгия и това е компонента на смесената болка при фибромиалгия.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 75/2016 Определяне на диагностичната и прогностичната стойност на микрорибонуклеинови киселини в плазма при пациенти със системен лупус еритематозус

Изследователски екип: Доц. Симеон Валентинов Монов, дм

- Гл. ас. Руска Шумналиева, дм
- Вяра Шумналиева-Иванова, дм – IQVIA
- Доц. Радка Кънева, дб
- Дарина Качакова-Йорданова, дб

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Урвич 13, София 1612

РЕЗУЛТАТИ: Експресионните нива на miR-146a бяха анализирани в плазмите на 40 болни със системен лупус еритематозус (SLE) и 10 здрави контроли чрез PCR в реално време, SybrGreen технология. RNU6B референтната контрола беше използвана за нормализация при определяне нивата на изследваната miRNA, както и метода $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. При сравнение с контролите miR-146a в плазма показва понижена експресия в 40%, повишена в 12.5% и без промяна в 47.5% от пациентите. Анализът на ROC кривите показва, че нивата на miR-146a в плазма не могат да разграничат надеждно пациентите от контролите. В предходно проучване установихме, че нивата на анализиранията miRNA в тотална кръв са повишени в 62.5% от пациентите и представляват потенциален диагностичен биомаркер при SLE. Експресионните нива на miR-146a в плазма корелират статистически значимо с нивата в тотална кръв ($rs= 0.402$, $p=0.028$), но не корелират с клиничните показатели на заболяването. Нивото на miR-146a в плазма е значително по-високо от това в кръв при всички изследвани пациенти. В заключение нивата на miR-146a в тотална кръв, но не и в плазма представляват потенциален диагностичен биомаркер при SLE. За потвърждаване на получените резултати е необходимо провеждането на валидиращо проучване включваща голяма група от пациенти със SLE и здрави контроли.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 76/2016 Експресионен анализ на микрорибонуклеинови киселини в плазма при пациенти с ревматоиден артрит и определяне на диагностичната и прогностичната им стойност

Изследователски екип: Проф. Златимир Господинов Коларов, дмн

- Доц. Симеон Монов, дм
- Гл. ас. Руска Шумналиева, дм,
- Вяра Шумналиева-Иванова, дм –IQVIA
- Доц. Радка Кънева, дб
- Дарина Качакова-Йорданова, дб

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Урвич 13, София 1612

РЕЗУЛТАТИ: В текущото проучване бе проведен за първи път експресионен анализ на miR-124 в плазма на 34 пациента с ревматоиден артрит (RA) и 10 здрави контроли. За анализиране на получените резултати от проведения PCR в реално време използвахме $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода. Референтната контрола RNU6B бе избрана за извършване на нормализацията на експресията. При сравнение със здравите контроли установихме повишена експресия на изследваната miRNA в плазма във всички от изследваните пациентни без един. Проведеният анализ на ROC кривите показва, че плазмените нива на miR-124 разграничават пациентите от здравите контроли с чувствителност 91.2% и специфичност 80% при AUC=0.879 (95%CI=0.740-1.00), $p=0.303 \times 10^{-3}$. Установихме, че нивата на miR-124 статистически значимо корелират с диагнозата (rs=0.551, $p=0.106 \times 10^{-3}$), ESR (rs=0.298, $p=0.0497$), CRP (rs=0.325, $p=0.047$), aCCP (rs=0.345, $p=0.025$), RF като цяло (rs=0.410, $p=0.007$), но също с неговите подкласове RFIgM (rs=0.430, $p=0.004$), RFIgG (rs=0.434, $p=0.004$), RFIgA (rs=0.425, $p=0.005$). Резултатите от текущото проучване показват, че експресионните нива на miR-124 в плазма могат да бъдат използвани като надежден неинвазивен диагностичен биомаркер. Необходимо е провеждане на валидиращо проучване, включващо по-голяма група от пациенти и контроли за потвърждаване на получените резултати.

Научни публикации и прояви:

- Shumnalieva R, Kachakova D, V Shoumnalieva-Ivanova, et al. Expression levels of miR-124 in the plasma of rheumatoid arthritis patients. EULAR Annual congress of Rheumatology, Amsterdam, 13-16 Jun, 2018

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 77/2016 Оценка на ефективността от вътреставно приложение на автоложна богата на тромбоцити плазма при пациенти с гонартроза

Изследователски екип: Проф. Румен Малинов Стоилов, дм

- Д-р Цветослав Георгиев
- Проф. Рашо Рашков, дмн
- Д-р Александър Копчев
- Д-р Росица Дачева

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Урвич 13, София, 1612

РЕЗУЛТАТИ: Пациентите, лекувани с PRP показват статистически значимо подобрене във всички използвани клинични показатели VAS ($p < .001$), HAQ-DI ($p < .001$), Lequesne ($p < .001$) и WOMAC ($p < .001$) спрямо техните начални стойности, измерени преди вътреставното инжектиране на PRP. При сравнението им с показателите на групата пациенти, лекувани с високомолекулна хиалуронова киселина, не се установява статистически значима разлика ($p > 0.05$). По-добро повлияване обаче се наблюдава при

сравнение на клиничните показатели при PRP групата и при пациентите лекувани с глюкозамин сулфат ($p < .001$), при които не се наблюдава сигнификантно подобрение на VAS, WOMAC, HAQ-DI, Lequesne на шестия месец ($p > 0.05$). Допълнителен анализ установи, че разликата в изследваните клинични показатели между прилаганото лечение с високомолекулна хиалуронова киселина от една страна и PRP не е сигнификантна. При подгрупов анализ се установи, че пациентите с рентгенографски данни за лека ГоА (KL I ст.) имат по-добро повлияване на индекса на Lequesne на шестия месец след приложението на PRP спрямо лекуваните с хиалуронова киселина ($p = .027$). При пациентите лекувани с високомолекулна хиалуронова киселина след третия месец ефектът се задържа във времето до шестия месец. При пациентите лекувани с PRP се наблюдава сигнификантно подобрение на VAS ($p=.001$), WOMAC ($p<.001$) и Lequesne ($p<.001$) през второто тримесечие от проследяването. Един пациент (1/16, 6,25%) в PRP групата съобщи за бързопреходни болка, оток и затопляне в областта на инжектираното коляно, които спонтанно отзвучаха в рамките на 24 часа след настъпването им.

Научни публикации и прояви:

- Георгиев Ц, Р Дачева, М Иванова, и др. Мястото на автоложната богата на тромбоцити плазма в лечението на гонартроза. Ревматология 2016;4:3-5
- Георгиев Т, М Иванова, Стоилов Р, и др. Лечение с перорален глюкозамин сулфат, интраартикуларна хиалуронова киселина и богата на тромбоцити плазма (PRP) – резултати от проспективно лонгитудинално проучване при пациенти с гонартроза. Националната конференция по ревматология, 12 – 14 май 2017, Ахелой

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 78/2016 Нарушения на съня при пациенти с остра сърдечна недостатъчност

Изследователски екип: Проф. Асен Рачев Гудев, дмн

- Д-р Петър Калайджиев

Базова организация: Катедра по спешна медицина, ул. Бяло море 8, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Проектът за оценка на нарушенията на съня при пациенти със сърдечна недостатъчност има за цел да открие степента на коморбидност при тези болни. Да бъдат отдиференцирани отделните форми на сънна апнея и да се състави стратегия за допълнителна терапия. Поради сложността на зададената тема, трудния подбор на пациенти и високо поставените цели, проектът все още се разработва. Предварителните резултати са недостатъчни, за да се изкаже прогноза и да се направят изводи. Проблемът изисква задълбочени научни изследвания и работа с широк кръг от специалисти в областта, което допълнително забавя работата на екипа. Разработва се обзор по зададената тема, както и публикация на резултатите след тяхната статистическа обработка. Бяха скринирани 58 пациента. От тях 42 пациента са със сърдечна недостатъчност. При 30 пациента се открива нарушение на съня. Резултатите до момента потвърждават данните от чужди проучвания в тази област. По-голяма степен се откриват обструктивна сънна апнея. Това дава възможност за лечение с механична вентилация към терапията за сърдечна недостатъчност. Подробен анализ на данните ще бъде изработен след приключване на проучването.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 79/2016 Оценка и проследяване на сърдечно-съдовия риск и ролята на аполипопротеин С3 при пациенти с хроничен панкреатит, първична и вторична панкреасна екзокринна недостатъчност

Изследователски екип: Проф. Борислав Георгиев Владимиров, дм

- Мила Ковачева-Славова, докторант
- Силви Митова-Симинкович, дм

Базова организация: Клиничен център по гастроентерология, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Панкреасните заболявания водят до развитието на панкреасна ендокринна и екзокринна недостатъчност (ПЕН). Пациентите са с повишен сърдечно-съдов риск (ССР). Целта на настоящето проучване бе да се изследва ССР и взаимовръзката му с ПЕН. ССР се оцени чрез скорови системи (SCORE, Framingham), разширен липиден профил, аполипопротеини А1, В, С3, CRP, скорост на пулсовата вълна (СПВ). Изследваха се преалбумин и ретинол-свързващ протеин (РСП) като маркери за протеинова абсорбция. Тежестта на структурните промени се определиха чрез Cambridge класификацията, а ендокринната функция-чрез глюкоза и HbA1c. Включени бяха 80 пациента с хроничен и остър панкреатит (ХП, ОП), панкреасни тумори/резекции, водещи до ПЕН. Средната им възраст бе $52,16 \pm 12,36$ г., 62,5% бяха мъже, водещ етиологичен фактор бе алкохолът. 46,25% бяха пушачи, 32,5% хипертоници и 30% диабетици. Всички приемаха панкреасна ензимна заместителна терапия (ПЕЗТ) спрямо степента на ПЕН. Оптимална ПЕЗТ установихме в 50% от изследваните. Дислипидемия с високи нива ТС ($5,67 \pm 2,49$ mmol/L), LDL ($3,51 \pm 2,10$ mmol/L), триглицериди ($1,70 \pm 1,25$ mmol/L) имаха 30% от пациентите, без корелация с ПЕН. Триглицеридите не бяха водещ фактор за ССР. Ниски нива HDL ($1,07 \pm 0,37$ mmol/L) имаха 53,57%, преобладаващо мъжете и тези с ОП. Повишен ССР спрямо non-HDL имаха 65%. Съотношението ТС/HDL се понижаваше с оптимизиране на терапията. Липидите и аполипопротеините А1, В, С3 корелираха пропорционално с малнутритивните показатели. За разлика от морфологичните промени, ПЕН корелираше с ТС, non-HDL, VLDL. Установихме значима взаимовръзка между Framingham и всеки липиден показател, apoB и apoB/apoA отношението, за разлика от SCORE. Висок риск за ОМИ спрямо ApoB/apoA демонстрирахме в 45,41%, значимо по-висок при мъжете, при панкреасен рак/резекция, възпаление. ApoC3 корелираше с ПЕН и тежестта на структурните промени, умерено взаимодействаше с атерогенните липиди, apoA, ApoB, слабо с HDL, $p < 0,05$. СПВ се повишаваше сигнификантно с прогресиране на функционалните и морфологични нарушения. С подобряване на малнутрицията чрез ПЕЗТ освен протеиновата се подобрява и мастната абсорбция. За прецизната оценка на ССР и правилното му профилактиране е уместно комплексното използване на Framingham системата, разширения липиден профил, аполипопротеини, СПВ.

Научни публикации и прояви:

- Kovacheva-Slavova M, S Siminkovitch, J Genov, et al. Apolipoproteins A-I, A-II, B, C-III as cardiovascular risk markers in patients with pancreatic disorders. Eur Pancreatic Club Jun 28-Jul 1, 2017, Budapest

- Ковачева-Славова М, С Митова-Симинкович, Й Генев, и др. Съвременен подход при проследяване на пациенти с панкреасна екзокринна недостатъчност и оптимизиране на панкреасната заместителна терапия, III Национален конгрес за млади гастроентеролози 24-26.03.2017, София

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 82/2016 Изследване на ниво на витамин Д [25(OH)D] при деца в училищна възраст през зимно-пролетния и лятно-есенния период

Изследователски екип: Доц. Елисавета Милкова Стефанова, дм

- Проф. Добрин Свиначков, дмн
- Ас. Красимира Казакова
- Ас. Десислава Йорданова
- Здравка Тодорова, докторант

Базова организация: Катедра по педиатрия, бул. Акад. Иван Гешов 11, София, 1606

РЕЗУЛТАТИ: Целта е установяване на витамин Д статуса на здрави деца в училищна възраст в периода на очаквано най-високо (м. септември – м. октомври) и най-ниско (м. март – м. април) ниво на витамин Д [25(OH)D] в серума и да се прецени необходимостта от прием на витамин Д препарат. Изследва се серумно ниво на 25(OH)D с метода на електро-хемилюминисценция (ECLIA). Участваха 116 ученика от 7 до 16 годишна възраст и се изследваха 138 проби. Като разпределение: лятно-есенен период – 102 деца (момчета - 49; момичета - 53) и зимно-пролетен – 36 (момчета - 16, момичета - 20). Оформихме по три групи за момчета и за момичета. Според нивото на 25(OH)D и зададените норми на реактива и през двата периода преобладават децата с достатъчно ниво. Единични са случаите, при които се установи дефицит на 25(OH)D – за първия период – 5, за зимно-пролетния – 2. През двата периода с най-голямо участие са учениците в предпубертетна възраст. Въпреки малкия брой на участвалите ученици в пубертетна възраст и през двата периода, при тях дефицита на 25(OH)D е по-изразен. Само 22 деца са участвали и във втория етап. От тях - с недостатъчно ниво са останали 2 деца, с дефицит – 1 дете и 1 дете е повишило нивото на 25(OH)D в границите на недостатъчност. Тези деца не са провеждали редовно назначената терапия. Получените резултати за ниво на витамин Д показват тенденцията в статуса на витамин Д при здрави деца в училищна възраст, разделени по пол, възраст и годишен период. Те са важни и за преценка на необходимостта от провеждане на лечение и профилактика. Изследването е възможно да е начало на проучване на оценка на витамин Д статуса при българските деца, на базата на което да се изработи програма за профилактика с витамин Д по възраст и годишен период.

Научни публикации и прояви:

- Йорданова Д, Стефанова Е, Казакова К и др. Профилактика, диагностика, терапия в детско-юношеската възраст Здравото дете – комплексна грижа „Арбилис“ 2018.
- Йорданова Д. Витамин Д ниво на българските деца в училищна възраст. Профилактика, диагностика и терапия в детско-юношеската възраст. Здравото дете – комплексна грижа. Несебър 19-22 април 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 83/2016 Некласически форми на 21-хидроксилазен дефицит: клинична и молекулярно-генетична диагноза

Изследователски екип: Проф. Ива Христова Стоева, дм

- Д-р Антоанета Костова - МЦ “Детско здраве”
- Проф. Мая Константинова, дмн
- Доц. Елисавета Стефанова, дм
- Доц. Радка Кънева, дб
- Радослава Саръева, дб
- Ганка Динева, дб - Американски колеж, София
- Даниела Пенчева, дб
- Калина Михова

Базова организация: Катедра по педиатрия, бул. Акад. Иван Гешов 11, София, 1606

РЕЗУЛТАТИ: За настоящото проучване са селектирани 16 пациенти с клинична диагноза неklasическа форма на вродена надбъбречнокорова хиперплазия (ВНХ) – 15 момичета и 1 момче на средна възраст. Клиничните симптоми при момичета са били хирзутизъм и/или менструални нарушения, а при момчето – ехографски регистрирана адренална хиперплазия. При ехография на малък таз са регистрирани поликистозни яйчници в 4 случая. Фамилна анамнеза за хирзутизъм, менструални нарушения или трудности при забременяване има при 2 от децата. Диагнозата е поставена на базата на повишени базални и/или стимулирани стойности на 17-ОН-Progesterone. Хормоналните изследвания са провеждани сутрин до 9 часа, съобразно циркадния ритъм на АСТН, в ранна фоликуларна фаза на менструалния цикъл, за да се избегнат фалшиво положителни резултати от секретирани от corpus luteum прогестини. Стойностите на тестостерона са изследвани при 11 пациенти, в нито един случай не е установен резултат над нормата. Стимулационен АСТН тест е бил проведен при петима пациенти; за клинично занчимо е прието нарастване на базалната стойност над 3 пъти. Седем от пациентите са на лечение с дългодействащи кортикостероиди. От пациентите след предварително информирано съгласие е взета ЕДТА кръв и е изолирана ДНК за молекулярно-генетичен анализ на CYP21A2. Поради технологични проблеми при разделянето на секвенциите на активния ген от псевдогена се наложи повторна оптимизация на секвенирането и резултатите от молекулярно –генетичния анализ ще бъдат представени по-късно. Изводи: 1. Налице е припокриване в клиничните симптоми между пациентки с поликистозно-овариален синдром и неklasическа ВНХ; 2. При пациентките с неklasическа ВНХ не се регистрират повишени стойности на тестостерона; 3. При подбора на кандидатите преобладават момчетата, следователно вероятно голяма част от неklasическите форми на ВНХ остават недиагностицирани сред момчетата.

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 84/2016 Генетични полиморфизми, свързани с невроендокринната дисфункция при синдром на поликистозните яйчници

Изследователски екип: Гл. ас. Ралица Николаева Робева, дм

- Проф. Филип Куманов, дмн
- Проф. Алексей Савов, дб
- Силвия Андонова-Бъклова

Базова организация: Клиничен център по ендокринология и геронтология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Синдромът на поликистозните яйчници (PCOS) е често заболяване при жени в репродуктивна възраст, което се характеризира с множество клинични прояви като хронична ановулация, инфертилитет, поликистозни яйчници и белези на хиперандрогения. Наследствеността играе важна роля за развитието на PCOS, но отговорните за нея гени са все още неизвестни. Невроендокринната дисрегулация е характерна за пациентките със синдрома, поради което вариациите в хипоталамо-хипофизната секреция и гонадотропиновите рецептори са важен таргет за бъдещи изследвания. Два единични нуклеотидни полиморфизма rs12470652 с.872A>G/p.Asn291Ser и rs2293275 с.935G>A/p.Ser312Asn в рецептора за лутеинизиращ хормон и човешки хорионгонадотропин (LHCGR), както и PROGINS полиморфизмът на прогестероновия рецептор бяха изследвани при пациентки с PCOS и здрави българки. Честотата на всички изследвани варианти беше в рамките на обичайната за Кавказката раса и не се различаваше между пациентките и контролите ($p>0.05$). Хетерозиготните LHCGR rs2293275 с.935G>A/p.Ser312Asn PCOS носители съобщаваха за инфертилитет значително по-често отколкото носителите на двата хомозиготни генотипа (40% vs. 12.5%, $p=0.022$). Същият полиморфизъм беше асоцииран с инсулиновите нива и липидния профил при пациентките със затлъстяване, както и с вероятен модулиращ ефект върху гонадотропиновото съотношение при жените с PCOS и наднормено тегло. Получените резултати показаха, че LHCGR rs2293275 с.935G>A/p.Ser312Asn полиморфизмът може да модулира клиничните и хормонални характеристики на жените с PCOS, които страдат същевременно от наднормено тегло и затлъстяване. Необходими са по-големи проучвания в различни етнически групи, които да установят конкретните генотипно-фенотипни асоциации в различни подгрупи пациентки с PCOS.

Научни публикации и прояви:

- Робева Р, Андонова С, Савов А. Генетични полиморфизми на прогестероновия рецептор при някои нарушения на женската репродуктивна система. Акушерство и Гинекология, 2017
- Robeva R, Andonova S, Tomova A, et al. LHCG receptor polymorphisms in PCOS patients. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2018;32(2):427-32.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 85/2016 Неинвазивна диагноза на неалкохолната стеатозна болест/ неалкохолен стеатозен хепатит при пациенти с въглехидратни нарушения

Изследователски екип: Доц. Радина Стефанова Иванова-Боянова, дмн

- Проф. Людмила Владимирова, дмн
- Проф. Асен Алексиев, дм
- Гл. ас. Мария Бояджиева-Владимирова, дм

- Гл. ас. Невена Чакърлова, дм
- Ас. Цветелина Маринова, дм
- Гл. ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Гл. ас. Грета Грозева-Дамянова, дм

Базова организация: Клиничен център по ендокринология и геронтология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: целта е да се изследват възможностите на неинвазивни сурогатни маркери за скрининг на неалкохолна стеатозна болест (НАСБ) и оценка на степента на риска за прогресивно чернодробно заболяване (напреднала фиброза) при пациенти с предиабет и захарен диабет (ЗД) тип 2 и се определи честотата им. Изследвани са пациенти с предиабет (n=30) и ЗД тип 2 (n=310), сравнени със ЗД тип 1 (n=94), НАСБ (n=403) и здрави лица (n=241). За скрининг на НАСБ бе използван индексът за чернодробна стеатоза (FLI), а за оценка на напреднала фиброза - APRI / APRI 1 (cut- off 1), FIB-4 и NFS, както и FibroMax (n=25). Честотата на НАСБ (FLI над 60) при ЗД тип 2 и предиабет бе съответно 81% и 85%, и 12% - при ЗД тип 1. Позитивната предсказваща стойност на FLI при ехографски потвърдена НАСБ бе 91%, а в случаите на НАСБ с новодиагностициран ЗД тип 2 – 98%. Напреднала фиброза и цироза се прогнозираха в 3% до 25% от пациентите с предиабет и ЗД тип 2 в зависимост от използвания метод и групата изследвани лица. Предсказващата негативна стойност на NFS и FIB-4 за напреднала фиброза и цироза бе по-добра от позитивната в сравнение с хистологично определения стадий на фиброзата. FibroMax тестът дава допълнителна информация за стеатозата, възпалението и клинично значима (F2) фиброза, съответно по-оптимална оценка на риска. Честотата на НАСБ и рискът от напреднала фиброза при предиабет и ЗД тип 2 са високи. При тези болни FLI може да бъде използван за скрининг на НАСБ. Фиброзните маркери NFS, FIB-4 и APRI / APRI1 могат да отхвърлят напреднала фиброза, но в по-малка степен да я предскажат. При нужда от допълнителна информация може да се изследва FibroMax.

Научни публикации и прояви:

- Бояджиева М. Неалкохолна стеатозна болест и захарен диабет тип 2. Наука Ендокринология, 2016;1:5-9.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 86/2016 Показатели за гликемичен контрол при бременни жени с гестационен захарен диабет и захарен диабет

Изследователски екип: Гл. ас. Невена Янкова Чакърлова, дм

- Ас. Мария Бояджиева-Владимирова, дм
- Ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Гл. ас. Грета Чакърлова, дм
- Доц. Илияна Борисова, дм

Базова организация: Клиничен център по ендокринология и геронтология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: По време на бременността стриктния гликемичен контрол е най-важният фактор за предпазване от перинатални усложнения. Добър гликемичен контрол не може да бъде постигнат без надеждни показатели за оценка на гликемията. Анализът на данните

от сравнението на изследваните групи ЗД, ГЗД и контроли показва, че жените с ГЗД са по-възрастни спрямо контролната група (32.2 ± 5.0 г срещу 30.7 ± 4.5 г, $p < 0,0001$), докато такава разлика не се наблюдава между групата със ЗД и контролната ($p > 0.78$); жените с ГЗД имат значимо по-висок ИТМ както преди бременността, така и по време на самата бременност спрямо жените със ЗД и контролната група. Съчетание на оптимална чувствителност (64,7%) и специфичност (62%) доказахме при прагова стойност на $HbA1c \geq 5.6\%$ за установяване на ГЗД. При тази стойност, обаче, в около 1/3 от случаите се получиха фалшиво негативни, а в друга 1/3 фалшиво позитивни резултати. Средната стойност на ГА бе значимо по-висока в групата със ЗД спрямо групата с ГЗД и контролната група. Такава значимост бе наблюдавана и при съпоставяне на групата с ГЗД спрямо тази на контролната група ($p < 0,0001$) по отношение на ГА. Стойността на ГА сред бременните жени със ЗД варираше между 110.2 до 680.5 $\mu\text{mol/L}$, а при жените с ГЗД варираше между 35.8 до 656.2 $\mu\text{mol/L}$. Оптимална чувствителност и специфичност се получава при прагова стойност 300 $\mu\text{mol/L}$, като по този начин ГА може да изключи ГЗД с чувствителност 58% и специфичност 59.1%. При тази стойност, обаче, сходно на $HbA1c$ се наблюдават голям брой фалшиво негативни и фалшиво позитивни резултати, поради което отново се налага провеждането на ОГТТ. И двата показателя имат своето място както за скрининг, така и за мониториране на бременността, но е необходима по-дълга продължителност за провеждане на проучването за оценка на рисковете за майката и плода при различните типове въглехидратни нарушения съпровождащи бременността.

Научни публикации и прояви:

- Бояджиева М. Показатели за гликемичен контрол по време на бременност. сп. Ендокринология, 2016;1:15-9
- Boyadzhieva M. Chapter 3. Evaluation of Glycemic control indexes during pregnancy. The role of HbA1c, glycated albumin and fructosamine. Nutrition and Diet in Maternal Diabetes. Springer International Publishing AO, 2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 87/2016 Връзка на сърдечно-съдова автономна дисфункция със сетивна полиневропатия, неензимно гликиране и някои кардио-метаболитни рискови фактори при предиабет (нарушена гликемия на гладно и нарушен глюкозен толеранс)

Изследователски екип: Гл.ас. Грета Ганчева Грозева-Дамянова, дм

- Гл.ас. Невена Чакърва, дм
- Ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Ас. Мария Бояджиева-Владимирова, дм
- Проф. Георги Георгиев, дм

Базова организация: Клиничен център по ендокринология и геронтология, 1431 София, ул. Здраве 2

РЕЗУЛТАТИ: Доказана сърдечно-съдова автономна невропатия се установи при 12.3% от участниците с НмГТ, 19.8% от участниците с предиабет (13.2% при НГГ и 20.6% при НГТ), и при 32.2% от участниците с НЗД тип 2. Честотата на доказана диабетна сетивна полиневропатия е 0% при НмГТ, 5.7% при предиабет, и 28.6% при НЗД тип 2. Установи се

тенденция към понижена симпатикова и парасимпатикова активност при покой и в хода на клиничните тестове – дълбоко дишане, проба Валсалва и изправяне от седнала позиция с влошаването на глюкозния толеранс. Същата тенденция се наблюдава и по отношение на електрофизиологичните параметри, характеризиращи функцията на н. суралис (амплитудата на акционния потенциал (SNAP), скоростта на провеждане (SNCV) и дисталната латенция). Посредством множествен регресионен анализ по stepwise метода се установи сигнификантна връзка между панелът от маркери – възраст, QTc интервал, обиколка на талия, диастолно артериално налягане, и плазмена глюкоза на 120-минута и симпатиковата активност ($F [5,451]=78.50, p<0.001$), определящи 46,5% от вариабилността ѝ; и между панелът от маркери – възраст, обиколка на талия, и QTc интервал и парасимпатиковия тонус ($F [3,453]=132.26, p<0.001$), определящи 46,7% от неговия вариабилитет. HbA1c и възрастта са свързани със SNAP на н. суралис ($F [2,454]=15.12, p<0.001$), като определят 23,6% от неговата вариабилност; и HbA1c и тъканното натрупване на AGEs са свързани с SNCV на н. суралис ($F [2,476]=12.18, p<0.001$) и определят 20,2% от вариабилитета му. Не се установиха отклонения в електрофизиологичните параметри на останалите изследвани соматични нервни влакна.

Научни публикации и прояви:

- Dimova R, Tankova T, Chakarova N, et al. Cardio-metabolic profile of subjects with early stages of glucose intolerance and cardiovascular autonomic dysfunction. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;126:115-21.
- Dimova R, Tankova T, Guerguelcheva V, et al. Risk factors for autonomic and somatic nerve dysfunction in different stages of glucose tolerance. *J Diabet Complications.* 2017;31(3):537-43.
- Dimova R, T Tankova, G Kirilov, et al. Insulin Resistance and Cardiovascular Autonomic Tone in Early Stages of Glucose Intolerance. The ADA's 77th Scientific Sessions, San Diego, California, Jun 9-13, 2017.
- Dimova R, T Tankova, N Chakarova, et al. Main predictors of cardiovascular autonomic dysfunction in early stages of glucose intolerance. 52nd EASD Annual meeting, Munich, Germany, 12-16 Sep 2016.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 88/2016 Честота и прогресия на автоимунните тироидни заболявания при пациентки с пролактином: сравнително проспективно проучване

Изследователски екип: Доц. Атанаска Петрова Еленкова, дм

- Доц. Илиана Атанасова, дм
- Проф. Георги Кирилов, дм
- Проф. Фани Мартинова, дмн
- Гл.ас. Йоанна Матророва, дм
- Гл.ас. Емил Начев
- Гл.ас. Владимир Василев, дм
- Гл.ас. Силвия Въндева, дм

Базова организация: УСБАЛЕ «Акад. Иван Пенчев», ул. Здраве 2; София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на проучването е да се направи оценка на честотата и прогресията на автоимунните год. 260 жени (154 пациенти/106 контроли), 144 (84 пациенти/60 контроли) бяха проследени с физикален преглед, ултразвуково изследване на щитовидната жлеза и лабораторни изследвания (измерване на серумните нива на антитела към тиреоглобулин, тиреопероксидаза и TSH-рецептор и нивата на TSH и FT4). АИТЗ бяха диагностицирани при 28.6% от пациентите и 15% от контролите ($p=0.056$). Хипотиреоидизъм беше установен при 13% ($n=11$) от пациентките спрямо 1.7% ($n=1$) от контролната група ($p=0.014$). Средната дневна доза Levothyroxine при нашите пациенти беше 61.36 mcg [25-150 mcg/d] и 25 mcg при единствената жена от контролната група на субституираща терапия. Хипертиреоидизъм не се установи при нито една от участничките. Пациентките с пролактином изглеждат са предразположени към автоимуен хипотиреоидизъм. Като възможен патогенетичен механизъм може да се обсъжда селективното имуномодулаторно действие на PRL предимно върху клетъчния автоимунитет, активирането на комплемента и антитяло-зависимата цитотоксичност, водещи до по-ранна и по-бърза прогресия на тиреоидита на Hashimoto към хипотироидно състояние при генетично предразположени индивиди. Базирайки се на нашите резултати, предлагаме рутинен скрининг за АИТЗ (хормонален, имунологичен анализ и ехография на щитовидната жлеза) при всички жени с пролактином при диагностицирането му. Препоръчваме и ежегодно изследване на серумните нива на TSH и anti-TPO при младите жени, както и месечен контрол на тироидната функция по време на бременност. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 91/2016 Патогенетична роля на регулаторните Т лимфоцити (Treg) при HIV+HCV+ коинфектирани пациенти

Изследователски екип: Проф. Татяна Петрова Пенкова-Червенякова, дмн

- Проф. Мария Николова, дм
- Ас. Нина Янчева-Петрова, дм
- Доц. Ивайло Еленков, дм
- Марина Александрова, докторант
- Д-р Антон Тимчев

Базова организация: Специализирана болница за активно лечение на инфекциозни и паразитни болести „Проф. Иван Киров”, бул. „Акад. Иван Гешов” 17, София 1606

РЕЗУЛТАТИ: Регулаторните CD4 Т лимфоцити с инхибираща функция (Treg) имат противоречив ефект при персистираща инфекция, тъй като ограничават имунното възпаление за сметка на ефикасния антиген-специфичен отговор. Над 25% от HIV-положителните лица у нас са коинфектирани с HCV, което променя клиничния ход на HIV-инфекцията и ефекта от антиретровирусната терапия (ART). Отражението на коинфекцията върху Treg не е изяснено. Ние изследваме ефекта на HCV върху диференциацията и инхибиращия потенциал на Treg и оттам – върху Т-клетъчния отговор и имунното възстановяване в хода на ART. Изследвани са 25 HIV+HCV+ и 25 HIV+ лица, преди и в хода на 12-месечна ART, в сравнение с HCV-моноинфектирани и здрави контроли. Посредством многопараметърна флоуцитометрия е направен подробен фенотипен анализ на ефекторните и регулаторни Т клетки в периферна кръв; функцията

им е оценена по неспецифично стимулираната секреция на цитокини (IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IL-10) в присъствие и след имуномагнитно деплетиране на Treg. HCV коинфекцията оказва значим негативен ефект върху имунното възстановяване (CD4AC и неговата промяна) на фона на потиснат HIV вирусен товар. И двете HIV+ групи се характеризират с ускорена диференциация на ефекторни CD4 и CD8 T на фона на увеличен дял Treg, като коинфекцията допълнително потиска секрецията на IL-2, IFN γ , IL-17 и значимо увеличава съотношението IL-6/IL-2, независимо от ART. HCV/HIV коинфекцията се отличава със стеснена пластичност на регулаторния пул и значително увеличена CD39+Treg субпопулация, с изразен супресорен ефект. Отстраняването на Treg има значим и благоприятен ефект в условията на ко-инфекция: води до превалиране на IL-2+ и IL-10+ клонове за сметка на провъзпалителни Th17 и би могло да ограничи чернодробната фиброза. Деплетирането на Treg при моноинфекция потенцира Th2 профил, поради напреднало изтощаване на Th1 ефекторите. Получените резултати подчертават необходимостта от едновременна антиретровирусна терапия на HIV и HCV инфекцията, дават насоки за по-рационален имунологичен мониторинг (CD39Treg, IL-6/IL-2), както и за разработване на имуно-базирани стратегии за функционално имунологично възстановяване.

Научни публикации и прояви:

- Александрова М, Емилова Р, Голкочева-Маркова Е, и др. Коинфекцията с HCV уврежда допълнително функцията на регулаторните T клетки при HIV-позитивни пациенти. IV национален симпозиум на Южнoбългарско дружество по инфекциозни болести, епидемиология и паразитология: 2016:54-61.
- Александрова М. Дисертация: Проучвания върху ефекторните и регулаторни механизми на клетъчния имунитет при HIV- позитивни пациенти, ко-инфектирани с хепатотропни вируси, 2017.
- Alexandrova M, Yancheva N, Elenkov I, et al. HCV co-infection stimulates differentiation of effector regulatory cells in HIV+ patients subjected to cART. Int Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID) 2016, Marseille, France, 25-27 May
- Александрова М, Емилова Р., Голкочева – Маркова, Е. и др. Коинфекцията с hcv уврежда допълнително функцията на регулаторните t клетки при HIV-позитивни пациенти. IV национален симпозиум екзотични инфекциозни и паразитни болести. HIV/AIDS и ко-инфекции. 3-5 юни 2016, Цигов чарк, стр. 20-21
- Александрова М, Тимчев А, Янчева Н и др. Коинфекцията с HCV като фактор, компрометиращ имунологичния отговор към С-ART. X-ти Национален конгрес по Инфекциозни болести на Българското Дружество по Инфекциозни Болести 6–8 октомври 2016 НДК, София, стр.41-2
- Александрова М, Р Грозданова, Е Голкочева-Маркова, и др. Th1/Th2/Th17 цитокинов профил при HIV/HCV коинфекция в хода на едногодишна комбинирана антиретровирусна терапия Юбилейна научна конференция „10 години Българска Асоциация по Клинична имунология” 28-29 октомври 2016, София,
- Александрова М, Емилова Р, Тимчев А и др. T регулаторните клетки засягат по различен начин ефекторните отговори при хронична HIV и HIV/HCV коинфекция. Пети национален симпозиум екзотични инфекциозни и паразитни болести. HIV/AIDS и ко-инфекции. 19 - 21 юни 2017, Цигов чарк, стр.30-31

- Yancheva N, Alexandrova M, Timchev A, et al Compromised T cell Response Regulation in HCV Co-Infected HIV+ Subjects. 13th Int Workshop on Co-infection HIV & Hepatitis. 21-23 June 2017, Lisbon, Portugal

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 92/2016 Роля на някои гени, свързани с овариалната функция, за преждевременното яйчниково стареене при жени

Изследователски екип: Проф. Алексей Славков Савов, дб

- Силвия Андонова-Бъклова
- Гл. Ас. Ралица Робева, дм
- Тихомир Тодоров, дб
- Мария Глушкова, докторант
- Доц. Албена Тодорова-Георгиева, дбн

Базова организация: Катедра по акушерство и гинекология, ул.Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на изследването е да се проучи ролята на някои гени, свързани с овариалната функция, като *FMR1* (fragile X mental retardation 1 gene) и *BMP15* (bone morphogenic protein 15) за преждевременното яйчниково стареене и несиндромните форми на преждевременна яйчничова недостатъчност. Бяха изследвани 20 болни с преждеременно овариално стареене и несиндромни форми на преждевременна овариална недостатъчност, както и контролна група от 20 здрави жени. В двете групи бяха изследвани CGGn полиморфизма в *FMR1* гена (чрез фрагментен анализ) и *BMP15* гена (чрез секвениране по Сангер). При сравнение на групите с преждеременно овариално стареене, преждевременна овариална недостатъчност и контролите се установи, че пациентките с преждеременно овариално стареене имат значимо по-високи стойности на броя CGG повтори в по-късия си *FMR1* алел (27.14 ± 0.38) в сравнение, както със здравите жени (24.30 ± 3.64), така и с пациентките с преждевременна овариална недостатъчност (24.46 ± 3.57) ($p=0.015$). При изследването на *BMP15* гена в групата на жените с нарушена яйчничова функция се установиха два генетични варианта с вероятен неблагоприятен ефект върху репродуктивната функция: с.538G>A/p.Ala180Thr (описван и при други жени с овариална дисфункция и разнообразен етнически и расов произход), както и с.269T>C/p.Phe90Thr (който е изключително рядък и с неизвестно клинично значение). Последният беше намерен при пациентка с интермитентна преждевременна овариална недостатъчност. Потвърди се хипотезата, че *FMR1* и *BMP15* гените имат отношение към овариалната дисфункция при някои пациентки в Българската популация. Ранното идентифициране на генетични варианти, които увеличават склонността към преждевременна овариална дисфункция би дало възможност за адекватна терапия на жени, които желаят да осъществят репродуктивните си планове в по-късна възраст.

Научни публикации и прояви:

- Робева Р, Андонова С, Глушкова М, и др. Съвременни генетични аспекти на преждевременната овариална недостатъчност. Акуш. Гинекол. 2017;56(3):32-38.
- Глушкова М и др. Молекулярно-генетични тестове за определяне на повишен риск от развитие на преждевременна яйчничова недостатъчност и поликистозни яйчници. Плевенски имунологични дни 2017, 28-30.04.2017

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 93/2016 Нови акценти в диагностичния алгоритъм, спектъра и честотата на вирусологичните агенти (парвовирус В19, аденовируси и *Chlamidia trachomatis*) ангажирани в развитието на патологична бременност

Изследователски екип: Проф. Борислав Маринов Маринов, дм

- Гл. ас. Стефка Иванова, НЦЗПБ
- Гл. ас. Светла Ангелова – НЦЗПБ
- Гл. ас. Петя Генова-Калу – НЦЗПБ
- Силвия Волева - Втора МБАЛ София

Базова организация: Катедра по Акушерство и гинекология, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: В хода на проекта бяха използвани различни методологични подходи с оглед на предоставяне на данни за циркулацията на посочените три инфекциозни агента (парвовирус В19, аденовируси и *Chlamidia trachomatis*) сред жени с патологична бременност в българската популация и обогатяването на диференциално-диагностичният алгоритъм на включените в тази връзка изследвания, с цел поставянето на ясна лабораторна диагноза при възникнали усложнения. Използвани бяха имуноензимни методи (Indirect ELISA), базирани на антиген-рекомбинантна техника, за доказване на специфични антитела от клас IgM и IgG за парвовирус В19, аденовирус и *Chlamydia trachomatis* с оглед доказване наличието на прясна или прекарана в миналото вирусна/хламидиална инфекция и ролята им при развитието на съответните усложнения. Използвани бяха молекулярно-биологични методи: колоно-базиран метод за екстракция на патогенна ДНК, съобразно изходния клиничен материал (серум) и амплификационен анализ (PCR тест) за доказване на вирусна ДНК (диагностичен маркер за прясна инфекция). За визуализация на получените резултати беше използван електрофоретичен анализ в 2% агарозен гел и етидиев бромит. Изследвани бяха общ брой 47 серумни проби, на бременни жени с патологична и рискова бременност, постъпили и диагностицирани в СБАЛАГ „Майчин дом”, София. Пациентките бяха разделени в четири групи: жени с анемия (n=22), неимунен хидропс феталис (n=8), фетален асцит (n=6) и жени претърпели спонтанен аборт (n =11). Сред всички изследвани проби прясна В19V инфекция (присъствие на серологичен В19V-IgM маркер и/или В19V-ДНК) беше доказана при 9/47 (19.15%), като при 7/47 (14.89%) беше отчетен положителен резултат по отношение на всички включени в проучването В19V диагностични маркери (В19V-IgM, В19V-IgG и В19V-ДНК). Най-висок беше дялът на В19V позитивните проби сред изследваните бременни с анемия (5/47, 10.63%). Защитеността по отношение на В19V (наличие на специфични IgG антитела) сред общият брой изследвани, беше изчислена на 40.43% (19/47). От друга страна при 19 от изследваните пациенти не беше доказана среща с В19V инфекциозният агент. Настояща *Ch. trachomatis* инфекция (комбинация от anti-*Ch. trachomatis* IgM и anti-*Ch. trachomatis* IgG маркери) беше доказана при 11/47 (23.4%) бременни пациентки. От друга страна прекарана в миналото инфекция от *Ch. trachomatis* (положителен anti-*Ch. trachomatis* IgG резултат) беше установена при 5/47 (10.64%) пациентки. При една от включените в изследването бременни бе доказано В19V и *Ch. trachomatis* коинфектиране, с положителен резултат на всички проведени имуноензимни и

молекулярни тестове. Сред всички изследвани проби прясна аденовирусна инфекция (присъствие на серологичен Adenovirus IgM маркер) беше доказана само при 1/47 (2.13%) в групата на пациентките с анемия. Наличие на аденовирус IgG серопревалиране беше установено при 38/47 (80.85%) от изследваните жени. Предвид разнообразната трансмисия на В19V, а именно трансплацентарният път на предаване, както и широкият спектър на усложнения възникващи в следствие на хламидиална и аденовирусна инфекция, скринирането за тези инфекциозни агенти на бременни и жени в детеродна възраст се явява важен подход при проследяване на бременността.

Научни публикации и прояви:

- Ivanova S, Genova-Kalou P, Voleva S, et al. Infectious Agents and Miscarriage in Bulgaria. Am Sci Res J Engineer Technol & Sci (ASRJETS) 2016;25(1):1-10.
- Волева С, Иванова С, Маринов Б. Парвовирус В19 и цитомегаловирус, асоциирани с патологична бременност. Medical Magazine, 38, 2017, 44-48.
- Ivanova S, Voleva S, B Marinov, et al. Algorithm for investigation of pregnant women exposed to the viruses that cause non-vesicular (maculopapular) rash. Proceedings of the Seven Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 2016,
- Волева С, Ангелова С, Иванова С, и др. Инфекциозни агенти (парвовирус В19, рубеола, аденовируси, Chlamydia trachomatis) ангажирани в патогенезата на спонтанен аборт, X-ти Национален конгрес по Инфекциозни болести. 06 – 08 октомври 2016, НДК, София.
- Волева С, Иванова С, Манолов В, и др. Анемични състояния при бременни жени, асоциирани с парвовирус В19 инфекция, XX национална гинекологична конференция, 16-18.03.2017, Боровец
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Parvovirus b19 as a causative pathogene in a pathological pregnancy during the 2015-2016 year in Bulgaria. XVI Int Congress for Medical Sciences (ICMS) 2017, 11-14 May 2017
- Волева С, Крумова С, Ангелова С, и др. Серопревалентност на инфекциозните агенти (парвовирус В19 и Chlamydia trachomatis) при жени с патологична и рискована бременност, XV Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на българска асоциация на микробиолозите, Парк-хотел Москва, София - 17-19 Май 2017

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 94/2016 Честота на постпункционно главоболие при пациенти след спинална анестезия за цезарово сечение – рандомизирано проучване, сравняващо спинални игли с тип Quincke, Sprotte и Atraucan дизайн на върха

Изследователски екип: Проф. Силви Любчов Георгиев, дм

- Д-р Румяна Батова

Базова организация: Катедра по анестезиология и интензивно лечение, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Проведено е проспективно рандомизирано проучване, включващо 449 последователно извършени спинални анестезии за цезарово сечение в рамките на 1 година. Изследвано е влиянието на дизайна на върха на спиналната игла върху честотата и

тежестта на постпункционното главоболие при родилките. Добре известно е, че родилките са рискова група за развитие на ППГ. Пациентките са разпределени на случаен принцип в три групи, където спиналната анестезия е извършена съответно със Sprotte 25G, Atraucan 26G и с Quincke 25G спинални игли. Анализът на честотата на ППГ, базиран на данните от 394 пациентки показва относителен дял на ППГ 0% (n=133) в група Sprotte, 2,3% (n=131) в група Atraucan и 7,7% (n=130) в група Quincke. Установява се, че спиналните игли с атравматичен пенсил пойнт връх тип Sprotte и тези със смесен атравматичен/режещ връх тип Atraucan са свързани със сигнификантно по-ниска честота (p=0,009) на ППГ от режещите игли тип Quincke.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 95/2016 Създаване на скринингов модел за късна прееклампсия чрез изследване на биохимични и биофизикални маркери в 30 – 33 г.с.

Изследователски екип: Доц. Живка Цочева Карагьозва, дм

- Ибрям Ибрям, докторант
- Проф. Стоимен Иванов дмн
- Проф. Алексей Савов дб

Базова организация: Катедра по акушерство и гинекология, 1431 София, ул.Здраве 2

РЕЗУЛТАТИ: Прееклампсията засяга 2-3 % от всички бременности и е една от водещите причини в световен мащаб за майчина и перинатална заболеваемост и смъртност. Целта на настоящето проучване беше създаването на скринингов модел за късна прееклампсия, който да доведе до своевременното откриване на пациентките с висок риск от развитие на прееклампсия при ниска фалшиво положителна честота на метода. За целта бяха изследвани 20 бременни с висок риск от развитие на прееклампсия: новопоявила се хипертония или протеинурия, УЗ данни за промени в кръвотока на маточните артерии. Изключващи критерии: изявена прееклампсия, еклампсия и HELLP синдром. На всички пациентки включени в изследването беше предоставено информирано съгласие и попълване на анамнестични данни. На всяка пациентка беше измервано двукратно артериално налягане на двете ръце, пулсативен индекс на двете маточни артерии, ръст и тегло. За изчисляването на риска основан на анамнестични и биофизикални данни беше използван софтуер на Фондацията по фетална медицина- Лондон. Изследвани бяха серумни нива на разтворима тирозин киназа-1 (sFlt-t) и плацентарен растежен фактор (PLGF), с реактиви на фирма Roche. Бяха изчислени съотношението между двата протеина sFlt-t/ PLGF като за гранично съотношение изключващо диагнозата прееклампсия беше установено 38. След получаването на всички данни се изчисли средното време за развитие на прееклампсия и нуждата от родоразрешение поради фетално страдание. Резултати: класическите диагностични критерии, АН над 140/90 mmHg и протеинурия над 300 мг/24 час, използвани за поставянето на диагнозата прееклампсия не са надежден маркер за поставянето на диагнозата. Тяхната употреба в клиничната практика установява 71% от случаите с прееклампсия, при 10% фалшиво положителни резултати. Добавянето към горепосочените критерии на възраст, паритет, тегло и пулсативен индекс на маточните артерии повишава чувствителността на диагнозата до 80%, при 5% фалшиво положителни резултати. С най-добра прогностична стойност е използването в клиничната практика на

всички изброени анамнестични и биофизикални маркери, както и съотношението sFlt-t/PLGF, което повишава чувствителността на диагнозата до 98%, при 5% фалшиво положителни резултати. Средното време от провеждането на изследването до развитие на преекламписия е 2 седмици. Въз основа на получените резултати създадохме протокол за клиничната практика, който да селектира пациентките подлежащи на по-стриктно наблюдение, както и да селектира тези, които нямат нужда от хоспитализация.

Научни публикации и прояви:

- Ибрям И, Карагъзова Ж, Савов А и др. Скрининг за късна преекламписия, сп. Акушерство и гинекология, 2006;2:31-6
- Ибрям И, Карагъзова Ж, Савов А и др. Скрининг за късна преекламписия, XXXV Национална акушерска конференция 2016, кк Елените, 16 – 18.06.2016, Страница 6
- Ибрям И. Скрининг за късна преекламписия, XIV Национален конгрес по акушерство и гинекология 2017, Пловдив, 26 - 29.10.2017, Стр. 26

Научният отчет е приет с **НЕЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „ГРАНТ’ 2017”

Договор Д-54/02.05.2017 Проучване ролята на хепсидин в патогенезата на атеросклерозата

Изследователски екип: Чл.-кор. Проф. Лъчезар Динчов Трайков, дмн

- Гл. ас. Виктор Манолов, дм
- Проф. Юлия Петрова, дн
- Гл. ас. Мария Петрова, дм
- Тодор Кунчев, докторант
- Проф. Камен Цачев, дн
- Гл. ас. Явор Желев, дм
- Петър Желязков, студент

Базова организация: МУ – София, МФ, Катедра по неврология; УМБАЛ „Александровска”, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В хода на проекта са използвани различни методологични подходи за диагностика на атеросклеротични изменения на а.carotis, оценка на когнитивната функция на мозъка, както и определяне статуса на желязо при изследваните пациенти. Чрез имунологичен ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) метод с осъществяване на специфичен комплекс антиген-антитяло, отчитан спектрофотометрично се определи количествено серумен хепсидин в серум при контролна група и пациенти с атеросклеротични изменения на а.carotis. Чрез турбидиметричен метод се изследва С-реактивен протеин за установяване на възпаление, трансферин и разтворими трансферинови рецептори – за оценка на степента на нарушена обмяна на желязо, серумен феритин – за оценка нивото на натрупване на желязо в депата при контролна група и пациенти с атеросклеротични изменения на а.carotis. Като маркер за оценка на риска от развитие на атеросклеротично заболяване се използва имунологичен CLIA (chemiluminescent immunoassay) метод за определяне на серумните нива на хомоцистеин и количествено се изследваха показатели на липидната обмяна чрез колориметрични методи. Подбрана е група от 80 пациента, диагностицирани с атеросклеротични изменения на а.carotis от специалист – невролог в УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по неврология, с нарушена когнитивна функция на мозъка и с наличие на промени в желязния статус, установено чрез изследване на показателите общ брой еритроцити, цитометрични показатели – MCV, MCH, MCHC, хемоглобин, С-реактивен протеин, серумно желязо и ТЖСК, серумен трансферин, феритин и разтворими трансферинови рецептори извън съответните нормални граници за пол и възраст. Получените резултати са обработени чрез съответните статистически методи за определяне на значимост. Включените пациенти с атеросклеротични изменения на а.carotis са на средна възраст 62.0 ± 6.8 г. Установи се статистически значимо повишено ниво на серумен хепсидин при пациенти с атеросклеротични изменения на а.carotis (56.7 ± 8.3 $\mu\text{g/l}$ – общо за двата пола и двете възрастови групи) спрямо контролната група (20.9 ± 3.0 $\mu\text{g/l}$), $P < 0.001$. Серумните нива на хомоцистеин (27.1 ± 6.1 $\mu\text{mol/l}$) и LDL-холестерол (2.5 ± 0.4 mmol/l) са статистически значимо повишени спрямо контролната група (2.0 ± 0.3 $\mu\text{mol/l}$) и (1.1 ± 0.2 mmol/l), респ. при пациенти с атеросклеротични изменения на а.carotis;

$P < 0.001$. Концентрацията на феритин при пациенти с атеросклеротични изменения на а.сarotis (271.9 ± 48.4 ng/ml) е повишена спрямо включената контролна група (122.8 ± 20.4 ng/ml), което показва натрупване на желязо в организма, $P < 0.001$. Концентрациите на трансферин (3.1 ± 0.2 g/l) са повишени спрямо включената контролна група (2.4 ± 0.2 g/l) при пациенти с атеросклеротични изменения на а.сarotis; $P < 0.001$. Патологично повишени са показателите ИМТ (1.11 ± 0.14) и АВІ (1.62 ± 0.13) при пациенти с атеросклеротични изменения на а.сarotis спрямо контролната група ИМТ (0.38 ± 0.11) и АВІ (1.18 ± 0.08), $P < 0.001$. При пациенти с атеросклеротични изменения на а.сarotis се установи: значителна положителна корелация между серумен хепсидин и хомоцистеин ($r=0.813$; $P < 0.001$). Зависимостта между серумен хепсидин и феритин ($r=0.756$; $P < 0.001$) е положителна. Изследваният серумен хепсидин корелира значително положително с показателите ИМТ ($r=0.882$; $P < 0.001$) и АВІ ($r=0.824$; $P < 0.001$) при пациенти с атеросклеротични изменения на а.сarotis. Установи се статистически значимо повишение на серумните нива на хепсидин при пациенти с атеросклеротични изменения на а.сarotis, което обуславя свръхнатрупването на желязо в стената на а. сarotis. Установи се нарастване на серумните нива на хепсидин, хомоцистеин, феритин и LDL-холестерол при пациенти над 65 г.в. спрямо тези под 65 г.в., като нивото на значимост е $P < 0.01$. Показателите за атеросклеротични изменения на а. сarotis ИМТ и АВІ също показаха нарастване при пациентите след 65 г.в., $P < 0.01$. Медиираният оксидативен стрес от желязото допълнително предизвиква развитие на атеросклеротични изменения. Определянето на серумен хепсидин е все още новост в клинично-лабораторната практика. Резултатите, получени от настоящето проучване, допринасят за изясняване ролята на хепсидина в патогенезата на атеросклеротичните изменения, настъпващи в кръвоносните съдове, като по този начин биха могли да подпомогнат диагностичното уточняване и изборът на подходящ терапевтичен подход при лечението на това състояние. Установи се връзката между хепсидина и серумните концентрации на хомоцистеин, както и показателите на желязния статус. Принос с теоретична насоченост е допринасяне за изясняване ролята на хепсидина и регулираната от него обмяна на желязото в патогенезата на атеросклерозата, което подобрява оценката на риска от това заболяване. Принос с практическа насоченост е въвеждането на количественото определяне на хепсидин в серум като маркер за ранна диагностика на нарушената обмяна на желязото, микроелемент участващ в патогенезата на атеросклеротичните изменения на кръвоносните съдове.

Научни публикации и прояви:

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin quantification in atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis* 2017;43(suppl 1):I-II:52.
- Manolov V, Petrova J, Vasilev V, et al. Role of hepcidin in the pathogenesis of atherosclerosis. *Med Rev* 2017;53(3):16-23.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Evaluation of iron homeostasis in patients with atherosclerosis. 3rd Eur Stroke Organization Conference. 16-18.05.2017, Prague, Czech republic
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin quantification in atherosclerosis. 26 Eur Stroke Conference. 24-26.05.2017, Berlin, Germany
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Quantification of serum hepcidin in patients with atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55,S1483 – S1505.

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Quantification of serum hepcidin in patients with atherosclerosis. 23 Int Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC World Lab 2017). 22-25.10.2017, Durban, South Africa

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-60/02.05.2017 Използване на молекулярно диагностични техники за доказване на херпесни вируси (HSV-1, HSV-2 и VZV) при суспектни за херпесни инфекции пациенти, както и такива с усложнения или неясна клинична картина

Изследователски екип: Доц. Весела Васкова Райкова, дмн

- Ас. Николай Кълвачев
- Ас. Радослав Байкушев
- Чл.-кор. Проф. Иван Митов, дмн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Медицинска микробиология, ул. Здраве 2, 1431 София

РЕЗУЛТАТИ: Херпесните вируси се характеризират с развитието на латентни инфекции, персистиращо носителство, периодични рецидиви. Бързата и точна лабораторна диагностика, разграничаваща ги вътре в самото семейство, както и от инфекции с други агенти, е от решаващо значение при случаи с неясни клинични прояви, при инфекции, засягащи ЦНС, при имунокомпрометирани и трансплантирани пациенти, както и такива с множествени патологии. Цел на настоящия проект бе въвеждането на In-home Real-time PCR амплификационни програми за доказването/отхвърлянето на HSV-1, HSV-2 и VZV инфекции, сравняването им с търговски китове и приложението им при пациенти с усложнения или неясни клинични прояви. Бяха тествани 23 деца, 5 мъже, 16 жени, като от тях 3 бременни, с различни работни диагнози. Бе направена ДНК екстракция на материалите, които в последствие бяха подложени на PCR системи за детекция. Бяха разработени и оптимизирани 3 различни In-home амплификационни програми с помощта на TaqMan real-time. Нововъведените In-home Real-time PCR методики за доказване на HSV-1, HSV-2 и VZV и търговските китове за откриване на същите вируси дадоха идентични резултати. При 14 деца, 3 мъже, 9 жени, 2 от които бременни, бе доказана HSV-1, HSV-2 или съответно VZV инфекция. В заключение, бързото откриване на HSV-1, HSV-2 и VZV чрез real-time PCR е подходящ метод за доказване на херпес вирусни инфекции в съвременната микробиологична лаборатория. Тестуването чрез нововъведените In-home амплификационни системи за доказване на HSV-1, HSV-2 и VZV помогна да бъдат уточнени съмнителни пациенти за херпесвирусни заболявания и започната подходяща терапия. Чувствителността, специфичността и резултатите от тези системи напълно корелира с получените резултати от търговските китове и спокойно могат да бъдат използвани въведени и прилагани в рутинната практика.

Научни публикации и прояви:

- Райкова В. Нетипичен клиничен случай на зостер при двегодишно дете. Здраве и наука 2017;4(028):30-2.
- Райкова В, Лозанова П. Предизвикателствата на Varicella Zoster Virus инфекция по време на бременност. Пролетни Варненски дерматологични дни, 12-15.04.2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-96/02.05.2017 Оценка на зъбното покритие от горната устна при покой и усмивка

Изследователски екип: Проф. Лаура Стефанова Андреева-Гургуриева, дмн

- Доц. Владимир Петрунов, дм
- Гл. ас. Мартин Мариянов
- Д-р Нели Дилкова

Базова организация: МУ – София, Факултет по Дентална Медицина, Катедра Ортодонтия, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Добрата фотодокументация е неразделна част от пълната ортодонтска диагностика. До сега не беше създаден протокол с точни параметри за изготвянето на специфичните за ортодонтията фотоснимки. Освен това не бяха изследвани съотношенията централни резци/горна устна при покой и усмивка при различните видове скелетни ортодонтски деформации. Създаване на метод за оценка на покритието на горните инцизиви от горната устна в състояние на покой и усмивка. С помощта на студийно оборудванв беше разработен протокол с най-подходящите параметри за изготвяне на максимално добра ортодонтска фотоснимка. Подбрани бяха 90 пациента от трите скелетни класа ортодонтски деформации, отговарящи на точно определени критерии за избор на пациенти. Изследвани бяха техните фотоснимки във фас при покой и усмивка, за да се установи степента на покритие на горните резци от горната устна в двете състояния. Установи се степента на покритие на горните резци от горната устна при различните класове скелетни деформации – I, II и III, както и според различните видове съпътстващи ортодонтски деформации. Установи се връзката между степента на покритието на резците и наличието на различен тип вреден навик или неправилна функция. Създаден е протокол за изготвяне на ортодонтска фотодокументация. Направен е протокол за установяване на покритието на горните резци от горната устна при различни скелетни деформации. Също така се установи какви са отклоненията при съпътстващи деформации. Установи се какво е покритието на горните резци от горната устна при наличие на вреден навик и/или неправилна функция. Протоколите на изготвянето на фотодокументация за целите на ортодонтията и протокол за анализ на фотоснимка при покой и усмивка при различните видове скелетни ортодонтски деформации са популяризирани с чрез специализирано научно списание.

Научни публикации и прояви:

- Мариянов М, Дилкова Н, Петрунов В, и др. Фотодокументация в ортодонтската практика – екстраорални снимки, сп. Ортодонтски преглед 2017;2:11-20
- Мариянов М, Дилкова Н, Петрунов В, и др. Фотодокументация в ортодонтската практика – интраорални снимки, сп. Ортодонтски преглед, кн. 1/2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-98/02.05.2017 Изследване на HLA-асоциирани генетични фактори и кодираните от тях молекули при пациенти със спиноцелуларен карцином на устната лигавица

Изследователски екип: Доц. Димитър Тодоров Йовчев, дм

- Доц. Елица Деливерска-Александрова, дм
- Проф. Милена Шиварова, дм
- Проф. Радомир Угринов, дмн
- Ас. Христо Стоянов, дм
- Ас. Лъчезар Петков
- Велизар Шиваров, дм - УМБАЛ Софиямед
- Бушра Ал Хадра, докторант
- Цветелин Луканов, дб

Базова организация: МУ-София, ФДМ, Катедра “Образна и Орална диагностика”, бул. Св. Геофги Сифийски” 1, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Свързаната с главния комплекс на тъканната съвместимост клас I верига A е лиганд за рецептора NKG2D. Редица проучвания показват, че експресията на MICA и серумните нива на sMICA се повишават при тумори от епителен произход, като това има важна роля за имунологичния надзор. Допълнително е установена асоциация между различни MICA алели и заболявания, свързани с НК активността. Целта на проекта е да се проучи ролята на MICA алелния полиморфизъм определен чрез ДНК секвенционен метод и корелацията му с нивото на секреторни MICA молекули като потенциален биомаркер при пациенти с орален спиноцелуларен карцином. Изследвани са 69 пациента с хистологично доказан орален спиноцелуларен карцином. Контролната група включва здрави индивиди от българската популация. MICA генотипизирането е извършено чрез въведен в рамките на настоящия проект ДНК секвенционен метод с висока разграничителна способност. Чрез ELISA метод (MICA Human ELISA Kit (Invitrogen)) са анализирани серумните нива на sMICA. Получените резултати показват статистически значима предразполагаща асоциация за MICA*008 алела ($P < 0.05$, OR-2,73), кодиращ протеин със скъсена дължина. Въпреки по-високата средна стойност на sMICA при пациентите (73,8 pg/ml) в сравнение с контролната група (47,2 pg/ml) статистически значима корелация не беше установена. Нашите резултати показаха статистически сигнификантна корелация между алелите, кодиращи скъсени протеини и съответните генотипи и повишените серумни нива на sMICA. Въпреки че, поради сравнително малкия брой изследвани пациенти резултатите от проучването могат да се разглеждат като предварителни, те подкрепят модела, според който алели, кодиращи скъсени и разтворими MICA молекули функционират като негативни регулатори на NKG2D върху NK и CD8+ T клетките. Това от своя страна води до аберантен имунологичен надзор.

Научни публикации и прояви:

- Ал Хадра Б, М Иванова-Шиварова, Е Деливерска, и др. MICA – характеристика и роля при спиноцелуларния карцином в устната кухина. *Здраве и наука*, 2017;2:2-6.
- Al Hadra B, E Deliverska, H Stoianov, et al. Investigation of HLA genes, HLA molecules and other factors in patients with oral squamous cell carcinoma. *J of IMAB*, 2018,24(3):2133–41

- Al Hadra B, Deliverska E, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. 31st EFI & 25th DGI Joint Meeting, 30.05-03.06.2017, Mannheim/Heidelberg
- Al Hadra B, Deliverska E, Stoianov H, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. First young scientists seminar on genetics. 24 Nov 2017, Sofia.
- Al Hadra B, Ali S, Deliverska E, et al. Mica associations with oral squamous cell carcinoma. ICMS Int Congress, 10-13 May 2018, Sofia, Bulgaria
- Al Hadra B, T Lukanov, E Deliverska, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. V National congress of immunology. 25-28 Oct 2018, Plovdiv

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-99/02.05.2017 Ефективност на пародонтална пластична микрохирургия за лечение на коренова сензитивност (root dentine sensitivity)

Изследователски екип: Доц. Елица Георгиева Деливерска-Александрова, дм

- Ас. Денислав Емилов

Базова организация: МУ-София, Факултет по Дентална медицина, Катедра по Орална и лицево-челюстна хирургия, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Микрохирургията има значителен напредък в пародонталната хирургия в последните години и е най-често свързана с пластично-естетична пародонтална хирургия. Целта на настоящото проучване е да оцени ефективността на кореновото покритие посредством микрохирургични техники (пародонтална пластична микрохирургия) в редуцията на RDS при Miller Class I и Miller Class II гингивални рецесии. Селектирани са 30 пациента с Miller Class I и Miller Class II гингивални рецесии с наличие на RDS. Липсват възстановявания и дефекти по кореновата повърхност. Половината от селектираните по приетите критерии пациенти са третирани с пародонтална пластична микрохирургия (субепителиална съединително-тъканна присадка и коронарно позиционирано ламбо). RDS е оценена преди микрохирургията, и 2 месеца след оперативната интервенция. Контролната група включва 15 селектирани пациенти по същите критерии и оплаквания и при тях беше приложен конвенционален анти-сензитивен агент-гел (Sensigel). Резултатите показват статистическа значимост в полза на микрохирургичното лечение по отношение на третиране на пациенти с гингивална рецесия и наличие на силна коренова сензитивност ($P=0.043$). Въпреки че, поради сравнително малкия брой изследвани пациенти резултатите от проучването могат да се разглеждат като предварителни, те подкрепят литературните данни, че пародонталната пластична микрохирургия може да бъде възприета като минимално инвазивен метод за лечение на RDS при Miller Class I и Miller Class II гингивални рецесии.

Научни публикации и прояви:

- Emilov D, Deliverska E. Surgical treatment of gingival recession with soft tissue graft procedure. *J of IMAV*, 2018;24 (3):2149-59
- Емилов Д, Деливерска Е. Пародонтална пластична хирургия за лечение на гингивални рецесии – част I. Списание “Здраве и наука” 2017;3(027):4-10.
- Емилов Д, Деливерска Е. Пародонтална пластична хирургия за лечение на гингивални рецесии – част II. Списание “Здраве и наука”, 2018;1(029):11–19.

- Deliverska E, Emilov D, Al-nasrawi D. Gingival augmentation in a patient with insufficient attached gingiva – a case report. ICMS-10-13 May 2018
- Emilov D, Deliverska E. Treatment of gingival recession with hypersensitivity using free soft-tissue graft procedures. ИМАВ- 13-16 May 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-100/02.05.2017 Ефективност на фотодинамичната терапия в сравнение с хлорхексидинов чип (Periochip®) в третирането на пародонталния джоб

Изследователски екип: Проф. Христина Лазарова Попова, дм

- Доц. Камен Коцилков, дм
- Д-р Диана Янева

Базова организация: МУ-София, Факултет по Дентална медицина, Катедра Пародонтология, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящата научна разработка е да се сравни клиничната и микробиологична ефективност на два различни локални антимикуробни агента, приложени след инициалната механична терапия на дълбоки пародонтални джобове – Periochip и фотодинамична терапия и да се оцени какво е тяхното влияние върху ранната реколонизация на джоба. Пациентите, участващи в проекта, бяха разделени на две групи от по 10 души, като всеки от тях имаше поне един пародонтален джоб ≥ 7 мм и ≤ 10 мм в два различни квадранта. Единият джоб на всеки пациент бе третиран с допълнителен антимикуробен агент, а другият беше контролен. Всички пациенти получиха пълна пародонтална (клинична и микробиологична) диагностика и им бе проведена нехирургична пародонтална терапия. Анализът на клиничните резултати показва, че не се демонстрират различия в параметрите дълбочина на сондиране и загуба на клиничен аташман при допълнителната употреба на изследваните антимикуробни средства при ранно отчитане на резултата. Тя обаче се асоциира с по-добри микробиологични резултати, отколкото нехирургичната терапия, приложена самостоятелно. Сравняването на двата вида допълнителна антимикуробна терапия показва по-голяма редукция на дълбочината на сондиране при групата с перичип (средно 1,9 мм), отколкото при групата с фотодинамична терапия (средно 0,7 мм). Двете групи показват идентична разлика в печалбата на клиничен аташман, съответно средни стойности 0,2 мм и 0,3 мм. Микробиологичните резултати сочат, че групата с хлорхексидинов чип показва редукция на силно патогенните представители на червения комплекс (*P.g.*, *T.d.*), докато групата с фотодинамична терапия демонстрира редукция на умерено патогенния представител на зеления комплекс *C.g.* Получените резултати допринасят за по-доброто разбиране на микробиологията на тежкия пародонтит, както и на ефектите от допълнителната топикална антимикуробна терапия, следователно имат теоретична значимост за диагнозата и терапията на пародонтита. Показаните резултати при ограничен брой пациенти, поради ограниченото финансиране показват, че са необходими допълнителни проучвания върху по-голям брой пациенти за по-дълъг период на проследяване за по-категорични изводи относно допълнителната антимикуробна терапия на джоба при пародонтит.

Научни публикации и прояви:

- Янева Д, Попова Х, Коцилков К. Допълнително антиминобно третиране на пародонталния джоб. Проблеми на денталната медицина. 2018 том 44, кн.1 Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-101/02.05.2017 Присъствие на IL-8 генен полиморфизъм и серумни нива на IL-8 при пациенти с хроничен пародонтит

Изследователски екип: Доц. Антоанета Митева Млъчкова, дм

- Проф. Христина Попова, дм
- Ас. Величка Досева-Панова, дм
- Ас. Денислав Емилов
- Мая Кичева, дб

Базова организация: МУ-София, Факултет по Дентална Медицина, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящото изследване е да се проучи присъствието на генен полиморфизъм за IL-8 и серумните нива на IL-8 при пациенти с хроничен пародонтит. Резултатите получени в това проучване, са обработени статистически и са представени в табличен и графичен вид. В изследването взеха участие 35 пациента (24 жени и 11 мъже) с диагноза умерен до тежък генерализиран хроничен пародонтит, отговарящи на критериите за включване в проучването. Изследвани са основни параметри на пародонтита PD, CAL и костна загуба. Изследвано е количеството на IL-8 в серума на пациентите чрез ELISA тест (enzyme-linked immunosorbent assay). Извършен беше PCR RFLP ДНК анализ за определяне на IL-8 полиморфизъм в места: rs4073 (-251A/T) и rs2227307 (-396T/G). При проведеният анализ в настоящото изследване беше установена сигнификантна (статистически значима) корелация между: HI и PBI – тежест и висока между HI и BOP; установи се значима корелация между PBI – тежест и PD - средна стойност и bone loss; висока корелация между BOP и bone loss; значима корелация между PD 5 -7mm и PD \geq 7mm и CAL средна стойност, както и висока корелация между параметъра PD \geq 7mm и bone loss. Резултатите от генотипното разпределение показват 6 преобладаващи генотипа при определяне на IL-8 полиморфизъм за rs4073 (-251A/T) и rs2227307 (-396T/G): GT/AT; TT/TT; TT/AT; GG/AA; GG/TT и TT/AA. Най-голям е процента на пациентите с генотип GT/ AT – 65.71 %, и на пациентите с генотип TT/TT - 22.86%. Резултати от изследвани взаимовръзки показват, че най-голяма обвързаност се наблюдава между присъствието на генотип GT/AT и TT/TT и процентното разпространение на PD 5-7 mm и PD \geq 7 mm ($p < 0.09$). Установява се също, че разпространението на кървенето при сондиране е по-голямо при пациентите от мъжки пол ($p < 0.04$). По- голямо процентното разпространение на плитките джобове PD < 3mm при пациентите от женски пол ($p < 0.04$). По-голямо процентното разпространение на дълбоките джобове PD > 7 mm при пациентите от мъжки пол ($p < 0.02$). В проведеното от нас изследване за значимостта на присъствие на IL-8 генен полиморфизъм и наличие на серумни нива на IL-8 при пациенти с хроничен пародонтит не се установи достоверна корелация /взаимовръзка с тежестта на пародонтита.

Научни публикации и прояви:

- Mlachkova A, Dosseva - Panova V, Popova C. Presence of IL- 8 gene polymorphism and IL- 8 serum levels in patients with chronic periodontitis- literature review. Folia Medica 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-102/02.05.2017 Сравнително ин витро изследване степента на отстраняване на замърсяващия слой, степента на деконтаминация и възможността за създаване на ендодонтски моноблок при два различни иригационни протокола

Изследователски екип: Проф. Радосвета Иванова Василева, дм

- Доц. Ангела Гусийска, дм
- Д-р Елвира Цолова
- Доц. Райна Гергова, дм

Базова организация: МУ-София, Факултет по дентална медицина, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Хитозанът е с висока антибактериална и хелираща ефективност. Той е биосъвместим и биоразградим. Натриевият хипохлорид (NaOCl) се приема за “златен стандарт” при иригациите в ендодонтията. Целта на ин витро изследванията е да се сравнят антибактериалната и кондициониращата способност на хитозан-цитрат 0,6% и NaOCl 2,0%. Тридесет екстрахирани зъба бяха използвани за целта на антибактериалното изследване. Група I (n=15) – след инокулация с *E. faecalis* беше направена дезинфекция с NaOCl 2,0%. Група II (n=15) - след инокулация с *E. faecalis* беше направена дезинфекция с хитозан-цитрат 0,6%. След това беше изчислено микробното число – колония-образуваща единица (CFU/mL) и зъбите бяха наблюдавани на СЕМ. Двадесет екстрахирани зъба бяха използвани за целта на изследване на хелиращата способност. Група I (n=5) – иригация с класически протокол (NaOCl 2,0%, EDTA 15%, дестилирана вода) и obturation на кореновите канали с AN Plus (*Dentsply, Maillefer, Switzerland*), Група II (n=5) – иригация с модифициран протокол (NaOCl 2,0%, хитозан-цитрат 0,6%, дестилирана вода), Група III (n=5) - иригация с класически протокол и obturation на кореновите канали с TotalFill BC (*FKG Dentaire SA, Switzerland*), Група IV (n=5) – иригация с модифициран протокол и obturation с TotalFill BC. Зъбите бяха наблюдавани на СЕМ и на светлинен микроскоп. Оценяване на колония-образуващите единици показва значително редуциране на *E. faecalis*. СЕМ след дезинфекция с хитозан-цитрат 0,6% демонстрира минимално количество на остатъчния бактериален биофилм. Всички зъби, промити с модифициран протокол, включващ хитозан-цитрат 0,6% показаха при СЕМ анализа по-малко апикално проникване (Mean в Група II и IV - 7.94 μm и 4.33 μm) сравнено при зъбите иригирани с класическия протокол (Mean в Група I и III – 12,51 μm и 11,96 μm). Не се наблюдава статистически значима разлика ($p < 0.05$) между зъбите obturirани с AN Plus и TotalFill BC. Хитозан-цитрат 0,6% показва висока антибактериална и кондиционираща ефективност и в значителна степен отстранява бактериалния слой.

Научни публикации и прояви:

- Gyulbenkiyan E, Gusiyska A, Vassileva R, et al. Evaluation of antibacterial properties of chitosan-citrate solution – an *in vitro* study. Int J Recent Sci Res. 2018, 9(3):25237-40.

- Gyulbenkiyan E, Gusiyska A, Vassileva R, et al. Evaluation of antibacterial properties of chitosan-citrate solution – an *in vitro* study. 10th Balkan Congress of Microbiology. Microbiologia Balkanica 2017, Sofia, Bulgaria, 16-18 Nov 2017

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-103/02.05.2017 Дигитален протокол за анализ и лечение на функционалните и естетични смущения при пациенти с вродена цепнатина на устна и/или небце

Изследователски екип: Доц. Димитър Андонов Филчев, дм

- Ас. Вяра Великова
- Радост Великова, дм

Базова организация: МУ-София, Факултет по дентална медицина, Катедра по протетична дентална медицина, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Протетичната рехабилитация и възстановяване при пациенти с цепнатина на устната и венеца, зависи от тежестта на функционалните и анатомични промени. За полесна и пълна оценка на меките и твърдите тъкани при пациентите с цепнатини сме създали дигитален списък с въпроси, подпомагащ вземането на решение за вида на лечение и за изготвянето на индивидуален план за възстановяване на усмивката - основна цел на проекта. Това е интернет базирана платформа, включваща меню с няколко подраздела (полета): анализ на фотоснимки; вид на цепнатината; анализ – на лицето; дентолабиален, дентален и фонетичен анализ. Тук е възможно да се попълва и съхранява досие на всеки пациент и да се следят резултатите от провежданото лечение. Разработена е протетична класификация на типовете дефекти при пациенти с вродена цепнатина на устна и/или небце, според която се предлагат варианти за подходящо лечение. Тя има за цел да улесни общата класификация за протетично лечение и да улесни избора на лечение на тези пациенти. От лекуваните десет пациенти са представени клинични случаи с описание на най-често срещаните дефекти за протезиране. Протетичните конструкции за лечението на участниците в проекта са: неснемаема мостова протеза – с крепител мериленд и крепители обвивни корони, с керамични фасети и корони от литиев дисиликат керамика. Методиката включва снемане на анамнеза, подписване на декларация за информирано съгласие за участие в изследването, параклинични изследвания и фотоснимки, които се попълват в дигиталният въпросник. Сканират се горна и долна зъбни редици с интраорална камера; Въвежда се сканираната информация в софтуерната програма за дигитализиране на усмивката и се изработва дигитален дизайн на усмивката; Взема се предварителен отпечатък от двете зъбни редици със С- силикон и цели метални лъжици. Следва снемане с лицева дъга и включване на моделите в артикулатор и изработване на восъчен проект по дигиталният дизайн на усмивката във фронталният участък и в дисталният участък за балансиране на оклузалните контакти в артикулатора. Визуализира се восъчният проект чрез изработка на силиконов ключ и композитен материал за временни конструкции – композитна маска.

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-109/02.05.2017 Оценка на ролята на интраоперативната лъчетерапия (ИОЛТ), при лечение на карцинома на млечната жлеза

Изследователски екип: Доц. Свилен Иванов Маслянков, дм

- Проф. Георги Годоров, дм
- ас. Мариела Василева-Славева, дм
- Гл. ас. Васил Павлов, дм
- ас. Илия Фидошев, докторант
- Ас. Петър Грибнев, докторант
- Д-р Ния Петрова
- Десислава Костова-Левтерова

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Хирургия, УМБАЛ“Александровска“, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Лечението на карцинома на млечната жлеза изисква комплексен подход. В минимален обем това включва биопсия, оперативна интервенция и следоперативно лъчелечение. Използването на интраоперативната лъчетерапия (ИОЛТ) постига минимално засягане на околните тъкани и по-кратко време за лечение, при сравними далечени резултати. В настоящето проучване са обхванати 9 пациентки с ранен стадий карцином на гърдата, селектирани съгласно критериите на ASTRO (Американската Асоциация по Радиационна Онкология) от 2016г. Диагностично-лечебните подходи включват: дебелоиглена биопсия, биопсия на сентинелни лимфни възли (СЛВ) и ИОЛТ с Аххент ХР 1100, Xoft, inc. Подготовката на болната и екипа е осъществена в планов порядък, след обучение на екипа и попълване на съответните информирани съгласия от пациента. Пациентите са диагностицирани предоперативно. Определен е вида и рецепторният статус на карцинома. Мултидисциплинарната онкологична комисия към болницата взема индивидуално решение за извършване на ИОЛТ. Процедурата започва с определяне статуса на предварително маркираните с ^{99m}Tc -MIBI СЛВ, които се идентифицират и изпращат за гефир. При липса на метастази в тях следва ексцизия на туморната формация в здраво. Средният размер на туморите е 16 мм (8 - 24 мм). Използвани са и трите размера апликатори: 4 с размер 3/4см, 4 - 4/5 см и 1 - 5/6см. Средното време за облъчване е 11.86 минути (8.38- 18.02'). Пациентките са проследени в рамките на до една година следоперативно. Не са наблюдават ранни и късни усложнения свързани с приложението на ИОЛТ. Не са отчетени локални и системни данни за прогресия на основното заболяване. Верифициран е отличен козметичен резултат. Приложението на ИОЛТ е добра опция за жени, диагностицирани с ранен стадий карцином на гърдата. Методът привлича вниманието на пациентите поради значителното удобство, кратките срокове на лечение и отличния козметичен резултат. Необходими са допълнителни проучвания, за да се прецизира селекцията на пациенти за ИОЛТ, което в крайна сметка ще определи ролята на този метод в лечението на карцинома на млечната жлеза.

Научни публикации и прояви:

- Borisova G, Maslyankov S, et al. Intraoperative radiation therapy in breast cancer treatment, 2nd Int Biomedical Congress, IBC - Sofia 2017
- Захариев З, Костова-Левтерова Д, Маслянков С, и др. Интраоперативна електронна брахитерапия при пациенти с карцином на млечната жлеза. XVI Конгрес по Хирургия, Oct 2018

Научният отчет е приет с *ДОБРА* оценка по скалата на СМН.

Договор Д-110/02.05.2017 Проучване и оценка на диагностичната и прогностичната роля на острофазовите протеини IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-9 и прокалцитонин като предиктори за ранна инсуфициенция на анастомозата след предна резекция на ректума

Изследователски екип: Доц. Димитър Иванов Буланов, дм

- Доц. Димитър Буланов, дм
- Д-р Лилия Симонова
- Гл. ас. Драгомир Дарданов, дм
- Гл. ас. Евгени Живков, дм
- Доц. Валентин Попов, дм
- Гл. ас. Жулиета Христова-Димитрова, дм

Базова организация: МУ – София, МФ, Катедра по обща и оперативна хирургия, УМБАЛ „Александровска“, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Броят на пациентите при които проведехме нашите изследвания се намали от 60 на 20 пациенти, според отпусната сума от МУ. При тях изследвахме IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-9 и Прокалцитонин от венозна кръв и секрет от дрен , взети на 2 и 5 СОД. Нарастването на Прокалцитонин на 2д кръв на пациента с една нова единица (20 стари единици) води до нарастване на риска от Инсуфициенция от 1 на 1,037- около 4%. Нарастването на Прокалцитонин на 5д кръв на пациента с една нова единица (20 стари единици) води до нарастване на риска от Инсуфициенция от 1 на 1,053= 5,3%. Нарастването на TNF- α на 5д дрен с една нова единица (20 стари единици) води до нарастване на риска от Инсуфициенция от 1 на 1,088= 9%. Максималната стойност на TNF- α 2д кръв, на Чувствителност + Специфичност е 1,75 и се достига при стойност на TNF- α 2д кръв 0,0335. Следователно стойности по-малки или равни на 0,0335 говорят за Инсуфициенция с чувствителност 100% и специфичност 75%. Максималната стойност на TNF- α 5д дрен, на чувствителност + специфичност е 1,765 и се достига при стойност на TNF- α 5д дрен 29,09. Следователно стойности по-големи или равни на 29,09 говорят за Инсуфициенция с чувствителност 100% и специфичност 76,5%. Максималната стойност на IL-6 2д кръв, на Чувствителност + Специфичност е 1,857 и се достига при стойност на IL-6 2д кръв приблизително 6,31. Следователно стойности по-малки или равни на 6,31 говорят за Инсуфициенция с чувствителност 100% и специфичност 85,7%. От изследваните острофазови протеини в нашето проучване три от тях имат значимост за установяване на ранна инсуфициенция на анастомозата след предна резекция на ректума. Прокалцитонин – изследван в кръвта на пациента на 2 и 5 следоперативен ден. TNF- α – изследван в кръвта на пациента на 2 СОД и изследван от материал на дрен на 5 СОД. IL-6- изследван в кръвта на пациента на 2 СОД.

Научният отчет е приет с *ДОБРА* оценка по скалата на СМН.

Договор Д-111/02.05.2017 Изследване диагностичната и прогностична стойност на фибронектина при пациенти със солидни тумори

Изследователски екип: Гл.ас. Васил Маринов Павлов, дм

- Мариела Василева-Славева, дм
- Проф. Георги Годоров, дм
- Доц. Свилен Масляков, дм
- Ас. Ангел Арабаджиев
- Доц. Теофил Седлоев, дм
- Д-р Славяна Ушева
- Ас. Александрина Влахова
- Гл. ас. Антоанета Младенова, дм
- Гл. ас. Жулиета Христова-Димитрова, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по хирургия, УМБАЛ „Александровска“, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Това е проспективно изследване случай – контрола изследващо диагностичното и прогностичното значение на серумните нива на фибронектина (FN) при карциноми на дебелото черво, гърдата и стомаха. Серумните нива на фибронектина са установени по метода ELISA (ензимно-свързан имуносорбентен анализ). Използваните статистически методи включват непараметричните тестове Fisher exact test, Wilcoxon rank sum test и ROC curve анализ. До 02.11.2018 са събрани 93 проби, от които изследвани за стойностите на серумните нива на FN са 68. От тях 32 са на пациенти с карцином на дебелото черво, 26 с карцином на гърдата, 5 с карцином на стомаха и 5 здрави контроли. Статистически значима връзка се установи между провеждането на предоперативна лъчетерапия и нивата на FCN, което показва, че интерпретацията на нивата на FN трябва да се съобрази с провеждането предоперативна лъчетерапия. Въпреки това значима връзка се установи между нивата на фибронектина и наличието на метастази в лимфните възли при пациенти с колоректален карцином, независимо от провеждането на предоперативна лъчетерапия. Тези резултати потвърждават нашата хипотеза, че фибронектинът би могъл да служи като маркер за наличие на метастази в лимфните възли, тъй като е продукт на клетките преминали през епителиално- мезенхималната транзиция. Не се установиха статистически значими връзки между нивата на FN и наличието на метастази или други характеристики на тумора при пациентите с карцином на гърдата. За оценка на диагностичната стойност на фибронектина е необходим анализ на по-голямо количество проби от здрави контроли.

Научният отчет е приет с **НЕЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-112/02.05.2017 Био имидж изследвания на клетъчната физиология на първични човешки клетъчни култури, изолирани от *in vivo* интраоперативно третиран с *trypsin blue* предни лещени капсули на пациенти с възрасто-обусловена катаракта и вродена катаракта

Изследователски екип: Проф. Ива Годорова Петкова, дм

- Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн

- Доц. Иван Танев, дм
- Гл. ас. Антония Исаева, дм
- Д-р Вяра Шумналиева-Иванова
- Виолета Димитрова, докторант
- Васил Хайкин, докторант

Базова организация: УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по очни болести, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В настоящето изследване, за първи път у нас, бяха получени първични клетъчни култури от епителни клетки в лещата (LECs), изолирани от *in vivo trypan blue*-обогрени и необогрени антериорни лещни капсули от пациенти с възрастообусловена катаракта (8 пациенти на възраст 55 – 75 години) и пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта (8 пациенти на възраст 55 – 75 години). Беше установено, че латентният период, след който започва миграцията на първите клетки (т. нар. leader cells) от експлантите е различен за двата типа катаракта - leader cells мигрират от експлантите от пациенти с възрастообусловена катаракта на 6 ден (mean=5,875, n=8) от *in vitro* култивирането, докато тези от експлантите от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта на 9 ден (mean=8,875, n=8). Не бяха установени разлики в латентния период на *in vivo trypan blue*-обогрени и необогрените експлантите от двете пациентски групи. Времето на удвояване на клетъчните популации също беше различно - култивационния период за достигане на 70% клетъчна конфлуентност на LECs, изолирани от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта беше една седмица по-дълъг спрямо този на LECs, изолирани от пациенти с възрастообусловена катаракта, което се дължи на значително по-слабите им миграционна и пролиферативна активности. Само 33,45% от клетките в LECs културите, изолирани от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта съдържаха новосинтезирана ДНК и експресира FOXM1, докато 55,76% от LECs в културите, изолирани от пациенти с възрастообусловена катаракта бяха пролиферативно активни. Разликите в миграционната и пролиферативната активности обуславят и отчетената разлика в колониообразуването на LECs от двата типа катаракта. Формираните за еднакъв култивационния период колонии в LECs културите, изолирани от пациенти с възрастообусловена катаракта бяха 3-кратно повече от тези в културите, изолирани от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта. Не бяха установени разлики в изследваните характеристики между LECs, мигриращи от *in vivo trypan blue*-обогрени и от необогрени антериорни лещни капсули. Обобщено, тези оригинални данни доказват, че основните характеристики на *in vitro* култивираните LECs комплексно отразяват фенотипната изява на типа катаракта, от който са изолирани. Това е солидна основа за използването на LECs първични култури, изолирани от български пациенти в разнопосочни изследвания с практическа и научно-изследователска насоченост.

Научни публикации и прояви:

- Хайкин В, Танев И, Петкова И, и др. Изследване на миграционна и пролиферативна активност и спонтанна диференциация на човешки първични лещно-епителни култури от пациенти с възрастообусловена и диабет тип II-индуцирана катаракта. „Новости в офталмологията | Катаракта – Рефрактивни аспекти“ 23-25 ноември 2018 Плевен

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-113/02.05.2017 Предиктивен модел за оценка на пре-трансплантационен крос-мач и анти тяло медирана реактивност при бъбречна трансплантация

Изследователски екип: Проф. Елисавета Йорданова Наумова-Григорова, дмн

- Проф. Анастасия Михайлова
- Доц. Милена Иванова-Шиварова
- Ас. Петя Янкова
- Доц. Тодор Кундурджиев
- Д-р Атанаска Георгиева
- Д-р Цветелин Луканов

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра “Клинична лаборатория и клинична имунология”, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Значението на кросмач теста за окончателното потвърждаване на съвместимостта между донора и реципиента при бъбречна трансплантация (БТ) е безспорно. Твърдофазовите микросферови технологии за откриване на анти тяла срещу единични антигени позволиха предсказване на кросмач реактивността според алоантителния профил на реципиента и несъвместимите донорни HLA антигени (виртуален кросмач - v-ХМ). Ние си поставихме за цел да оценим хуморалната алореактивност при реципиенти чакащи бъбречна трансплантация (БТ) и да разработим предиктивен модел за вероятността от позитивен пре-трансплантационен кросмачи риск от анти тяло-медиран имунен отговор при БТ. Анализът на алоантителата показва: Преобладаване на HLA клас I+II анти тяла (50%) валосенсибилизираните пациенти (n=109), следвани от анти-HLA клас I (33%), а най-малко са HLA клас II (17%) анти тялата. Не се установи сигнификантна връзка между вида/броя сенсibiliзиращи събития и наличието на алоантитела. Най-честите HLA-A локусни анти тяла са срещу HLA-A2(30,3%), A23 и A25 (33,9%), и A24(40,4%). Най-силен е имунният отговор към HLA-A2. Най-честите HLA-Bспецифичности са срещу HLA-B49(42,2%); B57 и B58(39,4%); B76(36,7%), B13(37,6%), B51, B52 и B77(35,8%); B53(34,9%), B27(33,9%), B44 (33%)%; B7, B47 и B62(32,1%). HLA-C локусните анти тяла се откриват доста по-рядко и са по-слаби. HLA-DR анти тялата са най-често към HLA-DR4(32,1%), DR7 и DR9(28,4%). HLA-DQ7, DQ8 и DQ9 (HLA-DQB1*03) са най-честите (48.6%) анти тяла срещу DQB, но се открива анти тяла срещу DQAверигата. HLA-DPB1 анти тялата най-често са срещу HLA-DPB1*03 и DPB1*05 алелни групи. Анализът на шансовете за наличие на антигени при здрави (n=204) и анти тяла при пациентите показва, че реципиенти с HLA-A2 анти тяла са с най-голям шанс да имат несъвместим по този антиген донор. Оценката на микросферов метод за донорспецифични анти тяла (DSA) показва, че резултатите от него не винаги съвпадат с тези от клетъчно-базирания кросмач и алоантителния профил. V-ХМ може да предскаже в голяма степен резултата от реалния, но има и неочаквано T(+)/B(+), T(+)/B(-) реакции, за които се доказва, че се дължат на DSA. Неочакваният T(-)/B(+) кросмач най-често е резултат от автоантитела. В резултат на проучването е разработен предиктивен модел за алореактивност и виртуален кросмач.

Научни публикации и прояви:

- Янкова П, Михайлова А, Иванова М, и др. Положителен флоуцитометричен крос-мач при реципиенти за бъбречна трансплантация без предварителни данни за донор-специфични анти тяла. Нефрология, диализа и трансплантация 2018

- Mihaylova A, Yankova P, Antonova A, et al. Positive T-cell and negative B-cell flow cytometry crossmatch due to HLA-B donor-specific antibodies. The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: 43rd Annual Meeting 11-15 Sep 2017, USA
- Mihaylova A, Yankova P, Antonova A, et al. Unexpected flow cytometry crossmatch reactivity in patients awaiting kidney transplant. 32 Eur Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), 9-12 May 2018

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-114/02.05.2017 Микро- и макросъдови промени при неалкохолната стеатозна болест с или без нарушения във въглехидратната обмяна

Изследователски екип: Проф. Здравко Асенов Каменов, дмн

- Проф. Людмила Владимирова, дмн
- Проф. Асен Алексиев дмн
- Проф. Радина Иванова-Боянова, дм
- Доц. Рая Иванова дм
- Ас. Вера Карамфилова
- Гл. ас. Антоанета Гатева, дм
- Ас. Цветелина Великова, дм
- Ас. Надежда Милчева, дм

Базова организация: МУ – София, МФ, Катедра вътрешни болести, УМБАЛ „Александровска“, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В проучването бяха включени 79 пациенти с ехографски установена чернодробна стеатоза на средна възраст $50,95 \pm 11,11$ години, разделени в две групи - *група 1* със затлъстяване без въглехидратни нарушения ($n=41$) и *група 2* със затлъстяване и предиабет ($n=38$), сходни по възраст, антропометрични показатели, както и по отношение на класическите сърдечно-съдови рискови фактори. Установихме сходни стойности на маркерите за микроваскуларни и макроваскуларни усложнения в двете групи. RBP-4 е с повишени нива при лицата с НАСБ и предиабет, както и при тези с метаболитен синдром и НАСБ, в сравнение с пациенти със затлъстяване и НАСБ без метаболитен синдром и въглехидратни нарушения. При стойности на RBP4 ≥ 61 спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на въглехидратни нарушения е 3,5 пъти по-висок. Лумикан е с повишени нива при лица с НАСБ, затлъстяване и предиабет в сравнение с пациенти с НАСБ и затлъстяване без въглехидратни нарушения. При стойност на Lumikan $\geq 0,07$ спрямо тези с по-ниски стойности, рискът за възникване на въглехидратни нарушения е 3,9 пъти по-висок. Хемерин не се експресира различно при лица с НАСБ, затлъстяване и предиабет, както и при лица с НАСБ и затлъстяване без въглехидратни нарушения, но корелира с индекса за чернодробна стеатоза. Не установихме корелация между изследваните от нас маркери и показателите за макро- и микроваскуларен риск

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-116/02.05.2017 Оперативно възстановяване на очната повърхност при пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция чрез трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки

Изследователски екип: Доц. Иван Веселинов Танев, дм

- Розалия Димитрова, докторант
- Яни Здравков, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по Офталмология, УМБАЛ „Александровска“, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е в основата на редица заболявания на очната повърхност. Цел на настоящото проучване бе да се проследят резултатите от трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки при пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Използваните методи включват рутинен офталмологичен преглед, изследване на роговична сетивност, оптична кохерентна томография (ОСТ) на преден очен сегмент, бърз тест за повърхностно очно възпаление, минимално инвазивна лимбална биопсия, фазовоконтрастна микроскопия, импресионна цитология. Включените пациенти бяха с тежка унилатерална частична лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Чрез проведените изследвания се демонстрира, че невротрофичната кератопатия протича с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, поради което състоянието бе включено като показание за трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки. Предно-сегментната ОСТ предоперативно демонстрира зони на дезепителизация, стромална хиперрефлексивност и корнеален едем. Постоперативно се наблюдава пълна епителизация на роговичната повърхност и формиране на цикатрициална тъкан в роговичната строма, възпрепятстваща процеса на изтъняване, която в хода на реконвалесцентия период се опрозрачи. Чрез иновативен модифициран 3D Macula Drusen протокол се определиха площта и обема на формираната цикатрициална тъкан. Създаде се ясен терапевтичен алгоритъм като се утвърди методиката на лимбална биопсия и възстановяване на очната повърхност с използване на амниотична мембрана на два етапа. Използваният протокол за ex vivo размножаване на лимбалните стволови клетки е изключително ефективен и отговаря на всички съвременни изисквания за биологична безопасност, тъй като не съдържа ксенобиотични продукти и същевременно осигурява максимална клонална експанзия и запазва недиференциран фенотип на получените клетки. Установи се статистически значимо подобрене на зрителната острота след интервенцията ($p=0.009$). Основните фактори, които оказаха влияние върху постоперативния резултат са предоперативната зрителна острота и възрастта на пациента. Нежелани реакции не бяха наблюдавани при пациентите, включени в проучването. При всички пациенти бяха изпълнени критериите за успех, дефинирани като подобряване на зрителната острота, стабилна епителизация на очната повърхност, опрозрачаване на засегнатите зони, редукция на неоваскуларизацията.

Научни публикации и прояви:

- Hristova R, Tanev I, Markov G et al. Regenerative therapy for post-herpetic neurotrophic ulcer, 36th Congress of the Eur Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS), Vienna, Austria, 22-26 Sep 2018
- Hristova R, Tanev I, Hristova M et al. Topical Mitomycin C as Treatment for Ocular Surface Squamous Neoplasia (Carcinoma in situ) following systemic chemotherapy for Non-Hodgkin Lymphoma, 9th EuCornea Congress, Vienna, Austria, 21-22 Sep 2018

- Христова Р, Танев И, Янкова Е и др. Лечение на митомицин-индуцирана инсуфициенция на лимбални стволови клетки – клиничен случай, XII Конгрес на Българското Дружество по Офталмология, София, 21-22 Октомври 2017
Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-117/02.05.2017 Изследване на влиянието на клетъчни култури от Glioblastoma multiforme върху Tregs, Th17 и моноцити в състава на периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави донори

Изследователски екип: Доц. Доброслав Станимиров Кюркчиев, дн

- Гл. ас. Екатерина Иванова-Годорова, дм
- Проф. Севдалин Начев, дн
- Калина Тумангелова-Юзеир, дм
- Цветелина Великова, дм, УБ Лозенец
- Д-р Емануил Найденов
- Екатерина Куртева, докторант

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Бул. „Акад. Ив. Евст. Гешов“ 15, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Glioblastoma multiforme (GBM) е един от най-агресивните и често срещани се тумори на централната нервна система. Неговото лечение чрез конвенционални методи, включващи радио и химиотерапия, е неуспешно и се смята, че GBM осъществява имunosupresия както на локално, така и на системно ниво. Целта на това изследване е да се изолират и култивират клетки от GBM и да се изолират периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMCs) от здрави донори, след което: 1. PBMCs да бъдат култивирани с изолирани от GBM клетъчни култури; 2. PBMCs да бъдат култивирани със супернатанти от GBM клетъчни култури; 3. Да се изследва влиянието на ко-култивирането и на супернатанта от GBM клетъчни култури върху процента на моноцити, T регулаторни клетки (Tregs) и Th17 клетки в състава на PBMCs от здрави донори. 4. Да се изследва наличие на PD-1L върху GBM клетъчни култури и на PD-1 върху изследваните клетъчни популации. Методи: Клетъчно култивиране, Флоуцитометричен анализ, Статистически анализ. Установено беше, че клетъчни култури, изолирани от GBM влияят върху различни левкоцитни популации в състава на PBMC, изолирани от здрави донори, както чрез секреторни фактори, така и чрез клетъчен контакт. Резултатите за Tregs показаха повишаване на броя на двете изследвани субпопулации – CD4+CD25-FoxP3+, CD4+CD25+FoxP3+ както и на общите CD4+FoxP3+, както при култивиране със супернатанти, така и при ко-култивиране с GBM клетъчни култури. Изследването на Th17 показва понижение на техния процент в хелперната популация под действие на секреторни фактори. При моноцитите беше отчетена повишена експресия на CD14 и понижена на HLA-DR, наблюдавани и при двете експериментални постановки. Не беше установена разлика при експресията на ко-стимулаторната молекула B7 в сравнение с контролни клетки при култивиране със супернатанта или ко-култивиране с GBM клетъчни култури. Установена беше силна експресия на PD-1L от клетъчни култури от GBM. Получените резултати потвърждават литературните данни относно имуномодулацията осъществявана от GBM върху различни левкоцитни популации в посока имунна супресия.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-118/02.05.2017 Серумни биомаркери за болестна активност и прогноза при пациенти с прогресивна системна склероза, с водещи белодробни поражения

Изследователски екип: Доц. Симеон Валентинов Монов, дм

- Д-р Росица Дачева
- Проф. Марта Балева, дмн
- Гл. ас. Милена Николова-Влахова, дм
- Гл. ас. Руска Шумналиева, дм
- Проф. Доброслав Кюркчиев, дмн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по вътрешни болести, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, ул. Урвич 13, София 1612

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването е да се изясни ролята на KL-6 и CCL18 за развитието на ПСС и свързаните с нея белодробни усложнения и да се определи възможността тези показатели да се използват като биомаркери за активност и прогноза на ПСС при български пациенти. Бяха определени серумните нива на KL-6 и CCL18 чрез ELISA метод при 35 пациента с ПСС и 15 здрави контроли. В проведеното от нас изследване не се установи наличието на CCL18 както в серумите на пациентската група, така и в тази на здрави контроли. В серума на един от здравите доброволци се установи наличието на KL-6. В проведеното от нас изследване не се установи статистически значима разлика между нивата на KL-6 и CCL18 в серумите на пациентската група и тази на здравите контроли. Не се установи корелация между нивата на изследваните серумни биомаркери и клиничната изява на пациентите с ПСС.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-119/02.05.2017 Ранна диагноза, скрининг и проследяване на пациенти с неясна хронична диария и микроскопски колит, посредством изследване на фекални маркери

Изследователски екип: Доц. Пламен Иванов Пенчев, дм

- Иван Лютаков, докторант
- Доц. Росица Вачева-Добревска, дм
- Боряна Асенова
- Милена Четирска

Базова организация: МУ-София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, Клиничен център по Гастроентерология, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Фекалният калпротектин (FC) се използва като маркер на чревно възпаление при хронични възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ), но няма друг значим маркер при пациенти с микроскопски колит (МС) или маркер, който лесно да ги разграничи от синдром на дразнимо черво (IBS-D). В някои проучвания, това мукозно възпаление при МС се осъществява от еозинофилна активация, без да има увеличена

неутрофилен-активация. Целта е да се определи диагностичната стойност на фекалния еозинофилен-дериватен невротоксин /еозинофилен протеин X (EDN/EPX) и FC при пациенти с хронична диария. В проспективно проучване са включени 40 пациенти с хронична диария – пет групи както следва: 14 пациенти с активно ХВЗЧ, 5 пациенти с ХВЗЧ в ремисия, 5 пациенти с ХВЗЧ след операция, 11 пациенти с IBS-D и 5 пациенти с МК. Проведени са стандартни лабораторни изследвания, колоноскопия, FC и EDN/EPX в болница „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София, България. FC и EDN/EPX са определени чрез ELIZA, а FC е изследван с количествен имунохроматографски метод. От тези 40 пациенти включени в анализа, завишение стойности на EDN/EPX са установени във 19 (47,5%) и намалени във 21 (52,5%) от пациентите и възраст между 23 и 80 години с медиана 51.50 и средна стойност 49,25 години. Чувствителността и специфичността на EDN/EPX и FC, както и техните ROC/AUC анализ показва EDN/EPX (ng/ml).636; FC $\mu\text{g/g}$.924 и CRP (mg/dl) .670, което показва диагностична сигнификантност само при пациенти с IBD в активност ($p=0.04$). EDN/EPX и FC показват добри резултати при идентифицирането на пациенти с активно IBD, но ниска специфичност за МК и IBS-D, поради което могат да бъдат използвани за разграничаване на IBD от МК и IBS-D. Комбинацията на EDN/EPX и FC може да се използва като сурогатен маркер за не-инвазивно изследване преди колоноскопия при пациенти суспектни за IBD в активност. По-големи проучвания са необходими за установяване на ефективността на EDN/EPX и FC при МК и IBS-D.

Научни публикации и прояви:

- Lyutakov I, Penchev P, Kyoseva D. Diagnostic algorithm and treatment for microscopic colitis: A Review. Int J Adv Res. 2017;5(10):616-29.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-120/02.05.2017 Скрининг и диагностика на автоимунен панкреатит и съпътстваща панкреасна екзокринна функция

Изследователски екип: Проф. Борислав Георгиев Владимиров, дм

- Мила Ковачева-Славова, дм
- Силви Митова-Симинкович, дм,

Базова организация: МУ-София, МФ, Клиничен център по гастроентерология, УМБАЛ “Царица Йоанна-ИСУЛ“, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Концепцията за автоимунен панкреатит (АИП) е сравнително нова и обхваща 2 типа. АИП се свързва с IgG4-свързаните и възпалителните чревни заболявания (ВЧЗ). Въпреки това диагностиката и терапевтичният подход остават клинично предизвикателство. Целта на настоящето изследване е провеждане на скрининг и диагностично прецизиране на АИП при суспектни за заболяването пациенти, оценка на панкреасната екзокринна и ендокринна функция. Скринингът за АИП се осъществи посредством диагностични критерии, включващи изследване на морфологичните промени на жлезата (US,CT/MRCP), серология (имуноглобулини А,М, G и IgG4), отговор към стероиди, наличие на мултиорганно засягане и ВЧЗ. Наличието на панкреасна екзокринна недостатъчност (ПЕН) се установи чрез изследване на фекална еластаза-1. Ендогенната дисфункция се оцени чрез кръвна захар и HbA1c. Изследването включи 130 пациента на средната възраст $45,72 \pm 15,91$ г., 48,47% бяха мъже. Разпределението по диагнози бе както

следва: 25,39% с хроничен или остър панкреатит с неясна етиология (ХП/ОП), 52,31% с ВЧЗ, 4,62% с обсервиран панкреасен рак и 17,63% с други аутоимунни заболявания. 33 пациента съобщават за съпътстващо системно, аутоимунно заболяване. Средните нива на изследвания IgG4 $38,545 \pm 173,625 \text{ mcg/dL}$ не се различаваха значимо спрямо диагноза, пол, възраст, нива на CRP. Наличието на съпътстващо аутоимунно заболяване, както и захарен диабет и предиабет, повишават значимо нивата на IgG4, $p=0,044$, $p=0,05$. По време на провеждания скрининг при 8 пациента (6,15%) на средна възраст $37,13 \pm 10,14$ г. се наблюдаваха характерни за АИП структурни промени. От тях две жени с ХП отговаряха на критериите за АИП тип 1. АИП тип 2 се доказа при две жени с улцерозен колит. Стартирана бе стероидна терапия с ефект. ПЕН се установи в 19,18% от изследваните (1 пациент с АИП) със значимо най-ниски нива при пациентите с ХП/ОП. ПЕН не зависи от пол, възраст, нива на IgG4. Оптимални нива на кръзната захар имаше при 90 пациента. АИП е рядко, но все по-разпознаваемо заболяване. Необходима е дългосрочна стратегия за проследяване, позволяваща предотвратяване на бъдещи рецидиви и усложнения.

Научни публикации и прояви:

- Kovacheva-Slavova M, Siminkovitch S, Penchev P, et al. Autoimmune pancreatitis and inflammatory bowel disease- a riddle unwrapped, Pancreas Spring Meeting, Goettingen 11-12 May 2017
- Kovacheva-Slavova M, Siminkovitch S, Genov J, et al. Pancreatic enzyme replacement therapy in patients with pancreatic exocrine insufficiency. IAP/LAPSG Joint Meeting, Buenos Aires. Argentina, Sep 28-30, 2017
- Ковачева-Славова М, Симинкович С, Генов Й, и др. Хранителни дефицити при асимптомни пациенти с хроничен панкреатит и панкреатична екзокринна недостатъчност Четвърти национален конгрес за млади гастроентеролози, Март 23-24, 2018, София

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-121/02.05.2017 Изследване на процент Th17 клетки и съответните им цитокини в хода на лечение с бетаинтерферони и fingolimod при пациенти с множествена склероза с оглед оценка на терапевтичния отговор

Изследователски екип: Акад. Проф. Иван Господинов Миланов, дмн

- Проф. Доброслав Кюркчиев, дмн
- Марина Борисова, докторант
- Екатерина Куртева, докторант
- Цветелина Великова, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по неврология, МБАЛНП „Св.Наум“, ул. Любен Русев 1, София 1113

РЕЗУЛТАТИ: Изследвахме 27 пациенти на средна възраст 34.58 ± 9.85 г. с поставена диагноза по критериите на McDonalds Множествена склероза (МС) с пристъпно-ремитентен ход на протичане. Давността на заболяването при пациентите е средно 3.6 г. ± 1.2 г. Бяха включени и 10 лица контроли. Бяха подбрани болни, които започват лечение с интерферон $\beta 1a$ (Avonex, Rebif), интерферон $\beta 1b$ (Extavia) и fingolimod (Gilenya), като пациентите се проследиха на нулев, шести и дванадесети месец от терапията.

Разпределението по групи пациенти беше съответно: 5 на лечение с fingolimod (Gilenya) и 22 болни на лечение с бетаинтерферони. Бе извършено флоуцитометрично изследване на Th17 клетки в периферна кръв на пациенти с МС и здрави лица, а серумите им бяха тествани за наличието на IL-6, IL-17A, IL-23, TGF-b1 чрез ELISA метод. Направи се анализ на връзката между резултатите от изследваните имунологични параметри, активността на заболяването и отговора към лечението. Процентът на Th17 лимфоцитите преди започване на терапия не се различаваше значимо от този при здрави, на 6-ти месец наблюдавахме покачване и към 12ти месец процентът им намаля до началния ($p>0.05$). Намерихме значимо увеличаване на количеството на IL-6 при всички болни с МС преди започване на лечение и на бти месец от терапия, спрямо здравите лица ($p=0.035$), както и гранично повишени стойности на TGFb1 при всички пациенти с МС спрямо здравите контроли ($p=0.071$). Нашият екип не намери секреция на IL-17A в периферна кръв нито при пациентите с МС, нито при здравите контроли. Установихме тенденция за редукия в нивата на имунологичните показатели (Th17 клетки, IL-6, IL-23, TGF-b1) в хода на терапията, както и тенденция за повишаване на техните стойности при пациенти, които са в пристъп или са имали пристъп на заболяването за периода на наблюдение. Данните ни са в синхрон с литературните за участието на Th17 лимфоцитите при МС. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-122/02.05.2017 Ниво на лептин при момчета с пубертетна гинекомастия

Изследователски екип: Доц. Елисавета Милкова, Стефанова, дм

- Ас. Здравка Тодорова
- Д-р Десислава Йорданова
- Ас. Аделина Цакова

Базова организация: МФ, Катедра по педиатрия, бул. Акад. И. Гешов 11, гр. София 1606

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящото изследване е да се сравни серумното ниво на лептин при момчета с пубертетна гинекомастия и контролна група, съответна по възраст, степен на пубертетно развитие и антропометрични показатели. За целта бяха изследвани 57 момчета с пубертетна гинекомастия с нормална степен на охраненост или с наднормено тегло и затлъстяване и контролна група от 60 момчета без гинекомастия, съответни по възраст, степен на пубертетно развитие и антропометрични показатели. Измерени, анализирани и сравнени бяха следните показатели: индекс на стандартно отклонение за ръст (SDSh), индекс на стандартно отклонение за тегло (SDSw), индекс за стандартно отклонение за индекс на телесна маса SDS_{BMI} и отношение талия/ръст. На всички момчета бе взета венозна кръв сутринта на гладно в интервал 07.30 ч и 08.30 ч., от която бе отделен серум. Последния бе съхранен на (-20) °C до времето на изследване. Серумното ниво на лептин бе изследвано съгласно спецификациите на производителя на ELISA Human Leptin Serum, DiaSour, Белгия. Възможната за детекция най-малка концентрация на серумен лептин е 0,04 ng/ml. При сравнение на средното ниво на серумен лептин между групата с ПГ и без Г, не бе установена статистически значима разлика при момчетата с нормална степен на охраненост и при тези с наднормено тегло и затлъстяване. Също не бе открита статистически значима разлика между групите с ПГ и без във 2-ра и 3-та степен на пубертетно развитие, независимо от охранеността и при нормално охранените момчета в

4-ти -5-ти стадий със или без ПГ. Единствено при момчетата с 4-ти -5ти стадий пубертет, наднормено тегло и ПГ бе намерено статистически значимо по-високо ниво на лептин в сравнение с контролната група със съответно тегло и степен на пубертетно развитие. От получените резултати може да се направи извод, че лептинът макар и значително повишен в началото на пубертета вероятно няма отношение към появата и развитието на жлезист паренхим при момчета, но би могъл да има роля в персистирането на пубертетната гинекомастия в края на пубертета и в зряла възраст, тъй като само в групата с перситираща пубертетна гинекомастия при затлъстели момчета се наблюдава задържане на високите му нива.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-123/02.05.2017 Изследване на генетични полиморфизми, свързани с лекарстения отговор към метотрексат при пациенти с юношески идиопатичен артрит

Изследователски екип: Проф. Стефан Недев Стефанов, дм

- Ас. Маргарита Ганева, дм
- Доц. Албена Телчарова-Михайловска, дм
- Проф. Радка Кънева, дмб

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра Педиатрия, СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“; бул. Акад. Ив. Евстратиев Гешов 11, София, 1612

РЕЗУЛТАТИ: Обхванати са 43 пациенти (23 момичета и 20 момчета) с диагностициран Юношески идиопатичен артрит според критериите на ILAR (International League of Associations for Rheumatology). Средната възраст на пациентите е 8.61 години (2,16-15,66 години), средната възраст на изява на заболяването е 4.94 години (1-15 години). Средната възраст на започване на терапия с Метотрексат (MTX) е 5.81 години (2-15.08 години). Всички пациенти провеждат терапия с Метотрексат в средна доза 7.8 мг. Пациентите са разделени в две групи – такива провеждащи терапия само с MTX и оптимален отговор (n=24) към лечението с MTX и такива провеждащи лечение и с биологичен агент и съответно лош отговор към терапията с MTX (n=19). При провеждане на хи-квадрат метод за сравнение на разпределението на алелните честоти между децата с добър лекарствен отговор и тези с лош лекарствен отговор не установихме сигнификантна разлика в разпределението на алелните честоти на полиморфизмите в групата с добър и тази с лош лекарствен отговор (MTRR rs1801394 A>G $\chi^2 = 0,14$; df =1; p>0.05; SLC46A1 rs2239907 C>T $\chi^2 = 1,19$; df =1; p>0.05 ABCC1rs35592 T>C $\chi^2 = 2,08$; df = 1; p>0.05; ABCB1 rs1045642 G>A $\chi^2 = 3,25$; df = 1; p>0.05). Тази находка следва да бъде проверена (потвърдена или отхвърлена) при разширено проучване върху значително по-големи групи индивиди. Установяването на полиморфни варианти, свързани с лекарстения отговор се нуждае от по-широкообхватно изследване. Това би довело до ранно откриване на децата с лош или липсващ отговор към провежданата терапия с MTX.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-124/02.05.2017 Парвовирус В19 инфекция, асоциирана с анемичен синдром при пациентки с рискова бременност

Изследователски екип: Проф. Борислав Маринов Маринов, дм

- Гл. ас. Стефка Иванова, дб - НЦЗПБ
- Гл. ас. Виктор Манолов
- Силвия Волева - НЦЗПБ

Базова организация: МУ-София, СБАЛАГ „Майчин дом”, МФ, Катедра „Акушерство и гинекология”, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследването цели да се определи ролята на парвовирус В19 инфекция в развитието на анемичен синдром по време на бременност. Изследвани бяха 55 серумни проби, на бременни с диагностицирана анемия, постъпили за лечение в СБАЛАГ „Майчин дом”, София. Пациентките бяха на възраст от 16 до 44 години. Използвани бяха имуноензимни (ELISA IgM/IgG) и молекулярни (PCR) методи. Показатели на хомеостазата на желязото бяха определени с помощта на CLIA, AAS, NERN методи. При определяне на нивото на серумен хепсидин бе използван имуноензимен (ELISA) метод. Серологично доказателство за прясна В19V инфекция (наличие на специфични IgM с високи стойности) беше доказано при 7/55 (12.73%) бременни. Лабораторните маркери в комбинация със снетите анамнестични данни, в т.ч. контакт на инфектираните с деца с фебрилно-обривен синдром, наведоха към възможната етиологична роля на В19V в намаление нивото на серумното желязо по време на бременност. При 28/55 (50.91%) от изследваната група пациентки се доказва В19V-IgG серопозитивност. При 10/55 (18.18%) от пациентките беше открито наличие на В19V-ДНК, т.е. при 3/55 (5,45%) потвърждаването на В19V инфекция беше на базата на PCR анализ. Това може да се обясни с бързопреходен В19V-IgM отговор или възможно реплициране на вируса в кръвните депа на организма. Общо при 12.73 % от изследваните пациентки тестването за наличие на специфични IgM антитела и наличие на вирусна НК даде положителен резултат, което е доказателство за прясна инфекция. При десет (18,18%) от жени с доказана остра В19V инфекция установихме статистически значимо повишено ниво на серумен хепсидин ($65.3 \pm 5.7 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. При останалите пациентки анемията беше определена като желязо-дефицитна според ниските серумни нива на хепсидин $2.54 \pm 0.4 \mu\text{g/l}$, спрямо $25.9 \pm 2.8 \mu\text{g/l}$ определени като контрола при бременни без анемия. Оценката на честотата и степента на ангажиране на парвовирус В19 в развитието на анемичен синдром по време на бременност и определянето на серумното ниво на хепсидин би допринесло за етиологичното изясняване на възникналия анемичен синдром. От друга страна, повишените концентрации на хепсидин са противоположни за добавянето на желязо в случаи на възпаление или инфекция по време на бременност.

Научни публикации и прояви:

- Волева С, Иванова С, Манолов В, и др. Парвовирус В19 инфекция, асоциирана с анемичен синдром, при пациентки с рискова бременност. Медицински преглед. 2017;53:5-11
- Волева С, Манолов В, Иванова С, и др. Проучване ролята на парвовирус В19 в развитието на анемичен синдром и определяне на серумен хепсидин при жени с патологична и рискова бременност. Акушерство и гинекология 2017;56:9-10
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et. al. Anemic syndrome associated to parvovirus b19 infection in pathology pregnancy women. Science & Research 2017;1:1

- Voleva S, Manolov V, Angelova S, et. al. Parvovirus B19 changes iron homeostasis during pathological pregnancy. *Clinical Practice (Therapy)*. 2018;15:481-7
- Voleva S, Pavlova A, Genova-Kalou P, et. al. Infectious agents during pregnancy – preliminary study. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*, 2017;45(2):42-6.
- Волева С, Манолов В, Маринов Б, и др. Ангажираност на парвовирус В19 в развитието на анемичен синдром и определяне на серумен хепсидин при жени с патологична и рискова бременност. XIV-ти национален конгрес по акушерство и гинекология/VI-ти национален конгрес на акушерките, Пловдив, 26-29.10.2017
- Voleva S, Manolov V, Ivanova S, et. al. Role of parvovirus B19 in anemic syndrome during abnormal pregnancy. *IFCC WorldLab 2017. 23rd Int Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Durban, South Africa, 22-25 Oct 2017
- Voleva S, Manolov V, Ivanova S, et. al. Engagement of parvovirus B19 in the development of anemic syndrome in women with an abnormal pregnancy. *20th ESCV 2017 Annual meeting*, Italy, 13-16 Sep 2017
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et. al. Parvovirus B19 as a causative pathogen in a pathological pregnancy during 2015-2016 year in Bulgaria. *ICMS, Sofia, Bulgaria*, 11-14.05.2017
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et. al. Anemic syndrome associated to parvovirus B19 in pathology pregnancy women. *28th Int Conference*, St. Zagora, Bulgaria, 01-02.06.2017
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et. al. Anemia during pregnancy associated with Parvovirus B19 infections. *20th Jubilee Gynecologists Conference*. Borovetz, 16-18.03.2017,
- Voleva S, Ivanova St, Angelova Sv, et. al. Seroprevalence of parvovirus B19 in pathological pregnancy women. *XV national congress of clinical microbiology and infections*, Sofia, Bulgaria, 17-19.05. 2017
- Voleva S, Manolov V, Vasilev V, et. al. Hepcidin in pregnant women with parvovirus B19 infection. *Xth National Congress for Clinical Laboratory*. Borovetz, Bulgaria, 07-09.09.2017

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-125/02.05.2017 Роля на някои стресови хормони за възникването на метаболитни нарушения при пациенти с обезитет

Изследователски екип: Гл. ас. Ралица Николаева Робева, дм

- Доц. Атанаска Еленкова, дм
- Проф. Георги Георгиев, дм
- Д-р Бойка Милчева
- Д-р Семра Мустафа

Базова организация: МУ-София, МФ, Клиничен център по ендокринология и геронтология, УСБАЛЕ „Акад. Ив. Пенчев”, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Метаболитният синдром (МС) представлява съчетание от няколко взаимно свързани рискови фактори като обезитет, въглехидратни нарушения, артериална хипертония, дислипидемия, повишената съсирваемост на кръвта и субклинично възпаление, които в комбинация увеличават значително риска от развитие на

атеросклероза и захарен диабет тип 2. Затлъстяването е основен компонент при пациенти с МС, но не всички обезни индивиди развиват метаболитен синдром или захарен диабет тип 2 (ЗД2). Счита се, че натрупването на стресови фактори в съвременното общество и невъзможността за адаптация към тях може да окаже влияние за възникването на метаболитните отклонения при обезитет. Затова целта на настоящия проект беше да се уточни ролята на кортизоловата, катехоламиновата и серотониновата секреция в базални и динамични условия за възникването на метаболитни нарушения при болни със затлъстяване, както и да се проучат връзките между различните стресови хормони при пациенти с метаболитен синдром. За осъществяването на тези цели бяха изследвани метаболитните и хормонални показатели при 80 пациентки с наднормено тегло и обезитет, разпределени в три групи: пациентки без МС, болни с МС и болни с МС, усложнен със ЗД2. Резултатите показаха, че затлъстяването е по-изразено при понижаване на нивата на свободния уринен кортизол, сутрешния кортизол и серотониновите метаболити. Серотониновият метаболит 5-хидроксииндолацетна киселина показва положителна връзка с нивата на катехоламините метаболити. Ниските нива на уринните метанефрини бяха свързани с повишен риск от поява на въглехидратни нарушения при обезни жени. Пациентките със захарен диабет тип 2 се отличаваха с повишени нива на уринните норметанефрини, докато при жени без ЗД2 уринните норметанефрини корелираха значимо с липидния профил и кръвната захар след глюкозно натоварване. Тези данни сочат, че изчерпването на основните хормонални механизми за справяне със стреса при хронично затлъстяване, както и активирането на симпатиковата нервна система с повишена норадреналинова продукция са вероятни значими фактори за поява на въглехидратни усложнения и метаболитен синдром при жени.

Научни публикации и прояви:

- Робева Р. Милчева Б, Еленкова А, Захаријева С. Невро-ендокринни промени при метаболитен синдром. Ендокринология. 2017;22(4):173-8.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-126/02.05.2017 Връзка на някои интерлевкини с клиничната активност на тиреоид-асоцираната офталмопатия и потенциалната им роля в терапевтичния подход

Изследователски екип: Гл. ас. Александър Димитров Шинков, дм

- Проф. Русанка Ковачева, дм
- Проф. Георги Георгиев, дм
- Ас. Ралица Иванова
- Мария Стойнова, докторант

Базова организация: МУ-София, МФ, КЦЕГ, УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цели: да се определи клиничната ефективност на глюкокортикоиден режим за лечение на тиреоид-асоцирана офталмопатия (ТАО), да се сравнят нивата на интерлевкин-8 и интерлевкин-10 при ТАО, здрави контроли и лица с базедова болест без ТАО (ББ), да се проследят в хода на лечението на ТАО, да се потърси корелация с клиничната активност (CAS) и терапевтичния отговор. Бяха включени 31 лица с ТАО, 30

зdravi лица и 30 с ББ. Беше снета анамнеза, определи се тиреоидна функция и се изследваха плазмени IL-8 и IL-10. При лицата с ТАО се изследваха ТСХ-Р-Ат, определи се тежестта и CAS на ТАО и бяха попълнени въпросници за качество на живот. Беше приложен курс с метилпреднизолон, по три венозни апликации (пулса) по 500 мг, три последователни месеца и между тях по 125 мг мускулно седмично, общо 5500 мг. Проследиха се очен статус, IL-8, IL-10 на I, III месец, а ТСХ-Р-Ат, качество на живот и терапевтичен отговор – на III месец. Установи се значимо намаление на тежестта и CAS на ТАО (с 41%, 31-51, $p=0.006$). Пълнен терапевтичен отговор имаше при 42% от изследваните, частичен при 45% и липса на отговор при 13%. Повишиха се скоростите за качество на живот (всички $p<0.05$) и промяната им корелираше негативно с промяната на ТСХ-Р-Ат. Изходните нива на IL-8 бяха най-високи при ББ и най-ниски при здравите ($p=0.044$); тези на IL-10 – най-високи при здравите и най-ниски при ТАО ($p=0.024$). IL-8 беше най-висок при нон-респондерите, но малката бройка не позволява статистическа оценка. Релативната промяна на IL-8 и IL-10 след първия пулс беше съответно -10.3%, $p<0.001$ и -13.5%, $p=0.001$. Нито един от проследяваните показатели не корелираше с тютюнопушенето, възрастта или давността на заболяването. Прилаганият глюкокортикоиден режим демонстрира висока ефективност. Нивата на IL-8 и IL-10 се променят в хода на лечението, но за оценка на практическата им приложимост е необходимо допълнително проучване. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-127/02.05.2017 Витамин Д в спектъра на предиабетните състояния и сърдечно-съдовата автономна дисфункция

Изследователски екип: Гл. ас. Невена Янкова Чакърва, дм

- Проф. Цветалина Танкова, дмн
- Проф. Георги Георгиев, дм
- Доц. Илияна Борисова, дм
- Гл. ас. Грета Грозева-Дамянова, дм
- Гл. ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Ани Тодорова, докторант
- Мина Сердарова, докторант

Базова организация: МУ-София, МФ, Клиничен Център по Ендокринология и Геронтология, УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Настоящото проучване оценява витамин Д статуса при лица с нормален глюкозен толеранс (НмГТ) и предиабет (нарушена гликемия на гладно (НГГ), нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и комбинация от нарушена гликемия на гладно и нарушен глюкозен толеранс (НГГ+НГТ)) и връзката му със сърдечно-съдовата автономна функция и някои кардио-метаболитни рискови фактори. Включени са общо 174 лица на средна възраст 49.1 ± 12.9 години, със среден ИТМ 30.2 ± 6.2 кг/м². Участниците са разделени в 2 групи според глюкозния толеранс: 48 с НмГТ и 126 с предиабет, които са подразделени в подгрупи според предиабетна категория: 50 с НГГ, 25 с НГТ, и 51 с НГГ+НГТ. Глюкозният толеранс е оценен със стандартен ОГТТ. Измерени са: антропометрични показатели – ръст, тегло, обиколка на талия, изчислен е ИТМ, артериално налягане (АН),

плазмена глюкоза и имунореактивен инсулин на гладно и 120 минута, изчислен е НОМА-IR и НОМА-beta, HbA1c, липиди, креатинин, hsCRP, паратхормон, 25ОН витамин Д, витамин Д свързващ протеин (DBP), изчислена свободна фракция на витамин Д, общотелесната и висцералната мастна маса, тъканното натрупване на крайни продукти на гликирането (AGEs), сърдечно-съдовата автономна функция (САФ). Налице е висока честота на витамин Д дефицит в изследваната кохорта – 40.8%, независимо от глюкозния толеранс. Не се регистрират разлики във витамин Д статуса между групите с различна степен на глюкозен интолеранс, при значимо повишен паратхормон при предиабет. Лицата с витамин Д дефицит са с по-висок ИТМ, висцерална и общотелесна мастна маса, и сърдечна честота в покой (СЧп). DBP е по-нисък при нарушена САФ и метаболитен синдром и корелира негативно с възрастта и висцералното мастно натрупване; и позитивно с HDL-холестерол и парасимпатиковата сила. Обиколката на талия и парасимпатикова активност при дълбоко дишане определят 9% и компонентната променлива за мастна маса 8% от вариабилитета на DBP. 25ОН витамин Д корелира реципрочно с висцералната и общотелесната мастна маса, систолното и диастолното АН и AGEs. Висцерална мастна тъкан определя 4% от промяната в 25ОН витамин Д. СЧп и AGEs определят 7% от вариабилитета на свободната фракция на витамин Д. Установява се висока честота на витамин Д дефицит при предиабет и нарушена САФ. Витамин Д статусът корелира с АН, липидите, висцерално затлъстяване, AGEs, СЧ и парасимпатикова функция.

Научни публикации и прояви:

- Танкова Ц, Кирилов Г, Чакърова Н, Грозева Г, Димова Р. Показатели на витамин Д статус при лица с предиабет. Ендокринология

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-128/02.05.2017 Оценка на диагностичния подход и някои маркери на сърдечносъдов риск при първичен алдостеронизъм

Изследователски екип: Гл.ас. Йоанна Александрова Матрцова, дм

- Ас. Владимир Василев, дм
- Ас. Силвия Въндева, дм
- Росен Русев, докторант

Базова организация: МУ-София, Клиничен Център по Ендокринология и Геронтология, УСБАЛЕ „Ак.Иван Пенчев”, ул. Здраве 2, София 1303

РЕЗУЛТАТИ: Първичният алдостеронизъм (ПА) е най-честата ендокринна хипертония. До момента методите, използвани в диагнозата на ПА, са неоптимални по отношение на съчетанието надеждност, безопасност и цена. Заболяването е свързано с повишен сърдечно-съдов риск, като интерес представлява изследването на някои маркери, между които матриксна металопротеиназа-9 (ММ9) и галектин 3 са едни от най-слабо проучените. Да се изследва нов метод за диагноза на ПА (dexamethasone/captopril/valsartan test –DCVT- тест). Да се изследват нивата на ММ9 и галектин-3 при пациенти с ПА, контроли с есенциална хипертония (ЕХ) и здрави лица. Хормоналните измервания се осъществиха по радиоимунологичен метод. Галектин-3 и ММ9 се изследваха в кръвен серум по метода ELISA. Установи се висока чувствителност и специфичност на DCVT-

тест (sensitivity 87.50%, specificity 83.19%) при отлична поносимост от страна на пациентите. Не се установи статистически значима разлика в нивата на ММ9 между ПА и ЕХ (279.29 ± 109.63 vs 269.22 ± 1118.81 ng/ml, $p=0.865$), както и между ПА и здрави лица (279.29 ± 109.63 vs 279.68 ng/ml, $p=0.995$). Нямаше разлика в нивата на галектин между ПА и ЕХ (31.43 ± 8.43 vs 29.71 ± 3.87), както и между ПА и здрави лица (31.43 ± 8.43 vs 27.81 ± 2.33). По отношение на надеждността на DCVT- теста намерихме висока чувствителност и специфичност, което ни дава основание да го препоръчаме като допълнителен диагностичен подход при ПА. Не се потвърждава научната и практическата полза от изследване на ММ9 и галектин във връзка с изясняване на сърдечно-съдовия риск при ПА. Необходимо е търсене на други по чувствителни маркери в тази насока. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-129/02.05.2017 Възпалителни биомаркери при пациенти със синдром на Астма-ХОББ припокриване

Изследователски екип: Доц. Ваня Милошева Юрукова, дм

- Ас. Мирослав Михайлов, докторант
- Ас. Деница Димитрова, докторант
- Гл. ас. Дора Маринова, дм
- Гл. ас. Жулиета Христова-Димитрова, дм

Базова организация: МФ, Клиничен център по белодробни болести, МБАЛББ „Света София“, бул. Акад. Иван Гешов 19, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: *Цел и задачи:* Да се изследват плазмените нива на NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) и цитокини (IL-5, IL-6, IL-17), и асоциацията им с белодробната функция, бронходилататорния отговор и периферната еозинофилия при пациенти с астма (А), ХОББ и астма-ХОББ припокриване (АСО). *Материал и методи:* Изследвахме 81 пациента с бронхообструктивни заболявания извън екзацербация: А (n=26), ХОББ (n=25) и АСО (n=30). Определихме плазмените нива на NGAL, IL-5, IL-6, IL-17, IgE (ELISA) и еозинофилите в кръвта (Eo). Чрез стандартна спирометрия изследвахме дихателната функция и бронходилататорния отговор. *Резултати:* Нивата на NGAL бяха сигнификантно повишени при АСО (158.6 ng/ml) в сравнение с ХОББ (125.1 ng/ml) и А (53.5 ng/ml) ($p<0.05$). Не се установи връзка между NGAL и ограничение на въздушния поток при А, ХОББ и АСО (preFEV1/FVC) ($p>0.05$). Повишените нива на NGAL бяха в асоциация с позитивния бронходилататорен отговор (post FEV1/FVC < 70 % и FEV1 \geq 15% и \geq 400 ml или \geq 12% и \geq 200ml) ($p<0.05$) и Eo (Eo \geq 300/ μ l) ($p<0.05$) при АСО. Подобно, нивата на IL-6 бяха сигнификантно повишени при пациенти с АСО (26.94 pg/ml) в сравнение с ХОББ (3.25 pg/ml) и А (1.41 pg/ml) ($p<0.05$). Повишените нива на IL-6 съответстваха на високите нива на NGAL при АСО ($p<0.05$). Нивата на IL-5 бяха сигнификантно по-високи при БА (4.48 pg/ml) в сравнение ХОББ (2.62 pg/ml) и АСО (2.53 pg/ml) ($p<0.05$) и не показваха асоциация с нивата на NGAL при АСО. Аналогични са резултатите при изследване нивата на IL-17, които са сигнификантно по-високи нива при БА (21.90 pg/ml) в сравнение с ХОББ (6.94 pg/ml) и АСО (6.94 pg/ml) ($p<0.05$). Интересно, повишените плазмени нива на NGAL и IL-6 съответстваха на повишения брой екзацербации при АСО ($p<0.05$). *Заключение:* Плазмените нива на NGAL и IL-6 са

сигнификантно повишени при АСО и са в асоциация с периферната еозинофилия и с повишен брой екзацербации. Тези резултати предполагат, че NGAL и IL- 6 биха могли да бъдат полезен биомаркер и обещаващ кандидат за отдиференциране на пациенти с АСО от ХОББ и Астма.

Научни публикации и прояви:

- Михайлов М, Юркова В, Христова Ж, Димитрова Д, Маринова Д., Куртелова Н, Чернева Р. NGAL-потенциален биомаркер за отдиференциране на Астма-ХОББ припокриване (Asthma-COPD Overlap) от Астма и ХОББ. Торакална медицина, под печат. Торакална Медицина 2018;1(Suppl. 1)
- Михайлов М, Юркова В, Христова Ж, Димитрова Д, Маринова Д, Куртелова Н, Чернева Р. Неутрофилен желатиназа асоцииран липокалин (NGAL)-потенциален биомаркер за отдиференциране на Астма-ХОББ припокриване (Asthma-COPD Overlap) от Астма и ХОББ. 7ми конгрес на Българското дружество по белодробни болести, 18-21.10.2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-130/02.05.2017 Характеристика на генотипа и лекарствената резистентност на HBV при HIV/HBV коинфектирани пациенти

Изследователски екип: Доц. Ивайло Иванов Еленков, дм

- Д-р Андон Тимчев
- Д-р Тенчо Тенев
- Гл. ас. Елица Голкочева-Маркова, дб,
- Диляна Трандева-Банкова
- Доц. Ивайло Иванов, дб
- Ася Костадинова
- Ренета Димитрова, докторант
- Анна Ганчева

Базова организация: МУ – София, МФ, Катедрата по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, СБАЛИПБ „Проф. Иван Киров“, бул. Акад. Ив. Е. Гешов 17, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Проучванията върху носителството на HBV серологични маркери или наличие на HBV инфекция при новорегистрирани български HIV позитивни пациенти почти не са правени. Целите на настоящето научно изследване са: проследяване на HBV серологичния профил при HIV/HBV коинфектирани пациенти; проучване генотипното разнообразие на HBV при HIV/HBV коинфектирани; установяване на най-често възникващите HBV лекарствени мутанти. За изпълнение на така поставените цели кръвни серумни проби от HIV положителни пациенти бяха тествани за наличие на HBV маркери – HBsAg, анти-HBsAg, anti-HBc IgM и IgG, HBeAg и anti-HBe, чрез използване на имуоензимни методи (ELISA). Хепатит В вирусната концентрация беше измерена посредством real-time PCR. След изолиране на HBV DNA чрез nested PCR беше проведено генотипиране, а за определяне циркулацията на лекарствено резистентни мутации – секвениране. Изследвани са 191 HIV-положителни пациенти (новорегистрирани и такива на лечение) като от тях 172 (90%) са били отрицателни по отношение на HBsAg, а 19

(10%) са съответно положителни. Всички серумни проби положителни по отношение на HBsAg бяха подложени на молекулярно-биологичен анализ, като 17 (89%) дадоха положителен резултат за наличие на HBV DNA. При 2 (11%) от 19 новорегистрирани HIV позитивни се отчита наличие както на серологични маркери типични за остра HBV инфекция, така и на вирусна DNA (HBsAg+/HBcIgM+/HBeAg+/HBV DNA+). По отношение на anti-HBc, само при 5 (29%) се доказват антитела от клас IgM (HBsAg+/HBcIgM+/HBV DNA+), а при 12 (71%) този маркер липсва. Същите резултати са получени и по отношение на HBeAg. При проучване маркерите за отминала HBV инфекция се установява наличие на anti-HBc тотал при 69 (40%) HIVпозитивни HBsAg отрицателни лица, като при 2 (13%) от тях се доказва наличие и на HBV DNA. При 41 (52%) от HIV позитивните HBsAg-/anti-HBc+ лица се доказва наличие на anti-HBs, маркер за преминала с оздравява HBV инфекция. Доказано е преобладаване на генотип D на HBV при HIV/HBV ко-инфектирани. Синтезиран е ампликон за провеждане на секвениране с цел установяване на лекарствено резистентни мутации при HBV.

Научни публикации и прояви:

- Голкочева-Маркова Е, Трандева-Банкова Д, Тенев Т, и др. Маркери за отминала хепатит В вирусна инфекция при HIV-позитивни лица. Национална Научна Конференция по HIV и Коинфекции, 01 - 02 декември 2017, София
- Голкочева-Маркова Е, Тимчев А, Трандева-Банкова Д, и др. Серологично проучване на хепатитни маркери при новодиагностицирани HIV/AIDS положителни пациенти. 16 Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите, 10-12 май 2018, София

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ “ГРАНТ’ 2016”

Договор 39/2016 Проучване влиянието на включените и изключени лекарствени продукти от Позитивния лекарствен списък върху достъпа и публичните разходи

Изследователски екип: Доц. Александра Цветанова Савова, дф

- Доц. Маноела Манова-Овчарова, дф
- Проф. Николай Данчев, дм
- Боряна Видева-Зидарова - НСЦРЛП
- Мария Василева - НСЦРЛП
- Зорница Спасова-Миткова, дф

Базова организация: Катедра „Организация и икономика на фармацията“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проучването е анализ на промените в референтната стойност за Дефинирана Дневна Доза (ДДД) във всички фармакотерапевтични групи на Приложение 1 и Приложение 2, в които са включени нови продукти, или са изключени един или повече лекарствени продукти за периода 01.01.2015 - 31.12.2015 година. Също така са проучени и

причините, водещи до съответната промяна в референтната стойност за ДДД. След включването на лекарства в Позитивния Лекарствен Списък (ПЛС) се наблюдават различни промени. Основната причина, водеща до намаляване на референтната стойност за ДДД, е промяната на цената на лекарствен продукт в групата (72,22% в Приложение 1 и 57,14% в Приложение 2). Друга причина е включването на нови търговски марки (27,78% в Приложение 1 и 42,86% в Приложение 2) в ПЛС на по-ниски цени (например референтен продукт). В групите, от които се изключват лекарствени продукти се наблюдават различни промени. Броят на продуктите с повишение в референтната стойност е по-малък. Основните причини, водещи до намаление на референтната стойност за ДДД са промените в цената на друг продукт в групата, или включването на лекарства на по-ниски цени. Първи генерик е включен към 7 INN в Приложение 1 и в Приложение 2. Крайният резултат е намаление на референтната стойност за ДДД. През 2015 в ПЛС са включени по-голям брой продукти, отколкото са изключени. Общият брой на лекарствата, чиято референтна стойност за ДДД намалява, е най-голям в рамките на годината. По-малък е броя на лекарствата с непроменена референтна стойност. Като цяло резултатите от проучването показват, че и в двете групи включени и изключени лекарства, водещият фактор за намаляване на референтната стойност за ДДД през 2015, е промяна на цената на лекарствен продукт в групата. Резултатите потвърждават, че динамичните промени в ПЛС и цените на лекарствените продукти са разнообразни и противоречиви, но като цяло водят до увеличаване на наличността и достъпността на реимбурсираните лекарствени продукти.

Научни публикации и прояви:

- Mitkova Z, Manova M, Vasileva M, et al. Influence of regulatory measures and market policy for reimbursed medicinal products on the value, paid with public funds in Bulgaria in 2015. World J Pharmacy Pharmaceut Sci. 2017; 6(6): 19-31.
- Savova A, Z Mitkova, B Zidarova, et al. Analysis of the changes in reference value, paid with public funds after exclusion of medicinal products from positive drug list. VI-ти Конгрес по фармация с международно участие, гр. Сандански, България. 13-16 Октомври 2016

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 42/2016 Проучване на качеството на живот, амбулаторната терапия на пациенти с редки заболявания в България и на техния достъп до лечение и до фармацевтично обслужване

Изследователски екип: Гл. ас. Мария Стефанова Камушева, дф

- Доц. Миглена Кирилова-Донева, дбм
- Доц. Александра Савова, дф,
- Гл. Ас. Мария Димитрова, дф

Базова организация: Катедра „Организация и икономика на фармацията”, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Разработен е 7-стъпков план за прилагане на фармацевтични грижи (ФГ) за пациенти с муковисцидоза. Приложението на ФГ би гарантирало подобряване качеството на живот и отлагане на усложненията, което следва да осигури спестявания. Проведеното

пилотно проучване сред 35 пациенти с редки заболявания (РБ) демонстрира адекватен физически и финансов достъп до лечение и удовлетвореност от фармацевтичното обслужване. Нивото на доверие към магистър-фармацевтите остава ниско, което обуславя необходимостта от информиране на обществото относно ролята на фармацевтите и доказване ползата от прилагане на фармацевтични грижи. Проучено е мнението на магистър-фармацевтите относно имплементирането на ФГ за пациенти с РБ в България. Магистър-фармацевтите са най-достъпните здравни специалисти, които имат необходимите знания и желание да участват ефективно в цялостната грижа за пациентите с РБ. Възможностите за имплементиране на ФГ са провеждането на продължаващи обучения сред фармацевтите и оптимизирането на работата в аптеката с насоченост към индивидуализирана грижа за пациента. Оценено е качеството на живот на пациенти с акромегалия и синдром на Кушинг. По-ниски стойности по показателите жизненост, енергичност и уморямост и общо здравно състояние са при болните със синдром на Кушинг. Разходите за лекарствена терапия са високи и това поставя сериозни въпроси пред възможностите на аптеките за осигуряване на необходимите количества регулярно. Остойностени са разходите за едногодишна терапия на синдрома на Schnitzler. Разходите не са високи, но лечението е само симптоматично, което излага на повишен риск от усложнения. Българските пациенти със синдром на Schnitzler нямат физически и финансов достъп до Anakinra. Проведеният анализ на разходите за лечение на мукополизахаридоза II определя относително малка финансова тежест на заболяването като не се очаква значителното им увеличение за следващите 3 години. Анализът на употребата на медицински изделия за редки заболявания в България показват, че НЗОК заплаща медицински изделия само за пациенти с булозна епидермолиза. Директните разходи са относително ниски като очакванията са за незначителното им нарастване в близките 3 години.

Научни публикации и прояви:

- Камушева М, Донеv С, Кирилова-Донева М и др. Разходи за лечение на синдрома на Schnitzler в България. Редки болести и лекарства сираци 2017; 8(1): 3-6.
- Kirilova-Doneva M, Kamusheva M, Petrova G и кол. A new case of Syndrome of Schnitzler – case study. Acta Med Bulg 2018;(2):58-62.
- Камушева М, Петкова В, Димитрова М и кол. Разработване на план за фармацевтична грижа за пациенти с муковисцидоза, 7-ма Национална конференция за редки болести и лекарства сираци. Пловдив. 09-10 септември 2016; 138.
- Камушева М, Донеv С, Кирилова-Донева М, и др. Разходи за лечение на синдрома на Schnitzler в България, 7-ма Национална конференция за редки болести и лекарства сираци. гр. Пловдив. 09-10 септември 2016; 139.
- Kamusheva M, Doneva M, Dimitrova M et al. Cost analysis of therapy with Idursulfase for Hunter syndrome in Bulgaria, ISPOR 19th Annual Eur Congress. Vienna, Austria. 30.10.- 02.11.2016. A586
- Kamusheva M, Doneva M, Dimitrova M, et al. Cost analysis for medical devices for rare diseases in Bulgaria – a case with epidermolysis bullosa. ISPOR 22nd Annual Int Meeting. Boston, USA, May 20-24, 2017.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 43/2016 Проучване на безопасността и ефикасността на лекарства за лечение на редки заболявания – систематичен преглед и мета анализ

Изследователски екип: Доц. Константин Василев Митов, доктор

- Доц. Асена Стоименова, дф
- Доц. Миглена Кирилова-Донева, дбм
- Гл.ас. Мария Камушева, дф
- Гл.ас. Мария Димитрова, дф

Базова организация: Катедра „Организация и икономика на фармацията”, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Позитивният лекарствен списък (ПЛС), Приложение 1 е сравнен със списъка на лекарствените продукти за редки заболявания в Европа. Определени са директните разходи за терапия, платени от НЗОК за всяко INN, за 2013, 2014 и 2015 и са екстраполирани за следващите 3 години. В ПЛС са включени 7 лекарствени продукти за редки заболявания от 85 (8,2%) от част I и 21 от 132 (15,9%) от част II от списъците на ЕМА. Общите разходи за всички ЛП са 122 003 521 евро (6,2% от бюджета за Приложение 1). Очакваните промени на разходите за следващите 3 години са съответно приблизително 60, 70 и 80 милиона евро. Достъпът до ЛП за редки заболявания в България е ограничен като брой от всички реимбурсирани продукти. Директните разходи, платени от НЗОК, са високи за българската здравна система и очакванията са за увеличаване на разходите в близко бъдеще. Включването на генрични ЛП може да доведе до ограничаване на разходите поради прилагане на вътрешното референтно ценообразуване в България. Проведен е систематичен литературен преглед за идентифициране на всички публикувани клинични изпитвания с лекарства сираци Idursulfase, Sapropterin и Pasireotide. Приложен е набор от статистически методи за извършване на мета-анализ и сравнение на пропорциите. Фиксиран ефект е приложен при пациенти, лекувани с Idursulfase, за НЛР уртикария ($P = .3459$, 6,81%) и сериозни нежелани лекарствени реакции ($P = .0619$, 21,27%) и при пациенти, лекувани със Sapropterin, .2264, 29, 237%). Случайният ефект е взет предвид при данните за ефективността на Pasireotide и процентът на пациентите с контролирани нива на урина без кортизол (UFC) е 44,81%. Резултатите от теста за хетерогенност показва, че следва да се приложат резултатите за случаен ефект (random effect) за процента на лекуваните с Pasireotide пациенти с гадене ($P = .2675$, 51,936%), хипергликемия ($P = .0504$, 43,268%) и диария ($P = .3221$, 58,299%).

Научни публикации и прояви:

- Kamusheva M, Mitov K, Doneva M et al. Efficacy and safety of reimbursed orphan medicines in Bulgaria – systematic review and meta-analysis (Part I). J Pharmaceut Res Int 2017;1795):1-14.
- Kamusheva M, Doneva M, Dimitrova M, et al. Annual cost analysis for medicinal products for rare diseases in Bulgaria. ISPOR 19th Annual Eur Congress. Vienna, Austria. 30.10. - 02.11.2016

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 59/2016 Създаване на стандартен модел за манипулативна техника в практическото обучение по сестрински и акушерски грижи

Изследователски екип: Проф. Галина Стамова Чанева, дм

- Доц. Мария Димитрова, дм
- Доц. Пепа Бикова-Иванова, дм
- Доц. Антоанета Терзиева, дм
- Доц. Надка Василева, дм
- Доц. Деляна Хаджиделева, дм
- Антоанета Димитрова
- Кристиян Герасимов

Базова организация: Катедра „Здравни грижи“, ул. Бяло море 8, София, 1527,

РЕЗУЛТАТИ: Резултатите от анкетните проучвания на преподавателите и студентите относно проблемите на практическото обучение по сестрински и акушерски грижи показват необходимостта от промяна на традиционния модел за усвояване на знания и умения. Разработеният стандартен модел за манипулативна техника включва следните основни етапа: теоретична подготовка, контрол на теоретичната подготовка, нагледно представяне на инжекционната техника от преподавателя, упражняване на инжекционната техника от студента и последен етап – оценяване, което включва самооценка на студента и обобщена оценка, която се формулира на основата на теоретичните знания и практичните умения. Дейностите и участието на преподавателите и студентите са формулирани на основата на отделните етапи на стандартния модел. Резултатите от проведената експертна оценка на „Стандартния модел за манипулативна техника“ показват, че всички експерти определят модела като възможност за повишаване качеството и ефективността на практическото обучение на студентите от специалност „медицинска сестра“ и „акушерка“. Според експертите моделът поставя акцент върху основните елементи на процеса на практическото обучение и определя отговорностите на преподавателите и студентите. Тестовото оценяване също се определя като важна предпоставка за добрата теоретична подготовка на студентите. Експертите оценяват високо използването на електронна платформа, в случая Moodle за да се съхранява информацията, свързана с учебното съдържание от една страна и от друга – студентите да имат достъп за самоподготовка и самооценяване. Подготвени са 10 теми, които са свързани с лекарствената терапия. В рамките на проекта преподавателският екип структурира учебното съдържание, тестовете и нагледни те материали по съответните теми за учебно-практическите занятия. Създадената платформа за дистанционно обучение на студентите от Факултета по Обществено здраве на Медицински университет – София беше използвана за да стартира електронната система Moodle. Проведено беше обучение и инструкция на преподавателите за работа със системата.

Научни публикации и прояви:

- Димитрова М, П Бикова, Д Хаджиделева, и др. Проблеми и затруднения на студентите при усвояване на инжекционната техника. Здраве и наука, бр. 2, 2017
- Чанева Г, М Димитрова, А Терзиева, и др. Въвеждане на модел за инжекционна техника в процеса на обучение. Сестринско дело, бр. 2, 2017
- Димитрова М, Н Василева, С Георгиева, и др. Проблеми в обучението на студентите при изграждане на умения за инжекционна техника. Сестринско дело, бр. 2, 2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ “ГРАНТ” 2017”

Договор Д-76/02.05.2017 Трудови злополуки и сменен режим на работа.

Биомаркери за стрес в слюнка

Изследователски екип: Проф. Емил Влайков Воденичаров, дм

- Доц. Константин Митов, дф
- Доц. Бисера Атанасова, дм
- Д-р Анелия Димитрова-Каменова
- Ирена Иванова, дм
- Д-р Влайко Воденичаров
- Д-р Слава Джонева
- Диана Димитрова

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по „Хигиена, медицинска екология и хранене“, София 1431, ул Здраве 2

РЕЗУЛТАТИ: Цел на изследването е проучване на нивата на нивата на кортизол и цинк в слюнка при сменна работа. Изследвани бяха общо 40 здрави (31 мъже и 9 жени), на средна възраст 37 ± 9 г., на посменна работа. На всички бяха взети по две проби слюнка в специализирани контейнери – Salivette: първа проба между 9 и 11ч. и втора – 15-17ч. Във всяка проба слюнка бяха измерени кортизол и цинк. Кортизолът в слюнка бе определен чрез ензим-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), Cortisol Saliva EUROIMMUN, Lot E180228AS. Нивата на цинк в слюнката бяха измерени чрез пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия на AAnalyst 400. Данните са статистически обработени с програмата MED CALC. Установени бяха следните стойности представени като $\text{mean}\pm\text{SD}$ (min-max): кортизол 1 – $3,47\pm 2,47$ ng/mL (0.50-8.48) и кортизол 2 – $1,58\pm 1,01$ ng/mL (0.3-4.3); цинк 1 – $1,43\pm 0,57$ $\mu\text{mol/L}$ (0.74-2.81) и цинк 2 – $1,49\pm 0,67$ $\mu\text{mol/L}$ (0.41-3.14). Значима разлика в концентрациите на кортизол и цинк в слюнката не бе установена между половете. Значима разлика бе установена в нивата на кортизол в слюнката между първата и втората проба ($p=0.003$), като по-високи стойности се измериха сутринта. Такава разлика не се установи при цинка ($p=0.953$). Слаба положителна корелация бе намерена между нивата на кортизол и цинк между двете проби слюнка ($r=0.383$; $r=0.446$). При първото замерване на кортизола броят на лицата с кортизол в референтен интервал е бил 69,2%, а при второто – 92,3%. Проучването е едно от първите, които изучава нивата на кортизол и цинк в слюнката като маркери за стрес сред служители заети в машиностроенето в България. Установената слаба положителна корелация в стойностите на показателите между сутрешните и следобедните проби слюнка, вероятно характеризира техният физиологичен ритъм. Подобно на кръвните нива, стойностите на кортизол в слюнката сутрин са значимо по-високи. По-високият брой на лицата с наднормени нива на кортизол в слюнката от сутрешната проба вероятно е резултат от факторите на работната среда и посменната работа.

Научни публикации и прояви:

- Vodenicharov V, Ivanova I, Atanasova B. Occupational stress among welders in Bulgaria, Acta morphologica, 25, 2018

- Ivanova I, Vodenicharov V, Atanasova B. Study of salivary levels of zinc in healthy, Acta morphologica, 25, 2018

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-82/02.05.2017 Оценка на безопасността на херниалните платна чрез изследване на механичната им съвместимост с тъканите и качеството на живот на пациентите

Изследователски екип: Доц. Миглена Георгиева Кирилова-Донева, дбм

- Проф. Генка Петрова-Ташкова, дфн
- Гл. ас. Мария Камушева, дф

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра Организация и икономика на фармацията, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия проект е да се оцени безопасността на често употребявани в практиката херниални платна чрез изследване на механичната им съвместимост с тъканите и качеството на живот на пациентите. Използвани се експерименти на опън и релаксация за определяне на механичните характеристики на платната Microval, Vupro и TiO₂mesh, престояли във буфер за 70 дни. Определени са изменението на еластичността и свиваемостта им и се установи, че има разлика в механичните свойства след престой в буферна среда. MicroVal намалява еластичността си и се удължава в направление L2. TiO₂Mesh се удължава с 10-20% според направлението, но няма съществени изменения в еластичността, а Vupro II се свива в двете направления, като в направление L2 се къса при 7% деформация. Механичните свойства на три стандартни (Surgimesh® , Surgipro™ , TecnoMesh®) и пет леки платна (Optilene®, TiO₂Mesh™, Parietex™, Vupro™ II, Ultrapro™) бяха сравнени с механичните свойства на човешка фасция. Резултатите показват, че най-близки до нея еластични свойства имат Parietex и Vupro™ II. TiO₂Mesh и Ultrapro™ показват най-близка деформируемост до деформируемостта на фасцията при 16 N/cm. Само Vupro™ II по ортотропност се доближава до ортотропността на фасцията. Качеството на живот на 68 пациенти с имплантирани леки (TiO₂) и стандартни платна (Microval, Parietene, Surgimesh, Surgipro) беше оценено с анкета EQ5D. Оценено е общото физическо състояние един ден и три месеца след операцията. Резултатите показват, че три месеца след операцията пациентите нямат проблеми с двигателната активност, самообслужване и обичайни дейности, а само наличие на болка. 24.5% от пациентите изпитват лека болка и 20.3% - силна болка. Няма статистически значима разлика в нивото на болката според използваното платно, но в групата с имплантирани стандартни платна пациентите изпитващи силна болка са повече – 23.53% спрямо 16.67%. Пациентите оценяват самостоятелно състоянието си след операцията използвайки скала от 100 точки. В края на изследвания период те оценяват състоянието си като много добро - средният брой точки е 82.24.

Научни публикации и прояви:

- Донева М, Камушева М, Петрова Г и др, Методи за оценка на качество на живот при пациенти оперирани от херния. Социална медицина. 2017;2-3:37-9.
- Донева М, Сопотенски С, Герасимов Н и др. Качество на живот при конвенционална операция от херния, Обща медицина, 2018;2:48-52.

- Doneva M, Pashkouleva D. Comparison Study of the Viscoelastic Properties of Light and Heavy Hernia Meshes. *Innov Biomed Technol Health Care (IBTHC)* 2017;1(1):9-13.
- Doneva M, Pashkouleva D. Practical recommendations for application of hernia meshes. *Series on Biomechanics*. 2017;31(2):34-40.
- Kirilova-Doneva M, Pashkouleva D. Investigation of mechanical compatibility of hernia meshes and human abdominal fascia, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2018;29(2):147-158
- Kirilova-Doneva M, Pashkouleva D, Kamusheva M, et al. Investigation of the long-term viscoelastic mechanical properties of hernia meshes, 44 ESAO congress, Vienna, 6-9. 09.2017

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-104/02.05.2017 Изследване на субективното възприятие за качество на трудовия живот на работещи в здравеопазването

Изследователски екип: Доц. Янка Петкова Проданова, дм

- Проф. Невена Цачева-Христова, дмн
- Проф. Каролина Любомирова, дм
- Доц. Ружа Николова, дм
- Доц. Милена Янчева-Стойчева, дм
- Доц. Тодор Кундуржиев, дм
- Гл. Ас. Милена Табанска-Петкова, дм
- Гл. Ас. Ива Митева, дм
- Ас. Лидия Христова, дм
- Ас. Марина Самунева
- Галя Трайкова, докторант
- Цонка Иванова, докторант
- Мартина Худякова, докторант

Базова организация: МУ-София, Факултет по обществено здраве, Катедра „Трудова медицина“, ул. Бяло море 8, София, 1527

РЕЗУЛТАТИ: Проектът има за цел да проучи и анализира субективното възприятие за качество на трудовия живот на работещи в здравеопазването с оглед подобряване на мотивацията им за работа. Направи се обширно теоретично изследване на концепцията за качество на трудовия живот (QWL). Проучиха се използваните методи за измерване на субективното възприятие за QWL. Проведе се анкетно изследване чрез адаптиран и валидиран собствен въпросник за измерване на качеството на трудов живот на работещи в лечебни заведения. Валидността на адаптирания въпросник е 0.966. Изследвани са 510 работещи в 8 лечебни заведения – различни по вид дейност, собственост и численост. Анализирани са демографските характеристики на участниците. Определено е QWL. Направени са: анализ на субективното възприятие за QWL; връзка на социално-демографските показатели с оценката на QWL; фаворитизиране и класиране на критериите на база субективната оценка; корелационен анализ за изследване на връзката между QWL и количествените променливи и степента на съвпадение между максимално

възможната оценка и оценката в момента на анкетирането. Идентифицирани са основните проблемни области и е разработен модел за управление на QWL сферата на здравеопазването чрез предложена програма. Резултатите показаха, че е необходимо да се работи в посока подобряване на QWL. Установено е, че QWL на база групиране на общата оценка (скор) е на добро ниво сред 43.33% от респондентите. Само 2.3% от работещите в изследваните лечебни заведения имат отлично QWL. Проблемните области на QWL, изискващи намеса са „Възнаграждение“, „Професионална кариера“ и „Социални придобивки“. В теоретичен план, получените резултати допринасят за по-доброто познаване на концепцията, а в практически план – те обезпечават заинтересованите с инструмент за повишаване мотивацията и удовлетвореността на работещите в здравеопазването.

Научни публикации и прояви:

- Кундуржиев Т, Проданова Я. Клъстерен анализ на субективното възприятие на качеството на трудов живот на работещи в сферата на здравеопазването. Здравна политика и мениджмънт. 2017;17(4):27-31.
- Проданова Я, Кундуржиев Т, Цачева Н, и др. Общо ниво на качество на трудов живот на работещи в сферата на здравеопазването. Здравна политика и мениджмънт. 2018;18(1):23-7.
- Проданова Я, Кундуржиев Т, Янчева-Стойчева М. Сравнение качеството на трудов живот и неговите компоненти при работещи в здравеопазването. Трудова медицина и работоспособност. 2018;(1):42-99.
- Проданова Я, Кундуржиев Т, Янчева-Стойчева М. Перевод, адаптация и валидация анкеты о качестве трудовой жизни А. П. Егоршина работающих в медицинских учреждениях. Наука и Мир. 2018;2(54):41-5.
- Prodanova Y, Kundurzhiev T, Yancheva-Stoycheva M, et al. Study of the Quality of working life at the level of criteria and its relation with some demographic characteristics of the workers in healthcare organizations in Bulgaria. Easter Academic J 2018;(2):1-13.
- Kundurzhiev TG, Prodanova YP. Demographic factors for the quality of working life of healthcare workers in Bulgaria. Int J Adv Res. 2018;6(4)
- Проданова Я. Качество на трудовия живот. Факултет по обществено здраве, София, 2018
- Проданова Я, Кундуржиев Т, Янчева-Стойчева М, и др. Изследване на субективното възприятие за качество на трудовия живот на работещи в здравеопазването. Факултет по обществено здраве, София, 2018, 208 с.
- Кундуржиев Т, Проданова Я. Основни измерения на качеството на трудов живот и връзката им с демографските характеристики при работещи в здравеопазването. 40 научно-технологична сесия, Контакт 2017, „Интердисциплинарна идея в действие“. София. 27.10.2017
- Prodanova Y, Yancheva-Stoycheva M, Kundurzhiev T, et al. Subjective perception of the Quality of working life of healthcare workers: results from a pilot study. Int conference of public health “From European to National Health Policy”. Sofia, Bulgaria. 9-10 Oct 2017

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-105/02.05.2017 Създаване на симулационна лаборатория по интравенозна терапия

Изследователски екип: Доц. Пепа Рашкова Бикова-Иванова, дм

- Проф. Галина Чанева, дм
- Проф. Иванка Стамболова, дм
- Доц. Антоанета Терзиева, дм
- Доц. Деляна Хаджиделева, дм
- Доц. Надка Василева, дм
- Доц. Мария Димитрова, дм
- Гл. ас. Петя Кантарева, дм
- Гл. ас. Стефка Георгиева, дм
- Димитрина Йорданова, докторант
- Ас. Таня Ангелова
- Камелия Богданова, докторант
- Таня Попова, докторант
- Анушка Димитрова, докторант
- Надя Манолова
- Ас. Боряна Симеонова, дм
- Илиана Соколова
- Милослава Илиева, докторант
- Антоанета Димитрова
- Иванка Милотинова
- Ралица Герасимова, студент
- Ева Ангелова, студент

Базова организация: МУ-София, ФОЗ, Катедра "Здравни грижи", ул. 'Бяло Море' 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Съществена част в практическото обучение на медицински сестри и акушерки заема интравенозната терапия. Значението на инфузионната терапия се състои в това, че тя намира широко приложение в медицинската практика като ценно животоспасяващо средство /след тежки операции, травми, отравяния, изгаряния и др./. За постигане на целта на изследването изграждане на практически умения, клиничното мислене и професионалното поведение на студентите от специалност „медицинска сестра“ и „акушерка“ по отношение на подготовката, техниката и превенцията на усложненията при провеждане на интравенозна терапия беше създадена и оборудвана „Симулационна лаборатория по интравенозна терапия“ в практичния кабинет в УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“. Лабораторията е оборудвана и обзаведена с мулажи и консумативи за интравенозна терапия и видеозаснемане. Разработени бяха 50 на брой ситуационни задачи от преподавателския екип, насочени към вземане на професионално решение. Чрез използване на социологическия метод се проведеха две анкетни проучвания на включените в проекта студенти – 350 от специалност „медицинска сестра“ и 90 от специалност „акушерка“ – преди участието в симулационното обучение и след това. По препоръка на 81,82% от анкетираните студенти беше изработен „Наръчник за интравенозна терапия“ след анализ на научната литература по темата. Повече от половината от студентите – 65,91% отговарят положително – „да, напълно“ по отношение

придобиването на допълнителни практически умения в симуляционната лаборатория. Значителна част от студентите – 59,77% посочват, че са напълно удовлетворени от придобитите способности за справяне с усложненията при интравенозна терапия. Практическото обучение на студентите от специалност „медицинска сестра“ и „акушерка“ в симуляционни лабораторни условия повишава ефективността на учебния процес. Студентите считат, че обучението им в симуляционна лаборатория по интравенозна терапия е довело до значително повишаване на теоретични знания и усвояване на практически умения. Удовлетвореността на студентите е значително по-голяма от обучението в симуляционна лаборатория отколко в практичен кабинет. Това от своя страна води до по-пълноценното включване на студентите в дейностите по интравенозна терапия по време на клинична практика.

Научни публикации и прояви:

- Хаджиделева Д, Соколова И, Трайчева Б и др. Усвояване на професионални компетенции от студентите относно интравенозната терапия. Здраве и наука. 2018;2
- Бикова П, Димитрова М, Василева Н и др. Удовлетвореност на студентите от обучение в симуляционна лаборатория за интравенозна терапия. Здравни грижи. 2018;2
- Чанева Г, Терзиева А, Богданова К и др. Симуляционна лаборатория по интравенозна терапия – иновативен метод на обучение. Сестринско дело. 2018;2

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-106/02.05.2017 Въвеждане на обучение по биоетика в съвременните училища – фактор за здравословен стил на живот на подрастващото поколение

Изследователски екип: Проф. Антония Йорданова Янакиева, дм

- Доц. Александрина Воденичарова, дм
- Доц. Кристина Попова, дм
- Гл. ас. Антония Трендафилова, дм

Базова организация: МУ – София, Факултет по обществено здраве, Катедра по здравна политика и мениджмънт, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проекта е да съдейства и реализира обучение по биоетика сред деца и юноши на база етичните принципи в Универсалната Декларация на ЮНЕСКО по Биоетика и Права на Човека. Проектът прилага методологията и Първата програма, създадена от Европейския център по биоетика при Италианската секция на Департамента на ЮНЕСКО. Проведен е курс за обучение на учители от училища в София в различни възрастови групи – от 3 до 18 години и на преподаватели от Факултета по обществено здраве с основни методи: лекции, семинари, анализ на публикации и казуси, симуляционни игри, кръгла маса и работа в малки групи. Предоставени са книги и професионални съвети по биоетика. Успешно преминалите курса получиха сертификат, гарантиращ че са придобили необходимите знания и умения за успешна професионална реализация като учители по Биоетика в Българската образователна система. Участниците в курса са анкетирани за тяхното мнение и предложения за въвеждане на обучение по биоетика в учебните програми на училищата и за необходимите учебни пособия.

Анкетираните са на възраст между 23 и 51 години и среден преподавателски стаж 10 години. 50% от тях са учители в началното училище, има преподаватели по биология, хигиена и екология, здравно образование, химия, музика, история и икономика. Анкетираните посочват като най-голяма полза от обучението факта, че учениците се обучават в методите за прилагане на биоетичните принципи, за активно участие в дискусии и вземане на решения /80%/. Две трети считат, че въвеждането на биоетично обучение е необходимо, една трета изтъкват обаче наличие на затруднения при въвеждането на учебната програма. 60% от учителите смятат, че програмата по биоетика е подходяща за всички деца до 18 годишна възраст. Една пета от тях посочват като най-подходяща възрастта от 7 до 14 години.

Всички учители считат, че курсът подпомага преподавателската им дейност, дава насоки за нов поглед на преподаване и изразяват желание за продължаване на обучението си по биоетика.

Научни публикации и прояви:

- Yanakieva A, A Vodenitcharova, K Popova, et al: Implementing of education in bioethics at contemporary schools – factor for a healthy lifestyle of the growing up generation. *J of IMAB*. 2019;25(1):2362-8
- Vodenicharova A. Introducing bioethics training in contemporary schools - a factor of healthy lifestyle of young people. World Bioethics Day 2017. MU-Sofia, Oct 19, 2017

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-107/02.05.2017 Концептуален модел за измерване на безопасността като елемент от качеството на медицинските дейности

Изследователски екип: Проф. Златица Георгиева Петрова, дм

- Елисавета Петрова-Джеретто, докторант

Базова организация: Медицински университет София, Факултет по обществено здраве, Катедра „Здравна политика и мениджмънт“, ул. Бяло море 8, София

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проучването бе да се оцени степента на реакцията на медицинския персонал/пациентите и начина на решаване на проблемите възникнали след регистрацията на инцидент и/или медицинска грешка, както и вида на тези реакции в аспекта на описваните в литературата като „култура на обвинение“ и „култура на доверие“. Да се анализират нагласи на медицинските специалисти за безопасността като елемент на качеството на медицинските дейности. Да се направи оценка на подхода при анализа на проблемите, до колко той е персонален или системен. Да се направи оценка до колко проблемът, свързан с безопасността на пациентите, се дискутира достатъчно на различни нива в обществото. Да се предложи концептуален модел за измерване на безопасността, като елемент на качеството и контрол на качеството и безопасността на медицинските услуги, базирано на оценка на риска. Обект на проучването е отношението на медицинския персонал (лекари, медицински сестри/акушерки) и на пациентите към проблема за безопасността на пациентите в 5 многопрофилни болнични лечебни заведения за активно лечение, от които две университетски, две областни и едно частно болнично лечебно заведение. Лечебните заведения са разпределени в четири областни градове: Стара Загора -2, Варна, Бургас, Кърджали. Признаците на проучването са

количествени и качествени и са свързани с различни групи характеристики: безопасност на пациентите, сериозни лекарствени реакции, медицински грешки, последствия от сериозен инцидент и др. В него са участвали 121 лекари и 174 специалисти по здравни грижи (медицински сестри), пациенти-157. Анкетите са разработени в ИАМО, а проучването е осъществено от изследователския екип. За обработката на данните са използвани математико-статистически методи – алтернативен и вариационен и графичен анализи. Проучването е извършено от май до декември 2017 г. в сътрудничество с ръководствата на избраните болници. Изводите потвърждават нашата хипотеза, че независимо от съществуващите и действащи правила за осигуряване на безопасността на лечение, в лечебните заведения за болнична помощ се допускат медицински грешки от различен вид. В лечебните заведения за болнична помощ понастоящем преобладава „култура на обвинение”, страх от наказания, както и „персонален подход” при анализа на медицинските грешки. Друга част от изводите третират причините за допуснатите медицински грешки, пропуски, неудачи и неблагоприятия. Счита се, че основно те се дължат на: претовареност на медицинския персонал, недостатъчността на такъв, недостатъчна квалификация, влошена комуникация и организационни причини, т.е. системен характер на пропуските и неудачите. Потвърдена е и третата ни хипотеза, според която проблемът, свързан с безопасността на пациентите, не се дискутира достатъчно на различни нива в обществото (болница, медия, парламент). Понастоящем се дискутира въпроса и неточно се използва термина „лекарска грешка”, което води до напрежение както сред лекарското съсловие, така и в обществото и създава неоправдан негативизъм към една от най-хуманните професии. Изграждането на система за безопасност на пациентите е дълъг и продължителен процес, който ще отнеме време и ще засегне не само лечебните заведения, но и всички други участници в здравеопазването. Но процесът за оценка на качеството и осигуряване безопасността на пациентите е на дневен ред в редица страни по света и България не може да остане встрани от тях. Предложеният модел, насочен към намаляване на нивото на медицинските грешки и подобряване на безопасността на пациентите в лечебните заведения, изисква лидерство, въвличане и ангажираност на топ мениджърите, установяване на такава организационна култура, която да мотивира персонала да възприема грешките като неизбежни от процесите и като възможност за подобрения. Структурата на модела предполага следните етапи: Използване на системния подход при анализа на медицинските грешки и на тази база - прецизиране на терминологията. Класификация на сериозните събития/медицински грешки; Разработване на индикатори за измерване на безопасността на пациентите; Система за отчитане на медицинските грешки; Разширяване на научните изследвания в областта на безопасността на пациентите и медицинските грешки; Като част от практиката в лечебните заведения за осигуряване на безопасността на пациентите и контрол на качеството от оторизирани структури, да се прилага инструментариума на риск мениджмънта; Обучение на персонала на лечебното заведение, в областта на контрола на качеството.

Научни публикации и прояви:

- Петрова З, Костов И. Концептуален модел за изграждане на система за безопасност на пациентите. Сп. “Здравна политика и мениджмънт“, 2018;2
- Цанкова М, Петрова З, Джеретто Е. Управление на медицинския риск в акушеро гинекологичната практика, Сп. Здравна политика и мениджмънт 2018;2

- Петрова З, Джеретто Е, Гилова А. Управление на риска в медицинската практика. Дължимо поведение на медицинските специалисти“. Сп. Здравна политика и мениджмънт 2017;17(4):32-38

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-108/02.05.2017 Съдържание на флавоноиди и общи феноли в български храни и структурирането на данните в единен информационен регистър

Изследователски екип: Проф. Вихрен Николаев Петков, дм

- Проф. Фанка Рибарова, дб
- Доц. Силвия Савова, дх
- Доц. инж. Стефан Великов
- Славейка Панева

Базова организация: Медицински университет - София, Медицински колеж „Йорданка Филаретова“, София, ул. Йорданка Филаретова 3

РЕЗУЛТАТИ: Разработването на настоящия проект има за цел реализиране на информационен ресурс за съдържание на биоактивни съединения - флавоноиди и общи феноли в български храни, който да осигури коректното им използване в нутрициологията, медицината, фармацията и хранителните технологии, както и да позволи предоставяне на данни в международните мрежи за обмяна на научна информация, касаеща състава на храните. Резултатите от извършеното проучване включват: Задълбочена научна аргументация за необходимостта от база данни за състав на храните при спазване на конкретните съвременни изисквания за всички етапи от методологичния процес: идентификация, пробонабиране, анализ, изчислителни подходи и представяне на данните; Данни за историческото развитие на познанието за база-данни за състава на храните, до етапа на създаване на мрежи за обмяна на данни на международно ниво. Характеристика на флавоноидите като биологично-активни съединения в храните, подпомагащи здравето на организма. Внедряване на валидирани аналитични методи за определяне на общи феноли, общи флавоноиди и спектъра на флавоноидния състав, с предоставяне на съответните параметри за качество на анализа за всеки използван аналитичен метод (чувствителност, точност, възпроизводимост и неопределеност). Изградени са таблици за съдържанието на изследваните показатели (6 класа, 15 вида флавоноиди и общифеноли) в български 25 плодове (2636 проби), обхващащи 29 страници и 33 зеленчуци (467 проби), обхващащи 36 страници. Предоставена е сравнителна оценка между стойностите в нашата база данни със съответните от други бази данни на международно ниво (USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods – Nutrient Data Laboratory). Разработен е информационен модел за многократно и многоцелево използване на предоставената в таблиците информация. Извършеното проучване предоставя за първи път собствени база данни за съдържанието на флавоноиди и общо фенолно съдържание в български храни, което е от особено значение за изграждането на здравословно, превантивно и лечебно хранене на българската популация. Предоставените данни са от значение и за идентификацията на биоразнообразието сред плодовете и зеленчуците, отглеждани у нас –необходима информация за икономиката и търговията, осигуряващи здравословни храни.

Научни публикации и прояви:

- Tsanova-Savova S, S Velikov, V Petkov. The Flavonoids Composition of Bulgarian Foods – Comparison with USDA Database, Bulg Chem Commun 2018;50(Spec Issue C):286-92.
- Великов С, Ф Рибарова. Информационни системи в науката за храните, Здраве и Наука, Инфодент-БГ, 2018
- Цанова-Савова С, Великов С, Рибарова Ф. Съдържание на флавоноиди и общи феноли в български храни. База данни, Студио Кам, 2018
- Tsanova-Savova S, Velikov S, V Petkov. The Flavonoids Composition of Bulgarian Foods – Comparison with USDA Database, Ist Int Conference on Bioantioxidants Sofia, 25-29 Sep 2017.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

КОНКУРС „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2016“

МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2016“

Договор 1-Д/2016 Молекулни характеристики на *von Hippel-Lindau* синдром при български пациенти

Докторант: Мария Цанева Глушкова

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн и Доц. Албена Тодорва-Георгиева, дбн

Базова организация: Катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: С работата по настоящата научна разработка екипът успешно въведе и оптимизира предварително подбрани молекулярно-генетични техники за диагностика на *VHL* гена, включващи секвенционен анализ за търсене на точкови мутации и MLPA анализ за детекция на големи делеции/дупликации, при подбрана група български пациенти с предполагаема клинична диагноза *von Hippel-Lindau syndrome (VHL)*. Прицелната група от 10 български пациенти беше клинично добре охарактеризирана. Проведените молекулярно-генетични изследвания показаха наличието на 5 мутации във *VHL* гена. Една от тях е комплексно мутационно събитие, което представлява първото по рода си генетично преобразуване от този тип и не е описано до момента в световната литературата. Мутацията комбинира в себе си дупликация и *indel*. С изясняване на мутационния спектър на анализирания *VHL* ген при български пациенти ще се допринесе за обогатяване на мутационната база данни в световен мащаб. Генотип-фенотипните корелации при *VHL* пациенти са трудни за интерпретиране, поради изключително разнородната проява на заболяването, представляваща комбинация от много различни клинични характеристики. Необходимо е генотипът да бъде внимателно охарактеризиран, за да се потвърди или отхвърли поставената клиничната диагноза. Поради това, провеждането на молекулярно-генетичен анализ и последващо генетично консултиране, с подробно тълкуване на получените резултати от генетичните изследвания в хода на пренатална и постнаталната диагностика, са от изключителна важност за засегнатите пациенти и техните семейства. Навременното диагностициране на *VHL* би могло да подобри превенцията на заболяването и успешното лечение на злокачествените образувания. Ранната детекция и премахването на туморните образувания би могла да предотврати или минимизира развитието на неврологични симптоми, загуба на слух, загуба на зрение и нуждата от бъбречна заместителна терапия.

Научни публикации и прояви:

- Glushkova M, Dimova P, Yordanova I, et al. Molecular-genetic diagnostics of *von Hippel-Lindau syndrome (VHL)* in Bulgaria: first complex mutation event in the *VHL* gene. *Int J Neurosci* 2018;128(2):117-24.

- Glushkova M, Yordanova I, Todorov T, Todorova A, Mitev V. A novel frameshift mutation in Bulgarian patient with von Hippel-Lindau syndrome. Eur J Hum Genet 2016, E-P12.104. Barcelona, Spain, May 21-24, 2016.

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 2-Д/2016 Алгоритъм за установяване на резистентност към макролиди при *STREPTOCOCCUS PYOGENES* в български клинични изолати

Докторант: Адиле Акифова Мухтарова

Научен ръководител: Доц. Райна Гергова, дм

Базова организация: Катедра по медицинска микробиология

РЕЗУЛТАТИ: Целта на това проучване е да се установи наличието на резистентност към важна група антимикробни средства - макролиди, представляващи първи терапевтичен избор за лечение на стрептококови инфекции при пациенти с пеницилинова алергия или неуспешно инициално лечение с бета-лактам. За изпълнение на целта са използвани дисково-дифузионен метод на Кърби-Бауер, Е-тест за определяне на минимални инхибиращи концентрации (MIC), разработени по проекта конвенционален и мултиплекс PCR за определяне на гени за резистентност. Получени резултати показват, че около 23% от щамове изолирани през 2013-2014 и близо 40% от изолираните през 2015-2016 притежават гени за резистентност. Преобладаващият ген за резистентност към макролиди в български щамове GAS е *mef(A)*, а наличието на гена *erm(B)* води до най-високите нива на резистентност с MIC > 256 при изолатите GAS, които го притежават. Освен това, наличието на *erm(B)* винаги се свързва с потенциална резистентност (индуцируем или конститутивен) и към клиндамицин. За първи път в България, чрез използване комбинация от две групи методи генотипни и фенотипни, се доказва висок процент на резистентност на български щамове GAS към макролиди. Тези данни показват тенденция за увеличаване на макролидната резистентност през последните години, което е свързано с необходимостта от по-прецизното им използване като емпирична терапия при стрептококови инфекции.

Научни публикации и прояви:

- Muhtarova A, Gergova R, Mitov I. Distribution of macrolide resistance mechanisms in Bulgarian clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* during the years of 2013–2016. J Glob Antimicrob Resist. 2017; 10: 238-242.
- Мухтарова А, А Стайкова, Б Борисова, и др. Нова проблематична резистентност в български изолати *Streptococcus pyogenes*. Юбилейна Научна Конференция за преподаватели, студенти и специализанти по здравни грижи с международно участие „10 години специалност „Медицински лаборант” в медицински Колеж - Стара Загора” 2016, 20-21 октомври, Ст. Загора, Сборник с доклади, стр.38-41.
- Мухтарова А, Р Гергова, И Митов Проучване механизмите на макролидна резистентност в български клинични изолати *Streptococcus pyogenes* с помощта на

съвременни молекулярно-генетични методи. „Молекулярната биология - нови хоризонти”. Втори Докторантски симпозиум. София, БАН, 6–7 април 2017

Оценки по скалата на СМН:

ОТЛИЧНА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 5-Д/2016 Количествен PCR в реално време на хромозомни микроаберации, открити при пациенти с комплексни епилептични синдроми чрез микрочипова технология

Докторант: Валентина Любенова Пейчева

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Доц. Радка Кънева, дб

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия

РЕЗУЛТАТИ: Съществуват синдромни състояния, при които епилепсията е част от сложен фенотип, където освен пристъпи се наблюдават и умствено изоставане, разстройства от аутистичния спектър, задръжка в развитието на речта, структурно-мозъчни аномалии, както и общи и/или лицеви дисморфизми. Освен точкови мутации в един или няколко гена, като причина за тези състояния са промени в броя копия (Copy Number Variations- CNVs) на фрагменти от ДНК с различен размер, засягащи един или множество гени. В рамките на предишен изследователски проект нашия екип проведе микрочипов анализ при пациенти със сложен невро-психологичен фенотип, като в 6 от тях бяха намерени потенциално патогенни хромозомни микроаберации. В рамките на настоящия проект, чрез метода на количествен PCR в реално време бяха потвърдени намерените аберации- 3 делеции и 3 дупликации, при 6 пациента от нашата кохорта. Настоящото проучване доведе до потвърждение на предполагаемата диагноза при двама пациента, определяне на генетичната диагноза при един пациент, откриване на потенциалната причина за част от симптоматиката при двама пациенти, както и потенциална асоциация на една аберация с клиничните характеристики на един пациент. Всичко това допринесе за прецизирането на диагнозата при изследваната група и подобряване на генетичното консултиране при рисковите семейства с цел по-точно определяне на риска от развитие на синдром при бъдещи бременности.

Научни публикации и прояви:

- Peucheva V, Kamnarova K, Ivanova N, et al. Chromosomal microarray analysis of Bulgarian patients with epilepsy and intellectual disability. *Gene*. 2018; 667: 45-55.
- Пейчева В, Иванова Н, Каменарова К, и др. Молекулярно генетични и геномни изследвания при пациенти с идиопатична генерализирана епилепсия и комплексни епилептични синдроми“. Национална конференция по Детска Неврология, Психиатрия и Психология на Развитието, София, 20-22 Октомври, 2016, 45-46.
- Peucheva V, Kamnarova K, Ivanova N, et al. Microdeletions and duplications as genetic cause of neurodevelopmental disorders in Bulgarian patients. *The Eur Human Genetics Conference*, Copenhagen, Denmark, May 27–30, 2017

Оценки по скалата на СМН:

ОТЛИЧНА - за извършената научноизследователска дейност;

***ВИСОКА** - за приноса за оформяне на дисертационния труд;*
***ВИСОКА** - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.*

Договор 8-Д/2016 Секвениране чрез синтез от ново поколение при селектирани пациенти с различни характеристики на вродени аномалии на бъбреците и отделителната система (ВАБОС)

Докторант: Валентин Мартинов Пенчев

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия

РЕЗУЛТАТИ: Кистите на бъбреците са една от най-честите малформации в пренаталния и постнаталния период от развитието на човек. Тези случаи често се асоциират с развиването на хронична бъбречна недостатъчност и бъбречна недостатъчност в крайна фаза, което води до значителна смъртност. Благодарение на множеството проведени проучвания през последните години в различни популации и етнически групи бе показана ролята на множество генетични фактори в патогенезата. За сега са идентифицирани над 70 гена, които участват във формирането на кисти и други патологии в бъбреците. Част от тях участват в правилната органогенеза на бъбреците и отделителната система, а други формират и обуславят функционирането на цилията. Резултатите от осъщественото проучване демонстрират хетерогенността на вродените аномалии на бъбреците и отделителната система и особено на случаите с комбинирани патологии на други органи или системи. Намерените дефекти в *PKD2* и *SIX2* гените показват ползата от прилагането на мощни молекулярно-генетични технологии като НГС. В допълнение се откриха редица други варианти в други гени (напр. *NOTCH2*, *PKHD1*), които най-вероятно изпълняват модифицираща функция. Това може допълнително да обясни разнообразните прояви на ВАБОС. Резултатите ще помогнат за по-адекватното диагностициране и консултиране на пациентите и техните семейства.

Оценки по скалата на СМН:

***ДОБРА** - за извършената научноизследователска дейност;*

***ВИСОКА** - за приноса за оформяне на дисертационния труд;*

***ВИСОКА** - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.*

Договор 11-Д/2016 Експресионен анализ на Toll-like receptor 2(TLR2), Toll-like receptor 4(TLR4) и Toll-like receptor 7(TLR7) при пациенти с хроничен гноен отит и хроничен риносинусит

Докторант: Стоян Иванов Димитров

Научен ръководител: Проф. Спиридон Годоров, дм

Базова организация: Катедра по ушни, носни и гърлени болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“

РЕЗУЛТАТИ: Нивата на експресия на *TLR2* и *TLR4* по отделно не могат надеждно да разграничат пациентите с CRS от здравите контроли. Комбинирането им има потенциал да

разграничи пациентите от контролите като получихме чувствителност от 80% и специфичност от 66.7%. Експресионните нива на *TLR2* и *TLR4* могат надеждно да разграничат пациентите с CRS с полипи от тези без полипи. Комбинирането им не подобрява диагностичната точност. Нивата на експресия на *TLR2* и *TLR4* по отделно, както и в комбинация не могат надеждно да разграничат пациентите с COM от здравите контроли. Нивата на експресия на *TLR2* и *TLR4* по отделно разграничават надеждно пациентите с CRS от пациентите с COM. Необходимо е получените резултати да бъдат потвърдени в по-голяма анализирана група от пациенти и контроли.

Оценки по скалата на СМН:

ЗАДОВОЛИТЕЛНА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 12-Д/2016 Експресионен анализ на разширен панел от избрани хипоксични микро РНКи при пациенти, диагностицирани с рак на ларинкса в тъкани и плазмени проби

Докторант: Силва Гаро Гилагосян

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Доц. Радка Кънева, дб

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия

РЕЗУЛТАТИ: Ларингеалния карцином заема 2.4% от всички злокачествени заболявания в световен мащаб. Въпреки иновативните методи за лечение на рак на ларинкса, като радио и химиотерапия, и подходите при хирургична намеса, 5-годишната преживяемост остава 64%, непроменена пред последните десетилетия. Това налага въвеждането на потенциални биомаркери, в т.ч и неинвазивни, които да имат отношение в медико-биологичната и клинична практика при рак на ларинкса. През последните години микро РНКте се доказаха като потенциални биомаркери. Ние анализирахме нивата на експресия на miR-221-3p и miR-424-5p, чиято активност се влияе от хипоксията и имат отношение към процесите на ангиогенеза. Експресионните нива на miR-221-3p и miR-424-5p бяха анализирани в тъканен ларингеален и плазмен материал при 20 пациента. miR-424-5p може да разграничи туморна от нормална ларингеална тъкан с 70% чувствителност и 65% специфичност (AUC=0.695, p=0.035; 95%CI:0.530-0.860). В комбинация двете микро РНКи показаха по-високи разграничителни стойности: 90% чувствителност и 60% специфичност (AUC=0.785, p=0.002; 95%CI:0.642-0.928). При анализ на микро РНКте като неинвазивни маркери при пациенти с рак на ларинкса ние получихме следните данни: miR-221-3p разграничава болни от здрави пациенти с 80% чувствителност и 71.4% специфичност (AUC=0.814, p=0.001; 95%CI:0.685-0.943), miR-424-5p разграничава болни с рак на ларинкса от здрави контроли с 81% чувствителност и 50% специфичност (AUC=0.643, p=0.118; 95%CI:0.472-0.814). В комбинация двата маркера имат по-високи разграничителни стойности: 90.5% чувствителност и 75% специфичност (AUC=0.855, p=0.0001; 95%CI: 0.735-0.974). В заключение, ние може да докладваме, че комбинацията на двете микро РНКи: miR-424-5p и miR-221-3p може да послужи като потенциален биомаркер за разграничаване както на ларингеална туморна тъкан от нормална, така и на болни пациенти с рак на ларинкса от здрави контроли. Получените резултати могат да

послужат за разработването на нови проекти, които да потвърдят първоначалните резултати.

Научни публикации и прояви:

- Giragosyan S, G Stancheva, T Popov, et al. Involvement of miR424-5p and miR-221-3p in tumour metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. ESHG 2017, Copenhagen, Denmark
- Giragosyan S, G Stancheva, T Popov, et al. miR-221-3p and miR-424-5p may act as non-invasive biomarkers in detection of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. MDSC 2017, Pleven Bulgaria

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 13-Д/2016 Невропротективна и антиоксидантна активност на новосинтезирани С-8 заместени с арилпиперазинов фрагмент кофеинови производни при различни модели на токсичност *in vitro*

Докторант: Маг. фарм. Александра Викторова Касабова-Ангелова

Научни ръководители: Доц. Вирджиния Цанкова, дф и Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф

Базова организация: Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология

РЕЗУЛТАТИ: В настоящото проучване е проследена възможната невропротективна и антиоксидантна активност на новосинтезирани С-8 заместени с арилпиперазинов фрагмент кофеинови производни при различни модели на токсичност *in vitro*. Въз основа на проведените експерименти върху невробластомната клетъчна линия SH-SY5Y и изолираните плъщи мозъчни синаптозоми, се установява, че веществото 4d е с най-слаб невротоксичен ефект. В условията на 6-ОНДА-индуциран оксидативен стрес на клетъчно и суб-клетъчно ниво, 4d проявява най-изявени невропротективен и антиоксидантни ефекти. 4d, в концентрация 1 μ M, показва и най-изявен инхибиторен ефект върху активността на човешки рекомбинантен МАОВ ензим. Тези ефекти най-вероятно са свързани с високата способност за свързване на свободните радикални от свободната и силно активна метокси група на 4-то място в арилпиперазиновия фрагмент.

Научни публикации и прояви:

- Kondeva-Burdina M, V Tzankova, A Kasabova, et al. Evaluation of the Neuroprotective Effects of Biologically Active Substances from Natural and Synthetic origin. VIth Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, Oct 13-16, 2016: 28
- Angelov B, Kasabova A, Kondeva-Burdina M, et al. In vitro effects of newly caffeine derivatives on isolated rat synaptosomes. 7th Global Experts Meeting on Neuropharmacology, Milan, Italy, Jul 31-Aug 02, 2017

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 14-Д/2016 Пренилирани ацилфлороглуциноли от *Hypericum olympicum* L. - изолиране, структурно охарактеризиране и фармакологично изпитване за антинеопластична активност

Докторант: Яна Емилова Илиева

Научени ръководители: Доц. Параскев Недялков, дф и Проф. Георги Момеков, дф

Базова организация: Катедра по Фармакогнозия, Катедра по Фармакология, токсикология и фармакотерапия, ул. Дунав 2, 1000 София

РЕЗУЛТАТИ: Дихлорметанов екстракт от *Hypericum olympicum* L. беше разработен и четири полипренилирани ацилфлороглуцинола бяха изолирани. Структурите им бяха установени с помощта на спектрални методи (мас- и ЯМР спектроскопия). Две от веществата се оказаха известните съединения олимпицин А и хиперибин J/хиперполифилирин. Един от ацилфлороглуцинолите е познато и неописано природно съединение (вещество Pa1). Четвъртото съединение се оказа нов природен продукт и беше наименован олимпифорин А. Както се очакваше, всички вещества проявиха цитотоксична активност върху група туморни линии при ниски микромолярни концентрации като IC₅₀ варираше в границите 1.15 - 24.94 μM. Изследваните вещества, с изключение на съединението Pa1, проявиха по-специфичен инхибиторен ефект върху туморните клетъчни линии и селективно по-слаб ефект върху нетуморигенна клетъчна линия. Туморна клетъчна линия, която притежава множествена лекарствена резистентност се оказа по-чувствителна към всички съединения с изключение на хиперибин J/хиперполифилирин в сравнение с хемосензитивната родителска линия. Доказа се, че изследваните ацилфлороглуциноли потискат пролиферацията на съдови ендотелни клетки (ангиогенезата) при микромолярни концентрации. С помощта на протеинов имуоблот се установи активиране на прокаспаза 9 в една от изследваните линии. Следователно механизмът медиращ цитотоксичността на олимпицин А, хиперибин J/хиперполифилирин и олимпифорин А е апоптогенен, с рекрутиране на вътрешния (митохондриален) сигнален път на програмираната клетъчна смърт. Резултатите са поредния пример за перспективността на полипренилираните ацилфлороглуциноли (ППАФ) като водещи структури за получаването на антинеопластични агенти с плеiotропно действие.

Научни публикации и прояви:

- Пиева Y, P Nedialkov, G Momekov. Major cytotoxic acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum* L. VI-ти конгрес по фармация, Сандански, България 13-16.10.2016, p53

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 15-Д/2016 Изследване на нестероидни противовъзпалителни лекарства за противовирусна активност

Докторант: Любомир Трифонов Маринов

Научен ръководител: Доц. Ирина Николова, дм и Проф. Николай Данчев, дм

Базова организация: Катедра „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Нестероидни противовъзпалителни продукти (диклофенак, метамизол, мелоксикам, лорноксикам, кетопрофен, декскетопрофен) бяха изследвани за потенциални антивирални ефекти. Първоначално беше определена максималната нетоксична концентрации (МНК) и цитотоксична концентрация 50 (CC₅₀) на изследваните лекарствени продукти чрез влиянието на различни концентрации върху преживяемостта на клетъчна линия MDBK, чрез МТТ-тест. Получените стойности за МНК показват, че най-висока токсичност проявява метамизол - 2,73 mg/ml, следван от кетопрофен- 0,729 mg/ml, декскетопрофен- 0,560 mg/ml, диклофенак- 0,141 mg/ml, мелоксикам- 0,070 mg/ml. Най-слабо токсичен е лорноксикам със стойност за CC₅₀-0,0125 mg/ml. Беше определено и влиянието на НСПВс върху репликацията на човешки херпесен вирус тип 1, щам F използвайки модифициран МТТ-тест по метод на Reed-Muench. Веществата бяха приложени в концентрации, отговарящи на тяхната МНК и падащи двукратни разреждания. Експерименталните данни при прилагане на веществата в МНК показват добре изразена протекция (30-40%) от страна на кетопрофен, декскетопрофен, метамизол, мелоксикам и Неодолпаса. Протекцията, проявена от диклофенак и лорноксикам е незначителна (6-7%). Беше изследвано и влиянието на препаратите върху извънклетъчните вириони чрез директен контактен метод. Нито един от изследваните продукти не проявява вирусцидно действие. Изследваните НСПВс проявяват различна по степен цитотоксичност, най-изразена при метамизол (2,73 mg/ml), следван от кетопрофен (0,729 mg/ml), декскетопрофен (0,560 mg/ml), диклофенак (0,141 mg/ml), мелоксикам (0,070 mg/ml и лорноксикам (0,0125 mg/ml). Декскетопрофен, кетопрофен, метамизол, неодолпаса и мелоксикам проявяват добре изразена протекция спрямо HSV-1, щам F репликация. Изследваните НСПВс не проявяват вирусцидна активност.

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 16-Д/2016 Изследване на ацетилхолинестеразна и бутирилхолинестеразна активност на хибридни съединения между Галантамин и 4-аминопиридина

Докторант: маг. фарм. Иванка Иванова Костадинова

Научен ръководител: Проф. Николай Данчев, дм и Доц. Ирина Николова, дм

Базова организация за изпълнение на проекта: Катедра „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Изследваните съединения бяха синтезирани по утвърдена схема. Новосинтезираните съединения бяха охарактеризирани чрез точки на топене, тънкослойна

хроматография и ЯМР-спектри. С помощта на МТТ-тест беше установено влиянието на съединенията върху виталността на три клетъчни линии- HepG2, Neuro-2a и bv-173. IC50 стойностите на съединения 1, 2, 3, 4 и 5 върху клетъчна линия bv-173 след 72-я час са съответно 3, 10, 7, 25, 16 μM . IC50 стойностите на съединения 1, 2, 3, 4 и 5 върху клетъчна линия Neuro2a след 72-я час са съответно 22, 14, 14, 84, 44 μM . IC50 стойностите на съединения 1, 2, 3, 4 и 5 върху клетъчна линия HepG2 след 72-я час са съответно 107, 80, 118, 117, 102 μM . Инхибиращата активност на съединенията върху ензимите ацетилхолинестераза и бутирилхолинестераза беше определена по спектрофотометричния метод на Ellman, 1961. Инхибиращата активност на изследваните съединения е различна и варира в зависимост от типа на ензима. Най-активно е съединение 6 с ацетилхолин- и бутирилхолинестеразна инхибираща активност респективно 77,5% и 47,5%. Предполагаме, че съединения 4 и 6 показват по-значима ацетилхолин-и бутирилхолинестеразна инхибираща активност в сравнение с другите съединения заради наличието на галантамин в структурата им.

Научни публикации и прояви:

- Kostadinova, N. Danchev, I. Nikolova, et al. Investigation of in vitro inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity by hybrid compounds composed of Galantamine and 4-aminopyridine. VIth Congress of Pharmacy. Oct 13–16, 2016 Sandanski, Bulgaria
- Kostadinova, N. Danchev, I. Nikolova, D. Zheleva-Dimitrova, L. Vezenkov, Investigation of in vitro inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity by hybrid compounds composed of Galantamine and 4-aminopyridine. The 13th Int Conference on Alzheimer's and Parkinson's disease, Vienna, Austria, 29.03-02.04.2017

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2017“

Договор Д-131/02.05.2017 Молекулярно-генетичен анализ на TSC2 гена при български пациенти с Туберозна склероза

Докторант: Мария Цанева Глушкова

Научен ръководител: Акад. Ваньо Митев, дм, дбн, Проф. Албена Тодорва-Георгиева, дбн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимияр ул. Здраве 2, гр. София 1463

РЕЗУЛТАТИ: С работата по настоящата научна разработка екипът успешно въведе и оптимизира предварително подбрани молекулярно-генетични техники за диагностика на TSC2 гена, включващи секвенционен анализ за търсене на точкови мутации и MLPA анализ за детекция на големи делеции/дупликации, при подбрана група български пациенти с предполагаема клинична диагноза Туберозна склероза. Настоящото проучване представлява първата стъпка по посока на молекулярно-генетичното охарактеризиране на Туберозна склероза при български пациенти. Клиничната диагноза беше потвърдена на молекулно ниво при 11 от 21 пациента (52%) анализирана прицелна група. При четирима пациенти бяха открити нови TSC2 мутации, непубликувани в световната литература, от които две frameshift, една nonsense и една голяма делеция на 16 екзона. В допълнение бяха открити 7 описвани в литературата мутации в TSC2 гена. Откритите варианти в TSC2 гена в нашата група са missense (36% при 4/11), frameshift (27% при 3/11), nonsense (18% при 2/11) мутации, една splice site мутация (10%) и една голяма делеция (10%). В изследваната прицелна група с Туберозна склероза клиничната изява е изключително хетерогенна, което не даде възможност да се извлече ясна генотип-фенотипна корелация. Констатирана беше тежка антисипация в част от засегнатите семейства.

Ранната детекция на мутации в TSC2 гена и навременната терапия, включваща прилагането на mTOR инхибитори, би подпомогнала лечението на заболяването при засегнатите пациенти и техните семейства.

Научни публикации и прояви:

- Glushkova M, Bojinova V, Koleva M, et al. Molecular-genetic diagnostics of Tuberous sclerosis complex (TSC) in Bulgaria: six novel mutations in the TSC1 and TSC2 genes. J Genet. 2018;97(2):419-27.

Оценки по скалата на СМН

ОТЛИЧНА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-133/02.05.2017 Проучване на способността на 4-метокси производни на салицилалдехидбензоилхидразон (SBH) да повлиява системи, генериращи активни форми на кислорода и анализ на връзката структура-действие чрез раманова спектроскопия

Докторант: Надя Георгиева Христова-Авакумова

Научен ръководител: Доц. Вера Хаджимитова, дбф

Базова организация: Катедра медицинска физика и биофизика, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Хидразоните са органични съединения известни с изключителната си широкоспектърност по отношение на проявената биологична активност. Целта на проучването е да се осъществи сравнително изследване на антиоксидантните свойства на новосинтезирани 4-метокси SBH производни и да се намери връзка структура-антиоксидантна активност чрез Раманов спектрален анализ. Бяха използвани хемилуминесцентни и спектрофотометрични моделни системи, което позволи да се отдиференцира ефектът на взаимодействие на хидразоните с АФК от влиянието на начина на регистрация. Установена беше способност за намаляване на количеството на активни форми на кислорода (H_2O_2 и $\text{O}_2^{\bullet-}$). Въпреки способността на 4-метокси хидразоните да прихващат $\text{O}_2^{\bullet-}$ при тяхното генериране в система от KO_2 , при процеси на хипоксия-реперфузия, тестваните съединения биха могли да потенцират оксидативните увреждания. 4mShBH повлиява в най-голяма степен хемилуминесцентните системи за генериране на $\text{O}_2^{\bullet-}$ и може да се очаква да повлиява в най-голяма степен процесите свързани с генерирането на различни реактивни кислородни метаболити в техния начален етап. Анализът на Рамановите спектри показва мигриране на местоположението на максимума на ивицата между 1500 и 1600 cm^{-1} като най-ниски са енергиите на 4mShBH и 4mSBH, последвани от SBH и 4mSIH. Това поведение кореспондира с резултатите получени в система NBT-хидразони. В този ред нараства хемилуминесцентния отговор на веществата в експериментите, включващи ензимната реакция ксантин- ксантинооксидаза.

Научни публикации и прояви:

- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Traykov T, et al. 4-methoxy aroylhydrazones - promising agents protecting biologically relevant molecules from free radical damage. Bulg Chem Commun 2018;50(issue C):332-7
- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Traykov T, et al. 4-methoxy aroylhydrazones - promising agents protecting biologically relevant molecules from free radical damage. Ist Int Conference on Bio-antioxidants (ICBA2017), Sofia, Bulgaria, 25 – 29 Jun 2017

Оценки по скалата на СМН

ОТЛИЧНА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-134/02.05.2017 Изследване на връзката между артериалната ригидност и някои циркулиращи маркери на сърдечно-съдовия риск у лица от различни възрастови категории

Докторант: Рене Димитрова Милева-Попова

Научен ръководител: Доц. Нина Белова, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по физиология, ул. Здраве 2, 1431 София

РЕЗУЛТАТИ: Изследвани бяха 30 клинично-здрави лица от две възрастови категории – 20 години (20г) и 50 години (50г), които дадоха информирано съгласие за участие в

проучването. Всички изследвани лица бяха подложени на активна ортостатична проба (ОП), която включваше три периода с продължителност пет минути – изходен в легнало положение, активно изправяне и възстановяван (легнало положение). В края на всеки от опитните петминутни периоди беше прилагана апланационна тонометрия за оценка на състоянието на артериалната стена на централните еластични артерии. Беше регистриран и ЕКГ запис за анализ на вариабилността на сърдечната честота (ВСЧ). В клиничната лаборатория на Александровска болница бяха изследвани метаболитните маркери – глюкоза на гладно, липиден профил, високочувствителен С-реактивен протеин, хомоцистеин и пикочна киселина. Бяха намерени съществени промени в показателите на артериалната ригидност у лицата от групата 50 г. Изходно – значимо по-високо систолно (122 ± 6 у 50 г. срещу 96 ± 3 mm Hg у 20 г.) и пулсово налягане (44 ± 4 у 50 г. срещу 30 ± 3 mm Hg у 20 г.) в аортата, по-високи стойности на индексите на усилване. Достоверни разлики бяха установени и в хемодинамичния отговор на ОП. Отговорът на активното изправяне в групата 50г беше недостатъчно ефективен – аортното систолно и пулсово налягане спадаха значително, аортното диастолно налягане се покачваше в по-малка степен, което приемаме за доказателство за настъпилата артериална ригидност. Тези изводи бяха подкрепени и от показателите на ВСЧ. Бяха установени достоверни различия в повечето изследвани метаболитни маркери между двете опитни групи ($## p < 0,05$; $## p < 0,01$).

	Глюкоза (mmol/l)	Общ холестерол (mmol/l)	LDL-холестерол (mmol/l)	VLDL-холестерол (mmol/l)	Триглицериди (mmol/l)	hs-CRP (mg/l)
20г	$4,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$	$2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,05$	$2 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
50г	$5,6 \pm 0,1^{##}$	$5,9 \pm 0,3^{##}$	$3,3 \pm 0,3^{##}$	$1,0 \pm 0,3^{\#}$	$2,8 \pm 1^{\#}$	$2,1 \pm 0,6^{\#}$

Установихме положителна корелация между по-високите нива на глюкозата и нископлътностния холестерол и основния индекс на артериалната ригидност в групата 50 г., което ни позволява да направим предположението, че тези биохимични показатели имат най-висока информативна стойност и в най-голяма степен се отразяват върху процесите на развитие на артериалната ригидност.

Научни публикации и прояви:

- Belova N, Mileva-Popova R. Age and gender influence the haemodynamic response to the active orthostatic test. 5th Int Conference on Prehypertension, Hypertension and Cardio Metabolic Syndrome. Венеция, 22-25 февруари 2018
- Mileva-Popova R, Belova N. Metabolic profile and heart rate variability as an indicator of the cardiovascular sympathetic influences in female individuals of two age groups., XXII Международна Научна Конференция на Съюза на Учените – Стара Загора, 1-2 юни 2017

Оценки по скалата на СМН

ВИСОКА – за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА – за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА – за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-135/02.05.2017 Определяне на лептин-индуцираната експресия на фосфорилирания сигнален преобразувател и активатор на транскрипцията 3 (pSTAT3) в преоптичната област на предния хипоталамус на плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване

Докторант: Милен Христов Христов

Научен ръководител: Проф. Красимира Якимова дм, дмн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Лептинът е адипокин, който намалява приема на храна и увеличава енергийния разход чрез активиране на сигналния път JAK2-STAT3 в хипоталамични неврони на бозайници. Степента на лептин-медираното STAT3 фосфорилиране (pSTAT3) служи като маркер за клетъчния лептинов отговор. Неврони, експресиращи дългата форма на лептиновия рецептор, са открити в различни хипоталамични области, като например медиалната преоптична област (МРА). Функцията на МРА е свързана с широк спектър от физиологични и поведенчески функции при бозайници като терморегулация, възбуда, поддържане на водно-солевия баланс, освобождаване на гонадотропин, хранене и сексуално поведение. Невъзможността на високите нива на лептин да потиснат храненето и да намалят телесната маса в индивиди със затлъстяване е дало основание да се допусне съществуването на лептинова резистентност. Ние демонстрираме, че храненето на плъхове с кафетерийна диета за период от 9 седмици води до значително повишаване на телесната маса, индекса на Lee и серумната концентрация на лептин. Използвайки имунохистохимичен метод за определяне на pSTAT3, ние установихме нарушена лептинова сигнална трансдукция в МРА на мъжки плъхове, порода Wistar, с диета-индуцирано затлъстяване. Тези данни демонстрират развитието на лептинова резистентност на ниво активиране на STAT3 в МРА у плъхове с модел на затлъстяване. Резултатите са в съответствие с предишните ни данни за нарушение в ефекта на лептин върху невроналната активност на неврони от МРА в плъхове с експериментален модел на затлъстяване.

Научни публикации и прояви:

- Hristov M, Landzhov B, Kamenova K, et al. Diet-induced obese rats are associated with leptin resistance in the medial preoptic area of the anterior hypothalamus. CR Acad Bulg Sci. 2018.
- DiBlasi E, Hristov M, Landzhov B, et al. Leptin-induced pSTAT3 changes in MPA of normal and obese rats. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, 10-13 May 2018

Оценки по скалата на СМН

ОТЛИЧНА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-137/02.05.2017 Изследване ролята на хипоксични микро РНКи при карцином на ларинкса

Докторант: Силва Гаро Гирагосян

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Доц. Радка Кънева, дб

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия

РЕЗУЛТАТИ: В текущото проучване бяха изследвани 2 микро РНКи свързани с хипоксията в туморна и нормална тъкан от 65 пациента, както и в плазмен материал от 20 пациента с рак на ларинкса. Тотална РНК, вкл. и малки РНКи бяха изолирани от тъкан и

плазма съответно с китове RNeasy Mini Kit, Qiagen и miRNeasy Serum/Plasma Kit; Qiagen. За превръщането на копиДНК посредством обратна транскрипция бяха използвани 500ng тотална РНК за тъкан и 250ng за плазма с кит miScript II RT Kit (Qiagen). За експресионния анализ беше използван кита на SYBR Green Supermix (Qiagen). Статистическа програма SPSS, v 17. беше използвана за статистическата обработка на данните. Нивата на miR-145 и miR-222, бяха значимо променени както в туморната тъкан, така и в плазмения материал. miR-145 показва понижени нива на експресия, а miR-222 леко завишени нива на експресия в ларингеалната туморна тъкан, докато в плазмения материал нивата на експресия бяха значимо понижени. В допълнение двете микро РНКи бяха изследвани като маркери за разграничаване на болни с рак на ларинкса от здрави контроли. И двете микро РНКи разграничават пациентите от здравите контроли, но със средно висока чувствителност и специфичност. За потвърждаване или отхвърляне на получените резултати е необходимо изследването на подобрите маркери с по-голяма извадка. В допълнение ние установихме статистически значима асоциация между miR-222 и възрастта на пациентите (под и над 60 години), както и miR-145 и туморния и нодалния стадий. Променените нива на експресия в нашата извадка и асоциацията с клиникопатологичните характеристики, поставя хипотезата че тези микро РНКи също имат ключово значение за канцерогенезата на ларинкса.

Научни публикации и прояви:

- Giragosyan S, Petkova V, Popov T, et al. miR-145-5p, miR-196a-5p, miR-222-3p and lncRNA MALAT1 as non-invasive markers in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. 25th Biennial Congress of the Eur Association for Cancer Research, 30 Jun-3 Jul 2018, Амстердам, Холандия

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-138/02.05.2017 Експресионен анализ на микроРНК-и при недребноклетъчни белодробни карциноми

Докторант: Вероника Йорданова Петкова

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Доц. Радка Кънева дб

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия

РЕЗУЛТАТИ: МикроРНК-ите (миРНК) могат да допринесат за разбирането на хода на карциногенезата на рака на белия дроб и да послужат като потенциален диагностичен биомаркер за разграничаването на аденокарциномите (АК) от плоскоклетъчните белодробни карциноми (ПК). Целта на настоящия проект е да анализира експресията на miR-21, miR-197, miR-205, miR-375, miR-495 в тъкани на пациенти с АК и ПК. Бяха изследвани 50 свежо замразени тъканни проби (25АК, 25ПК) и прилежащите им нормални тъкани. Експресията на miR-21, miR-197, miR-205, miR-375, miR-495 беше установена, чрез количествен PCR в реално време. Статистическият анализ беше осъществен чрез SPSSv20. Беше установена повишена експресия на: miR-21 в 60% (12АК&18ПК), miR-205 в 62% (13АК&18ПК), miR-197 в 14% (5АК&2ПК), miR-375 в 30% (11АК&4ПК) и miR-

495 в 40% (13 АК & 7 ПК) в изследваните проби. Намалена експресията беше установена при следните миРНКи: miR-21 в 10% (5 АК & 5 ПК), miR-205 в 10% (7 АК & 3 ПК), miR-197 в 42% (11 АК & 10 ПК), miR-375 в 42% (6 АК & 15 ПК) и miR-495 в 30% (9 АК & 6 ПК) в изследваните проби. За разграничаване на АК от ПК беше осъществен анализ на ROC кривите. Само miR-205 (AUC=0,672, p=0,036) и miR-375 (AUC=0,692, p=0,019) показаха статистическа значимост. Комбинацията на тези две миРНКи (AUC=0,771; p=0,001) може да разграничи с 80% чувствителност и 76% специфичност аденокарциномите от плоскоклетъчните белодробни карциноми. Със същата специфичност и чувствителност of miR-205&miR-375&miR-495 (AUC=0,776; p=0,001) и комбинацията на miR-205&miR-197&miR-375 (AUC=0,774; p=0,001) също биха могли да разграничат АК от ПК. Получените резултати показват, че miR-205 е обещаващ диагностичен биомаркер за карциноми с плоскоклетъчен фенотип и различни панели. Необходимо е да се проведе валидиращо изследване в по-голяма кохорта от пациенти, за да се оцени по-добре нейния диагностичен потенциал.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-139/02.05.2017 Епидемиологично типирание на щамове *Streptococcus pyogenes*, изолирани от болни с различни инфекции

Докторант: Адиле Акифова Мухтарова

Научен ръководител: Доц. Райна Гергова, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Резултатите от проучването показаха, че най-често срещаните *emm*-генотипове сред българските щамове *S. pyogenes* е *emm1*, *emm3*, *emm12* и *emm4*. Открихме два уникални за света *emm*-субтипа: *emm3.132* и *emm3.133*. Нашите резултати показват, че 85.71% от установените *emm*-гени, се покриват от 26-валентната М-протеин базирана ваксина. Следователно тази тя би имала много добро покритие в България. За прецизиране и потвърждаване на резултатите от нуклеотидното секвениране, различни *emm*-генотипове бяха анализирани с мултилокусно секвениране (MLST) на седем постоянно присъстващи при *S. pyogenes* гени. Получихме пълно съвпадение на получените резултати с двата метода. Установихме, че 10% от тонзилофарингитите при български пациенти се причиняват от по-редки групи стрептококи (Group C – GCS, Group G – GGS). След доказване на *emm* гена при четири GGS изолата, той беше подложен на нуклеотидно секвениране и бяха установени за първи път в България 3 *emm* секвенционни типа, а именно stG10.0, stG480.0 и stG6792.0. Доказахме, че GCS/GGS също притежават гени, кодиращи различни фактори на вируленост, подобни на тези при *S. pyogenes*. Най-често доказваният ген при GCG и GGS беше *slo* (в над 40% при група C и в над 85% при група G). 62.5% от GGS носят гена *speG*, с по-малка честота при GGS бяха установени гените *SpeF* (25%), *smeZ* (25%), *ssa* (12.5%). Това е първото българско проучване, при което се прави епидемиологично типирание на клинични щамове *S.*

pyogenes, едновременно с два молекулярно-генетични метода. Открихме два нови за света *emm*-субтипа *emm3.132* и *emm3.133*. Българските изолати *S. pyogenes* са най-често *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm28*. За първи път в България беше осъществено нуклеотидно секвениране на стрептококи от група G. Беше доказано, че близо половината от стрептококи от GCS, GGS също притежават гени за фактори на вирулентност, подобни на тези при *S. pyogenes*. Установените данни са полезни и за евентуално бъдещо въвеждане на ваксини срещу *S. pyogenes*, както и за опознаване епидемиологията и вирулентността на GCS/GGS.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-143/02.05.2017 Изследване на причинно-следствена връзка между HPV-инфекция, митохондриален статус, ДНК фрагментация и идиопатичен мъжки инфертилитет

Докторант: Виктор Димитров Славов

Научен ръководител: Акад. Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн

Базова организация: МУ–София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящото изследване бе да се установи съществува ли пряка връзка между предизвикана от високорискови типове папилома вируси (HPV16; HPV18) абнормална митохондриална функция и завишената ДНК фрагментация в сперматозоиди от пациенти с идиопатичен (неизяснен) инфертилитет. За целта на настоящия научен проект бяха набрани еякулати на 50 лица от мъжки пол, пациенти с повтарящи се репродуктивни несполуки. Семенните течности бяха използвани за екстракция на тотална ДНК и последващ PCR анализ за установяване наличието на HPV 16 и HPV 18. Всички клинични проби в изследването бяха подложени на молекулярен ДНК анализ за установяване наличието на HPV16 и HPV18. В нито една от петдесетте пациентски проби не беше открито присъствие на на някой от гореспоменатите типове човешки папилома вирус. Във връзка с тези първоначални резултати, и с цел да не спре на този етап научно-изследователският проект, назря идеята да се потърси евентуално присъствие на някои от останалите 31 типа човешки папилома вируси в изолираните клинични проби. По този начин беше възможно да се установи асоциация между HPV-инфекция и мъжки идиопатичен инфертилитет в българската популация. За тази цел бяха използвани реактиви, позволяващи едновременна детекция на 14 високорискови (тип 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66/68), 4 среднорискови (тип 53, 73, 81, 82) и 15 нискорискови (тип 6, 11, 40/61, 42, 43/44, 54/55, 70, 57/71, 72, 84/26) човешки папилома вирусни типа (GenoFlow HPV Array test Kit). Изолираните 50 тотални ДНК-и от пациентските проби бяха изследвани за общо 33 типа HPV посредством PCR и Flow-through хибридизация. От петдесетте клинични материала се установи присъствие на следните типове човешки папилома вируси: HPV6 – 1 пациент (2%); HPV31 – 2 пациента (4%); HPV52 и HPV58 – 1

пациент (2%). Изключително слабото присъствие на HPV-типове (8%) в изследваните проби, както и малкият брой изследвани пациенти (50) не даде възможност за извеждане на стабилни изводи за асоциация на HPV-инфекция и мъжки инфертилитет в българската популация. От години на българският пазар съществуват две профилактични ваксини, покриващи двата най-онкогенни типа папилома вируси – HPV16 и HPV18, предмет на настоящия проект. Кампаниите на фирмите-производители са насочени главно към прилагането на ваксините при момичета и жени в репродуктивна възраст. Двата продукта са ефективни също така в профилактиката на инфекциите с HPV16 и HPV18 и при млади мъже и момчета до 26-годишна възраст. Тези два типа не бяха открити в изследваните проби от мъже с репродуктивни несполуки. За сметка на това се установиха пациенти с HPV6, HPV31, HPV52 и HPV58 вирусен тип. В началото на тази година Агенцията по храни и лекарства на САЩ (FDA) лицензира за употреба новата ваксина *Гардасил 9* (*Gardasil 9*), която предпазва от инфекция с 9 типа папилома вируси – HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 и HPV58. Четири от тях бяха открити в настоящото изследване. Ваксината е приложима както при жени, така и при мъже и вече навлиза на българският пазар. В перспектива, резултатите от този проект биха могли да послужат за основа на едно по-мощно и задълбочено изследване на българската популация по този проблем. В случай на успешно установяване на асоциацията на тези вирусни типове с понижения фертилитет при мъжа, би могло към препоръките и индикациите за приложение на тези ваксини да се добави и групата на младите двойки, планиращи създаването на поколение. Това би елиминирало човешкия папилома вирус като фактор за репродуктивни неуспехи.

Оценки по скалата на СМН

ЗАДОВОЛИТЕЛНА - за извършената научноизследователска дейност;

ДОБРА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ДОБРА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-145/02.05.2017 Асоциация между полово-предавани инфекции, HPV инфекция и абнормална цервикална цитология

Докторант: Кремена Стойчева Месечкова

Научен ръководител: Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София

РЕЗУЛТАТИ: Инфекцията с високорискови типове HPV е необходимо, но недостатъчно условие за развитие на цервикален рак. Полово предаваните генитални патогени, като микоплазми, уреаплазми и хламидия, са кофактори на персистентната високорискова HPV инфекция при цервикалната канцерогенеза. Целта на настоящия проект е да определи, специфично за българската популация, честотата на разпространение на тези често срещани полово-предавани бактериални инфекции при пациенти с абнормална цитологична находка и/или вирусна HPV инфекция. С помощта на PCR анализ установихме прогресивно повишаване честотата на HPV инфекция свързано със степента на цитологичната находка – 4% при контролната група с нормална цитология, 17% при

ASC-US, 46% при LSIL и 86% при HSIL, което показва силна асоциация на високорисковата HPV инфекция със степента на прогресия на цервикалните лезии. *Chlamydia trachomatis* беше детектирана само при пациентите с абнормална цитология, свързана с HPV инфекция и ясно изразена асоциация със степента на цервикалните лезии. Инфекцията с *Mycoplasma hominis* също беше свързана с абнормалната цервикална цитология и с най-високата изследвана степен на изследваните преканцерозни лезии HSIL и показва силна корелация с HPV в изследваната популация. Не беше установена зависимост между честотата на изследваните уреаплазми и абнормалните цитологични находки, но се наблюдава силна асоциация на *Ureaplasma parvum* със степента на цитологичната цервикална лезия – 8% при ASC-US, 32% при LSIL и 71% при HSIL. Интерес представлява и проследяването на множествените инфекции с повече от един вид бактериални патогени, тъй като се установява силно изразена асоциация (83%) с HPV инфекцията. Настоящото изследване показва асоциация на инфекцията с *Chlamydia trachomatis*, с *Mycoplasma hominis* и на множествените бактериални инфекции, както с абнормалната цервикална цитология, така и с HPV инфекцията в изследваната група от българската популация. Получените резултати дават основание да се препоръча цервиковагинално изследване за наличие на патогенни микроорганизми на всички пациенти с абнормална цервикална цитология за провеждане на адекватна диагностика и лечение, както и за изчерпателно проследяване на цервикалните цитологични лезии.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-146/02.05.2017 Изследване на кетопрофен, аналгин и мелоксикам за противовирусна активност

Докторант: Любомир Трифонов Маринов

Научен ръководител: Доц. Ирина Николова, дм и Проф. Николай Данчев, дм

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“, София 1000, ул. Дунав 2

РЕЗУЛТАТИ: Ketoprofen, metamizole и meloxicam бяха изследвани за потенциална антивирусна активност. Беше определена $\mu\text{g/ml}$ инхибиращата концентрация IC_{50} на изследваните лекарствени вещества чрез влиянието на различни концентрации върху преживяемостта на клетъчни линии L929, SH-SY5Y и EA.hy926, чрез МТТ-тест. Върху клетъчна линия SH-SY5Y, не заразена с вирус, само при meloxicam се наблюдава време зависимо намаляване на IC_{50} от 1129 $\mu\text{g/ml}$ на 24 час, става 798.4 $\mu\text{g/ml}$ на 48 час и 492.9 $\mu\text{g/ml}$ на 72 час. При ketoprofen и metamizole няма статистически достоверна промяна на IC_{50} . При клетъчна линия EA.hy926, не заразени с вирус, се наблюдава време зависимо намаляване на IC_{50} и при трите изследвани вещества. Беше определено и влиянието на ketoprofen, metamizole и meloxicam върху репликацията на човешки херпесен вирус тип 1, щам F използвайки модифициран МТТ-тест, линия L929, по метод на Reed-Muench. Трите стойности на IC_{50} са изключително високи и не могат да бъдат определени с тези

концентрации, което говори, че и трите вещества не са токсични спрямо тази клетъчна линия и не се наблюдава противовирусна активност на трите изследвани вещества.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-147/02.05.2017 Оценка ефектите на новосинтезирани производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина върху невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y и активността на човешки рекомбинантен ензим MAOB

Докторант: Александра Викторова Касабова-Ангелова

Научен ръководител: Доц. Вирджиния Йоданова Цанкова, дф, Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф

Базова организация: МУ-София, Фармацевтичен факултет, Катедра „Фармакология, фармакотерапия и токсикология“, София, 1000, ул. Дунав 2

РЕЗУЛТАТИ: В настоящото проучване бяха оценени ефектите на нови производни на кофеин-8-тиогликоловата киселина (100 μ M) върху човешка невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y и човешки рекомбинантен ензим MAOB (hMAOB) (1 μ M). Върху SH-SY5Y, повечето производни, приложени самостоятелно, не проявяват статистически значим невротоксичен ефект в сравнение с контролата (не-третираните клетки). Единствено веществата JTA-2Ox, JTA-11, JTA-12 и JTA-13 проявяват статистически значим невротоксичен ефект като намаляват клетъчната жизнениост. В комбинация с 6-хидроксидопамин (6-OHDA) (100 μ M) само 2 от не-токсичните вещества: JTA-1 и JTA-2 проявяват статистически значими невропротективни ефекти, по-изявени от тези на кофеина и кофеин-8-тиогликоловата киселина. Веществата бяха изследвани и за възможна инхибиторна активност върху човешки рекомбинантен MAOB ензим. Отново JTA-1 и JTA-2 проявяват статистически значима инхибиторна активност върху hMAOB, близка до тази на Selegiline. Те инхибират ензима съответно с 23 % и 25 %, а Selegiline инхибира активността на hMAOB с 42 %. Възможният механизъм на невропротекция от страна на JTA-1 и JTA-2, най-вероятно е свързан с инхибирането на hMAOB, който катализира продукцията на невротоксичният p-хинон от 6-хидроксидопамина.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2016“

Договор 3–Д//2016 Корелация между централно аортно налягане и промените в лявото предсърдие при пациенти с артериална хипертония

Докторант: Нели Георгиева Николова

Научен ръководител: Доц. Елена Кинова, дмн

Базова организация: Клиника по кардиология, УМБАЛ “Царица Йоанна - ИСУЛ”

РЕЗУЛТАТИ: Съдовата ригидност и индексираният левопредсърден обем(LAVI) са предиктори за сърдечно–съдови усложнения при пациенти с артериална хипертония(АХ). Липсват убедителни данни за взаимовръзката на показателите за левопредсърдно (ЛП) ремоделиране и съдово увреждане при тази рискова група. Целта на нашето проучване е да се проучи връзката между централното аортно налягане и ЛП и левокамерна(ЛК) структура и функция при пациенти с неусложнена артериална хипертония. В нашият център са изследвани са 70 пациенти на средна възраст (54,85±13,17 г.) и ИТМ: 28,3± 3,1 кг/м² разпределени в 2 гру пи: 50 с АХ – лека до умерена степен и давност до 5 години; 20 здрави контроли, адаптирани по възраст и телесно тегло. За определяне на параметрите на съдова ригидност са изследвани: 24 часово централно аортно налягане (24hСАР), скорост на пулсовата вълна (24hPWV) и аугментационен индекс (24hAix) с апарат за неинвазивно измерване чрез брахиален осцилометричен метод - Mobil–O-Graph PWA. Пациентите преминаха през стандартна двуразмерна ехокардиография, като ЛП механика бе оценена чрез Speckle tracking ехокардиография. От получените резултати установиха сигнификантни разлики в показателите за съдова ригидност между пациентите с АХ и здрави контроли: централно систолно налягане за 24 часа(cSys24h): (117.42±10.27 vs 106,80±5,80 mmHg, p < 0,004), 24hAix (25,54±6,41 vs 19,13±6,63%, p < 0,001), 24hPWV (8,73±1,48 vs 6,22±0,88 m/s, p < 0,0001). По отношение на ехокардиографските показатели за ЛП и ЛК структура и функция се установиха сигнификантни разлики за LAVI (32,72±10,14 vs 22,06,40±3,65 ml/m², p< 0,001) и глобалния стрейн на ЛП - GLS – LA (29,09±4,09 vs 41,29±5,12%, p < 0,0001) и високи скорости на А вълната от трансмитралния кръвоток (84,24±17,18 vs 68,00±14,81 cm/s, p<0,011). LAVI корелира позитивно с cSys24h (r=0.445, p<0,004), Aix24h (r=0,447, p<0,003), PWV24h (r=0,526, p<0,000). GLS – LA корелира негативно с PVW24h (r= - 0,415, p<0,007). В останалите структурни и функционални показатели на ЛК не се откриха сигнификантни разлики и корелации. ЛП ремоделиране се определя от високите 24 часови стойности на неинвазивно измерените централно систолно налягане, аугментационен индекс и скорост на пулсовата вълна. Сърдечно – съдовите показатели за ригидност - cSys24h, Aix24h корелират позитивно с левопредсърдния стрейн. PWV24h корелира негативно с резервоарния стрейн на ЛП. Използването на метода в клиничната практика може да подобри рисковата стратификация и ръководенето на терапевтична стратегия.

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ДОБРА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ЗАДОВОЛИТЕЛНА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 4-Д/2016 Циркулиращи CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцити при пациенти с автоимунен тиреоидит и връзката им с клиничните и лабораторни показатели на заболяването

Докторант: Ралица Валентинова Мекова

Научен ръководител: Проф. Михаил Боянов, дмн

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването беше да се определи има ли данни за участие на CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцити в патогенезата на автоимунния тиреоидит. В проучването бяха включени 71 пациенти с автоимунен тиреоидит /25-с новодиагностицирано заболяване в еутиреоидно състояние, 21- с новодиагностицирано заболяване в хипотиреоидно състояние и 25 с автоимунен тиреоидит на лечение с лево-тироксин/, без други придружаващи заболявания и 21 здрави контроли. При всички участници се сне анамнеза, включваща пушачески статус, фамилност за тиреоидни заболявания и се извърши физикален преглед, включително очен. Проведе се ехографско изследване на щитовидната жлеза като се изчисли обемът ѝ и се отбеляза наличието на нодозни промени. Циркулиращите CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцити ще се изследваха чрез флуцитометрия. Серумните нива на тумор-некротичен фактор-алфа, гранзим В и пепфорин се определиха с ELISA методика, а нивата на тиреоидните хормони и антитела чрез трето поколение ECLIA методика. Циркулиращи CD3+CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцити не се различава при пациентите с автоимунен тиреоидит и здравите контроли- съответно 1.82(0.0-21.3)% и 1.4 (0.4- 7.9) % / $p=0.3$ /. Няма различия в стойностите при пациентите в изходните групи / $p=0.87$ / или според актуалния тиреоиден статус, съответно: еутиреоидни 2.1 (0.0-21.3) %, със субклиничен хипотиреоидизъм- 1.5 (0.2-6.9) % и хипотиреоидни 1.3 (0.04-18.7) %, / $p=0.21$ /. Установи се корелация с възрастта на пациентите / $p=0.019$ /. Циркулиращите CD3+CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцити са значимо повече при жените / $p=0.019$ /. Тази субпопулация Т лимфоцити също показва обратна корелация с antiTG / $p=0.032$ /. Броят на повишените антитела също показва обратна корелация със CD3+CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцитите / $p=0.01$ /. Стойностите на изследваните цитокини в серума не се отличават значимо сред здравите контроли и пациентите, както и сред пациентите с различна тиреоидна функция и не корелира с клиничните показатели с изключение на обратна зависимост между TNF α и antiTG / $p=0.012$ /. В заключение не се откриха данни за съучастие на CD3+CD4(+)/CD28(-) Т лимфоцитите в патогенезата на автоимунния тиреоидит.

Оценки по скалата на СМН:

***ДОБРА** - за извършената научноизследователска дейност;*

***ВИСОКА** - за приноса за оформяне на дисертационния труд;*

***ВИСОКА** - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.*

Договор 6-Д/2016 Мутации в гена кодиращ hTPO сред клинично селектирани български пациенти с първичен вроден хипотиреоидизъм

Докторант: Борис Георгиев Стоилов

Научен ръководител: Проф. Ива Стоева, дм

Базова организация: Катедра по Педиатрия, бул. Ив. Гешов 11, София 1606

РЕЗУЛТАТИ: От въвеждането на неонаталния тиреоиден скрининг през 1993 са скринирани общо 1 518 749 новородени. От проучванията през 1997-2000 при български пациенти са включени пациент с докладвана мутация в екзон 2 и хомозиготна в екзон 5 като положителни контроли. За молекулярно-генетичен анализ бяха подбрани 39 кандидата от 32 семейства; Пациентите бяха с тежка постоянна форма на първичен вроден хипотиреоидизъм, ортогипна щитовидна жлеза и повишени концентрации на серумния тиреоглобулин /19 от мъжки и 20 женски пол, родени между 1995 и 2017/. От 34 деца разполагаме със скринингови данни за ниваат на ТСХ. Чрез секвениране по SANGER и MLPA се установявиха общо при 14 пациента патологични отклонения на гена кодиращ чТПО. За напълно изяснени могат да се приемат обаче 5 от 9-те пациента с мутации. Останалите 4 са хетерозиготи, не се открива втора мутация Това съответства на алелна честота от 20.5% патология. Най-честите мутации са в екзони 14, 7, 4, 5, 2 и 9 /делеции, инсерции, нуклеотидни замени/ които водят предимно до промяна в рамката на четене и стоп кодони и/или скъсен протеин с липсваща активност. Липсва съобщаваната като най-честа мутация в екзон 8. Установи се нова мутации в екзон 9 /NM_175721.3:c.1430_1450del, NP_001193674.1:p.(Ala477_Asn483del)/ която чрез предикция води до синтез на скъсен протеин с вероятно намалена активност Промените в екзон 4 са с голяма честота сред нашите пациенти- досега са съобщени само двама в хетерозиготно състояние. Чрез MPLA анализ се откриха двама братя с хетерозиготна делеция в целия ТПО ген. Българската популация се отличава с относително голяма хетерогенност на чТПО мутациите. Промяната в екзон 4 подлежи на изясняване сред пробанди без щитовидна патология. Необходимо е да продължи молекулярно-генетичния анализ с NGS при същите пациенти. Едва тогава клинично-лабораторния алгоритъм може да бъде усъвършенстван. Остава открит проблема с установяването на етиологична причина за тежкия хипотиреоидизъм с големи ортогипни щитовидни жлези при редица пациенти, негативни от мутационния скрининг за чТПО.

Оценки по скалата на СМН:

***ДОБРА** - за извършената научноизследователска дейност;*

***ВИСОКА** - за приноса за оформяне на дисертационния труд;*

***ВИСОКА** - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.*

Договор 7-Д/2016 Методи за предоперативна оценка на промените в очната повърхност и определяне степента на значението им за постоперативния резултат

Докторант: Розалия Христова Димитрова

Научен ръководител: Доц. Иван Танев, дм

Базова организация: Катедра по офталмология, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящия проект е въвеждането на алгоритъм за диагностика на повърхностни очни заболявания чрез неинвазивни методи, включващи оптична кохерентна томография на преден очен сегмент, бърз тест за очно възпаление, имуноцитохимичен и класически хистологичен анализ на проби от импресионна цитология. В проучването бяха

включени 40 пациенти – 20 здрави контроли и 20 пациенти с хронични роговични язви. Подборът на пациенти бе осъществен от доц. Иван Танев и д-р Розалия Христова, Клиника по Очни болести, УМБАЛ „Александровска“. Проведени бяха рутинни офталмологични изследвания – определяне на зрителна острота, биомикроскопия, офталмоскопия, тонометрия. При пациентите със заболявания на очната повърхност се проведе оптична кохерентна томография за определяне разпространението на дефекта в дълбочина. След получаване на информирано съгласие от всички пациенти бяха получени проби за импресионна цитология, които бяха маркирани чрез класически хистологични техники. Импресионната цитология при здрави контроли демонстрира нормални епителни клетки с кръгли, ясно отграничени ядра и нормално разпределение на муцинови PAS+ клетки в конюнктивния сектор на хистологичния препарат. При пациенти с трофични заболявания се наблюдаваха изменения във формата на епителните клетки и техните ядра. Наблюдаваха се възпалителни клетъчни инфилтрати. Наличието на PAS+ клетки по роговичната повърхност доказва конюнктивализация, която е типична за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. В някои случаи се откри кератинизация на очната повърхност и абсолютна липса на чашковидни клетки, което е свързано с тежка сухота. При нито един пациент не са наблюдавани усложнения след процедурата. Доказано бе, че трофичните заболявания на очната повърхност протичат с дисфункция на лимбалните стволови клетки. Установено бе значението на повърхностното очно възпаление за резултата от оперативно възстановяване на очната повърхност. Използван бе иновативен метод за оценка на очното възпаление, базиран на съдържанието на металопротеиназа 9 (ММР-9) по очната повърхност при пациенти с хронични роговични язви. При изследваните пациенти с повишени нива на ММР-9 успеваемостта от възстановяването на очната повърхност бе редуцирана и се наложиха допълнителни оперативни интервенции. Получените резултати ще позволят индивидуализиран подход в терапията на заболяванията на очната повърхност. Предоперативното лечение, насочено към редуциране на възпалителната активност и адекватна субституция на слъзния филм ще допринесе за успешен резултат от оперативното възстановяване на очната повърхност.

Научни публикации и прояви:

- Христова Р, Здравков Я, Танев И. Трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки. Български Офталмологичен Преглед. 2017;2:32-40.
- Hristova R, Zdravkov Y, Hristova M, et al. Assessment of ocular surface inflammation in patients with chronic corneal ulcers. EuCornea. Lisbon. 6-7 October 2017
- Hristova R. Cultured limbal stem cells as treatment for neurotrophic ulcers. ESCRS Winter Meeting, Maastricht. 10-12 Feb 2017. p. 10
- Христова Р, Танев И. Импресионна цитология на очната повърхност при трофични заболявания на роговицата. Новости в Офталмологията. Правец. 2-4.12.2016. стр.

11

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 9-Д/2016 Изследване на възпалителни маркери в серум при пациенти със стабилна хронична обструктивна белодробна болест

Докторант: Александър Илиев Лилов

Научен ръководител: Проф. Янина Славова-Маринова, дм

Базова организация: Клиничен център по белодробни болести, ул. Акад. Иван Гешов 19, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Нивата на серумните възпалителни маркери интерлевкин IL- 6 и С-реактивен протеин (CRP) могат да се използват при пациенти със стабилна ХОББ, за да се оцени активността на заболяването и да се предскаже бъдещо белодробно увреждане.

Цел: Да се изследва ролята на IL6 и С-реактивен протеин (CRP) при пациенти със стабилна ХОББ и нейните корелации с тежестта на ХОББ, белодробната функция, степента на екзацербация, коморбидността. Методи: При 132 пациенти със стабилна ХОББ бяха оценени възпалителните маркери (IL6, CRP и брой на левкоцитите), белодробната функция (FEV₁, FVC, FEV₁ / FVC, mMRC, CAT и 6-минутна ходене-6MWT), броя екзацербации, симптомите (диспнея, кашлица, производство на храчки) и коморбидността. Резултати: Няма разлики на средните нива на IL6 при пациенти от различни категории по GOLD. Средните стойности на IL6 са по-ниски при пациенти със сърдечна недостатъчност (0.54vs.1.38, p <0.001) и при захарен диабет (0.24vs.1.40, p <0.001). Намерихме, че няма разлики в неговите стойности по пол, възраст, BODE индекс, брой обостряния, група по GOLD, стойности на FEV₁, наднормено телесно тегло, поднормено телесно тегло, хипертонична болест и хронична дихателна недостатъчност. Статистическият анализ на данните показва негативна зависимост между: IL6 към 6MWT в GOLD A (r = -0.886; p = 0.019) и IL6 към CAT в GOLD D (r = -0.380; p = 0.027); положителна корелация между IL6 към CRP в GOLD B (r = 0.889, p <0.001) и IL6 към CRP в GOLD D (r = 0.630, p <0.001). Заключение: IL6 играе главна роля в процеса на възпаление при пациенти със стабилна ХОББ и е свързано с влошаване на белодробната функция и с други възпалителни маркери. Серумните нива са повлияни от коморбидности като сърдечни заболявания и захарен диабет, но стойности му са независими от степента на обостряне, ИТМ, хипертония, хронична респираторна недостатъчност.

Оценки по скалата на СМН:

ЗАДОВОЛИТЕЛНА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ЗАДОВОЛИТЕЛНА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор 10-Д/2016 Приложение на РЕЕР при продължителни гинекологични операции

Докторант: Велислава Методиева Коритарова

Научен ръководител: Проф. Силви Георгиев, дмн

Базова организация: Катедра „Анестезиология и интензивно лечение“, ул. Здраве 2

РЕЗУЛТАТИ: Данните събрани по време на проучването бяха обработени с програмата SPSS 16.0. Като общата честота на всички следоперативни усложнения беше отчетена като 27,1% и в двете групи. Беше формирана нулева хипотеза според която не съществува статистически значима връзка между приложението на РЕЕР по време на продължителни гинекологични операции и честотата на следоперативните усложнения. Тази хипотеза беше проверена по метода на създаване на crosstab по който бяха анализирани честотите

на дадено усложнение във всяка една от двете групи. Получените честоти бяха представени като проценти. Определи се ниво на значимост $\alpha \leq 0,05$ и беше приложен статистическия непараметричен тест χ^2 квадрат. Нулевата хипотеза беше отхвърлена и се доказва че съществува статистически значима връзка между приложението на РЕЕР при продължителни гинекологични операции и по-ниската честота на всички следоперативните усложнения, -на случаите на следоперативна дихателна недостатъчност, ателектази, пневмонии, необходимост от неинвазивна вентилация. Докато не беше установена статистически значима зависимост между приложението на РЕЕР и честотата на следоперативните пневмонии, бронхоспазми, плеврални изливи и извънбелодробните усложнения. В това проучване не бяха наблюдавани случай на пневмоторакс, белодробен оток, белодробен тромбемболизъм. В това проучване също се изследва ефекта на РЕЕР върху хемодинамичната стабилност на пациентите като се търси статистически значима зависимост между РЕЕР и артериалното налягане на пациентките през операцията както и количеството на инфузиите, и използваните вазопресори. Поставя се нулева хипотеза според която приложението на РЕЕР не оказва ефект върху артериалното налягане, количеството на инфузиите и вазопресорите и стойностите на пиковото инспираторно налягане и сатурацията и кървенето по време на операцията. Отново се прилага метода на crosstab и получените резултати се проверяват за статистическа значимост с χ^2 квадрат теста, отново нивото на значимост е $\alpha < 0,05$. Приема се нулевата хипотеза- приложението на РЕЕР няма статистически значим ефект върху стойностите на систолното артериално налягане, количеството на инфузиите и вазопресорите и стойностите на пиковото инспираторно налягане и сатурацията и кървенето по време на операцията. Приложена е таблица в точ. 2 Получени резултати и обсъждане, в която се изчисляват средната стойност на количеството на инфузираните кристалоидни и колоидни разтвори, използваните вазопресори- в това проучване е използван само ефедрин, интраоперативното кървене, и ASA, Ariscat score. Тези средни стойности са отчетени поотделно за всяка група. Забелязва се че няма съществена разлика между двете групи. Като и в двете групи са включени най-много пациентки от ASA- , оценени с Ariscat score който определя среден или висок риск за развитието на следоперативни усложнения. Най-голям е процента в това проучване на пациентки с ARISCAT score-34-51,4% ASA 3-52.9%, най-много операции са продължили 2,30 мин.-в 25,7% от случаите, като най-много операции са приключили с 1000 мл. Кръвозагуба-в 18% от случаите.

Оценки по скалата на СМН:

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2017“

Договор Д-132/02.05.2017 Оценка на значението на панел от соматични мутации като прогностични фактори при карцинома на стомаха

Докторант: Ангел Николаев Арабаджиев

Научен ръководител: Доц. Костадин Ангелов, дм

Базова организация: МУ - София, МФ, Катедра по хирургия, УМБАЛ „Александровска”, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Ракът на стомаха е агресивно заболяване с около 20% 5 годишна преживяемост и се нарежда на второ място по годишна смъртност поради онкологични заболявания. Прогнозата при пациенти в напреднал стадий все още не добра. При някои пациенти се наблюдават амплификации на определени рецепторни тирозин кинази (РТК) като ERBB2, FGFR2, KRAS и MET, които се асоциират с прогресията на стомашния карцином. Инхибитори за тези РТК съществуват и биха могли да се използват като таргетна терапия при рака на стомаха. В текущия проект бяха събрани туморни и нормални тъканни проби от 27 пациента с рак на стомаха. Амплификацията/делецията на подбрани гени, участващи в карциногенезата при рака на стомаха бе анализирана чрез MLPA метод. В резултат на проведеня анализ бяха установени аберации в следните гени *GATA4*, *GATA6*, *EGFR*, *CDK6*, *KRAS*, *FGFR1*, *CCNE1* и *ERBB2* при 37% (в 10) от изследваните пациенти. Делеции бяха отчетени в следните гени: *GATA4* (при трима пациенти) и *FGFR1* (в трима пациенти). *GATA4* е туморсупресорен ген, а за *FGFR1* е известно, че играе роля на туморсупресор и на онкоген. Дупликации бяха открити в следните онкогени: *GATA6* (при 4 пациента), *EGFR* (при 1 пациент), *CDK6* (при 3 пациента), *KRAS* (при 1 пациент), *CCNE1* (при един пациент) и *ERBB2* (при 2-ма пациента). В петима (18.52%) от изследваните пациенти се наблюдават аберации в няколко гена едновременно. При пациентите с открита генна аберация се очаква прогресия на заболяването. Тези пациенти, както и останалите включени в проекта ще бъдат проследени.

Научни публикации и прояви:

- Арабаджиев А, Ангелов К, Велев Г, и др. Карцином на стомаха – генетична предиспозиция. Хирургия

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-136/02.05. 2017 Диагностика и оценка на степента на малабсорбция на жлъчни киселини при пациенти с микроскопски колит, посредством изследване на серумни и фекални маркери

Докторант: Иван Алекснадров Лютаков

Научен ръководител: Доц. Пламен Пенчев, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Клиничен център по гастроентерология, УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ”, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Малко се знае за механизмите на нарушена регулация на ЖК при различни групи пациенти с диария като хроничните възпалителни заболявания на червата (ХВЗЧ), синдром на дразнимото черво с диария (IBS-D) и микроскопски колит (МК). Цел: Да се определи диагностичната стойност на серумния FGF19, общите свободни фекални жлъчни киселини (TFFBA) и фекалния калпротектин (ФК) при ХВЗЧ, IBS-D и МК. В проспективно проучване са включени 40 пациента с хронична диария – пет групи както следва: 14 пациента с активно ХВЗЧ, 5 пациента с ХВЗЧ в ремисия, 5 пациента с ХВЗЧ след операция, 11 пациента с IBS-D и 5 пациента с МК. Проведени са стандартни лабораторни изследвания, колоноскопия, серумен FGF19, ФК и TFFBA в болница „Царица Йоанна – ИСУЛ, София, България. FGF19 и TFFBA са определени чрез ELIZA, а ФК е изследван с количествен имунохроматографски метод. От 40 пациента включени в анализа, диагноза на МЖК е открита при 24(60%) пациента и отхвърлена при 16 (40%). За IBS-D, FGF19 показва ROC крива със AUC от 0,777 (p-value of 0,007 and 95% CI [0,628 – 0,927]). Чувствителност и специфичност на FGF19 беше 72,7% и 72,4% респективно за горна граница от 88,22 pg/ml, която ще доведе до точно предвиждане на МЖК при пациенти с IBS-D в 90,9% от пациентите. За диагностициране на МЖК при ХВЗЧ след операция FGF19 показва приемливи резултати с разлика на -199,4 и p-value of the t-test 0,029. За диагнозата на МЖК при активно ХВЗЧ, както и в ремисия и при пациенти с МК, FGF19 и TFFBA показват ниска значимост между различните групи. FGF19 може да се използва за скринингов метод за откриване на МЖК при пациенти с хронична диария. МЖК е подценявано състояние, което трябва да се има при всеки пациент с хронична диария, защото има съществуващо лечение. Нови проучвания са нужни да се установи ефикасността на FGF19 и TFFBA.

Научни публикации и прояви:

- Лютаков И, П Пенчев, Р Наков, и др. Чувствителност и специфичност на серумен фибробластен растежен фактор 19 (FGF19) и общи свободни фекални жлъчни киселини като биомаркери за откриване на малабсорбция на жлъчни киселини при пациенти с хронична диария: Пилотно проучване. XIII конгрес на БДГЕ 11-13.10.2018, София
- Lyutakov I, P Penchev, R Nakov, et al. Evaluation of serum fibroblast growth factor 19 (FGF19) and total free fecal bile acid in stool as markers of bile acid malabsorption in patients with chronic diarrhea: a pilot study. Symposium 211, XXV Int Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease 2018, Dublin, Ireland.
- Lyutakov I, P Penchev, I Terziev, et al. Do we need so many tests for patients with chronic diarrhea? Case report. 2018 Salzburg Columbia Seminar in Internal Medicine. 26 Aug - 1 Sep 2018, Salzburg, Austria.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-140/02.05.2017 Изследване на фенотип и цитокинова секреция на Т-хелперните субпопулации Th17 и Tregs при пациенти със системна склероза

Докторант: Екатерина Красиминова Куртева

Научен ръководител: Доц. Доброслав Кюркчиев, дмн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, УМБАЛ „Свети Иван Рилски“ бул. „Акад. Иван Евстр. Гешов“ 15, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Изследвахме 24 пациента, диагностицирани съобразно АСР критерии за прогресивна системна склероза (ПСС) на средна възраст 47.1 ± 13.2 години, от които 13 бяха с дифузна форма на ПСС и 11 - с ограничена, както и контролна група от 16 здрави лица (ЗК). Бе извършено флоуцитометрично изследване на процент Th17 и Tregs клетки, както и флоуцитометрично определяне на повърхностната експресия на PD-1 и PD-L1 върху лимфоцити, в периферна кръв от пациентите с ПСС и при ЗК. Серумите на пациентите и на ЗК бяха тествани за наличието на IL-10, IL-17A, IL-23, TGF- β 1 чрез ELISA метод. Намерихме увеличен процент Th17 клетки при пациентите с ПСС спрямо ЗК ($P = 0.031$). Освен това, Th17 клетките бяха процентно увеличени при пациентите с ограничена ПСС, спрямо ЗК ($P = 0.025$), като не открихме сигнификантна разлика между ограничената и дифузната ПСС. При пациентите с дифузна ПСС установихме увеличен процент CD4+CD25-Foxp3+ клетки спрямо ЗК ($P = 0.032$). По отношение на цитокиновия профил, наблюдавахме увеличени серумни нива на TGF- β 1 ($P = 0.02$), IL-10 ($P = 0.008$) и IL-17A ($P < 0.001$) при болните с ПСС в сравнение със ЗК. При ограничената ПСС установихме завишени серумни нива IL-10, TGF- β и IL-17A, в сравнение със ЗК, както следва: IL-10 ($P = 0.003$), TGF- β 1 ($P = 0.031$) и IL-17A ($P < 0.001$). Нещо повече, серумният IL-17A беше сигнификантно увеличен при пациентите с ограничена спрямо тези с дифузна ПСС ($P = 0.008$). По отношение стадията на ПСС, серумните нива на TGF- β 1 бяха завишени през ранния спрямо късния стадий, независимо от формата на ПСС ($P = 0.017$). Получените резултати онагледяват участието на Th17 и Tregs клетките, заедно с респективните им цитокини, в патогенезата на ПСС, както и дават насоки за терапия при пациентите с ограничената кожна форма на заболяването.

Научни публикации и прояви:

- Красиминова Е, Великова Цв, Иванова-Тодорова Е, и др. Увеличени периферни CD4+CD25-Foxp3+ регулаторни клетки и изразен Th17 профил при пациенти със системна склероза. Национална Конференция по Ревматология, Ахелой. 11-14 Май 2017.
- Krasimirova E, Kalinova D, Velikova T, et al. Diminished peripheral T-cell activation along with marked Th17 circulating profile in Ssc. EULAR 2017, Madrid, Spain, 14-17 Jun 2017.

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-141/02.05. 2017 Сравняване на диагностичната стойност на IGRA-тест (T-SPOT.TB) в периферна венозна кръв и в бронхоалвеоларна лаважна течност

Докторант: Наталия Николаева Габровска

Научен ръководител: Проф. Димитър Костадинов, дм, Доц. Светлана Велизарова, дм
Базова организация: МУ-София, МФ, КЦББ, МБАЛББ "Св. София" Детска клиника, бул. Акад. Ив. Гешов, 17, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: IGRA (IFN-gamma Release Assays) тестове - квантиферонов тест и T-SPOT.TB, се прилагат като се използва венозна кръв от пациента. Други телесни течности, като бронхоалвеоларен лаваж, плеврални изливи или ликвор също са успешно изследвани (макар и не толкова рутинно в клиничната практика) с T-SPOT.TB теста с цел бърза локална идентификация на туберкулозна инфекция и болест. Целта на проучването: сравняване на диагностичната стойност на съвременен имунологичен метод за диагностика на туберкулозно заболяване (T-SPOT.TB), приложен върху два вида биологични течности – венозна кръв и бронхоалвеоларна лаважна течност. Методи: проспективно проучване на диагностичната стойност на T-SPOT.TB тест, приложен върху венозна кръв и БАЛ (взет с рутинна бронхоскопия) при деца, суспектни за туберкулозно заболяване - изследвани са 30 деца за периода 2017-2018 г. в националния референтен център за лечение на детска туберкулоза - МБАЛББ „Св. София“. Резултати: десет от децата (33,3 %) са с отрицателен кръвен T-SPOT.TB тест, 18 (60 %) са с положителен кръвен имунологичен тест, 1 дете (3,3 %) е с граничен резултат и 1 (3,3 %) е с неотчитаем резултат. По отношение на лаважния T-SPOT.TB - 17 деца (56,7 %) са с отрицателен резултат, 9 (30 %) са с положителен резултат, 4 деца (13,3%) са с неотчитаем резултат. Тези резултати, разбира се, имат своето научно обяснение, свързано с патогенезата на туберкулозното заболяване в детска възраст, съществено различаваща се от тази при възрастните пациенти. Разпространението на туберкулозните бактерии при децата е предимно по лимфо-хематогенен път, туберкулозното заболяване в детска възраст има склонност към генерализация на процеса. Ето защо, получените резултати се различават от тези, получени при изследване на възрастни пациенти, при които локалната имунодиагностика е с много висока диагностична стойност. Занапред са необходими са по-задълбочени проучвания по отношение на имунологичните особености на детския организъм, както и спецификата на протичане на туберкулозното заболяване сред децата.

Научни публикации и прояви:

- Габровска Н. Сравнителна стойност на T-SPOT.TB в периферна кръв и бронхоалвеоларен лаваж при деца с различни форми на туберкулозно заболяване. Български медицински журнал, бр. 3, 2017
- Велизарова С, А Спасова, Н Габровска. IGRA - тестове - съвременна имунологична диагноза на туберкулозното заболяване в детска възраст. GP news, бр. 2, 2017
- Gabrovska N, Velizarova S, Kostadinov D, et al. Comparison of the diagnostic value of immunological test, applied to two types of biological fluids - venous blood and bronchoalveolar lavage in children with tuberculosis, Конгрес на ERS Париж, септември 2018

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-142/02.05. 2017 Биохимични, генетични и ехографски критерии за оценка степента на развитие на стеатоза и фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст

Докторант: Деница Руменова Кофинова

Научен ръководител: Доц. Даниела Авджиева-Тзавелла

Базова организация: МУ - София МФ, Катедра по педиатрия, СБАЛДБ „Проф. д-р Иван Митев“ ЕАД София, бул. „Акад. Иван Гешов“ 11

РЕЗУЛТАТИ: Проведеното проучване обхваща общо 71 деца, 41 с хронични хепатити, 20 с Неалкохолна мастна чернодробна болест (НАМЧБ) и 10 чернодробно здрави деца, 38 момчета и 33 момичета на средна възраст $9,62 \pm 4,93$. При всички пациенти се извърши конвенционална ехография в В-mode, Shear-wave еластография, изследваха чернодробни ензими и FibroTestActiTest. При 50 от децата с хронични хепатити и НАМЧБ стойностите от Shear-wave еластографията и FibroTestActiTest се сравниха с хистологния резултат от чернодробна биопсия. Резултатите от Shear-wave еластографията корелират по-силно в сравнение с FibroTestActiTest с биопсията ($r=0.768$, $p<0.001$ срещу $r=0.617$, $p<0.001$). Shear-wave еластографията и FibroTestActiTest разграничават наличие на сигнификантна фиброза $F \geq 2$ от липсата на такава ($p=0.001$ срещу $p=0.008$). Но и двата не могат да отдиференцират лека фиброза F1 от липса на такава F0 ($p=0.4$ и $p=0.7$). Средните стойности измерени чрез Shear-wave еластография при пациентите с НАМЧБ са статистически значимо по-високи от средните стойности, измерени при пациентите без чернодробно заболяване ($p=0.001$). Децата с НАМЧБ и чернодробно здравите деца се изследваха генетични полиморфизми, PNPLA3 (p.I148 M), GSKR (p.P446L), TM6SF2 (p.E167K), свързани с по-бърза прогресия на чернодробна фиброза и цирроза. Най-рядко срещан полиморфизъм е TM6SF2, наблюдава се при 2 деца. Най-често срещаният патологичен полиморфизъм за изследваната популация е GSKR – при 24 деца. PNPLA3 е регистриран при 10 от пациентите и при 5 от здравите контроли. Сигнификантна фиброза $F \geq 2$ се регистрира при 2 деца с НАМЧБ, носители на PNPLA3 и GSKR полиморфизми. Основен рисков фактор за развитие на НАМЧБ при генетично предразположени деца, носители на на някой от следните генетични полиморфизми (PNPLA3, GSKR, TM6SF2) в хомо-или хетерозиготно състояние, е наличието на наднормено тегло или затлъстяване. Чернодробно здравите деца с нормален индекс на телесна маса, дори и носители на патологичен полиморфизъм, нямат фиброза. Представеното изследване потвърждава връзката между затлъстяването, метаболитния синдром и НАМЧБ. Използваните генетични маркери могат да бъдат основа на бъдещи проучвания в търсенето на неинвазивни предиктивни фактори за риск от развитие на НАМЧБ.

Научни публикации и прояви:

- Кофинова Д, Д Авджиева-Тзавелла, Х Желев, Оценка на чернодробната фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст-кръвни тестове. Педиатрия. 2016-8; 2:7-9
- Кофинова Д, Д Авджиева-Тзавелла, Х Желев, Оценка на чернодробната фиброза при хронични чернодробни заболявания в детска възраст. Еластография. Педиатрия. 2016-8;2: 10-15

- Кофинова Д, М Байчева, И Йорданова и др. Клинико-лабораторни характеристики и генетични полиморфизми при деца с неалкохолна мастна чернодробна болест. XIV Национален Конгрес по Педиатрия 27-30.09.2018, Боровец

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-144/02.05.2017 Експресия на андрогенния рецептор в асоциация с други прогностични и предиктивни фактори при български пациенти с рак на гърдата

Докторант: Славяна Славчева Ушева

Научен ръководител: Доц. Теофил Седлоев, дм

Базова организация: МУ-София, Медицински факултет, УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“ ЕАД, Клиника по хирургия, София 1527, ул Бяло море 8

РЕЗУЛТАТИ: Ракът на млечната жлеза (РМЖ) представлява хетерогенно заболяване, което варира в широки граници спрямо своите биологични особености, агресивност и клинично-патологични характеристики както в различните пациенти (интертуморна хетерогенност), така дори и в отделните тумори (интратуморна хетерогенност). Тройно-негативните карциноми на гърдата (ТНКГ) представляват агресивна субгрупа на това онкологично заболяване и се превръщат в огромно терапевтично предизвикателство поради отсъствието на ясно дефинирани молекулни таргети, лишавачи ги от ефикасността на конвенционалните хормоно- и химиотерапии. Андрогеновият рецептор (AR) като представител на субфамилията на стероидни рецептори се експресира във висок процент при различните типове карцином на гърдата (50-90%), включително и в групата на ТНКГ. Проучването обхваща 25 пациентки с хистологично и имунохистохимично верифициран чрез tru-cut биопсия ТНКГ на средна възраст 56 години (37-82 г.), лекувани в Клиниката по Хирургия на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, МУ София. Шест от болните (24%) бяха диагностицирани с мултифокален/мултицентричен карцином. За фиксиране на туморната и контролна нормална тъкан се използва RNAlater (RNA Stabilization Solution for Tissue), а съхраняването им се осъществи на -80°C в създадената съвместно с Центъра по молекулярна медицина биобанка. Тотална РНК се изолира с помощта на miRNeasy Lipid Mini Kit. Експресионният анализ беше извършен чрез обратна транскриптаза посредством High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit с последващо провеждане на real-time PCR. В проучването бе установена променена андрогенова експресия при 21 (84%) от туморните проби на болните в сравнение със съответстващите им нормални тъкани. Повишена експресия беше отчетена в 20 % от случаите (n=5), а понижена – в 64 % (n=16). Само при 4 пациентки (16%) не се установи промяна в нивата на експресия между здрава и туморна тъкан, което посочва неоспоримото влияние на андрогеновия рецептор в интимните механизми на канцерогенезата. Асоциацията на AR с клинично-патологични показатели и прогноза не е достатъчно добре изяснена, затова е необходимо да продължи да се анализира неговата значимост като потенциална мишена за таргетната терапия.

Научни публикации и прояви:

- Ушева С, Седлоев Т, Спиридонова Ц, и др. Изследване нивата на андрогенова експресия при група пациенти с тройно-негативен карцином на гърдата. VIII Научна Конференция на тема: Новости в Онкологията - 15-17.06.2018, Правец

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

Договор Д-148/02.05.2017 Въвеждане на пулсовата оксиметрия в денталната медицина за диагностика на зъбната пулпа

Докторант: Димитър Николаев Костурков

Научен ръководител: Проф. Цонко Узунов, дм

Базова организация: МУ - София, Факултет по дентална медицина, Катедра по консервативно зъболечение, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Пулсовата оксиметрия е метод за измерване на кислородната сатурация. Той може да се приложи за диагностика на състоянието на зъбната пулпа чрез създаване на специални крайници, което е цел на настоящия проект. Изследвани са характеристиките на стандартните крайници на пулсов оксиметър и са създадени три вида крайници за приложение върху фронтални зъби, премолари и молари. Изследването на 44 интактни фронтални зъба на 22 пациенти преди и след изолиране на гингивата със силикон показва, че няма статистически значима разлика между измерените нива на сатурация за двете групи – 83%. При изследване на 186 интактни фронтални зъба, премолари и молари са получени близки стойности на сатурация на пулпата при трите групи – около 83-84%. При изследване чрез пулсова оксиметрия (ПО) и електроодонто диагностика (ЕОД) в динамика на 85 зъба с травми на 30 пациенти се установява, че първоначално 54% от изследваните зъби реагират с повишени стойности – средно 71 μ A (ЕОД) и 92% (ПО), а след 6 месеца 94% от зъбите реагират нормално – средно 8 μ A (ЕОД) и 84% (ПО). Само 5 зъба (6 %) не реагират при изследване с ЕОД от началото до края на проследяването, а при изследване с ПО се наблюдава понижаване на сатурацията до средни нива около 70%. При изследване на 54 зъба на 23 пациенти преди и след изпиляване за обвивни корони се установява статистически значима разлика между двете групи. Сатурацията преди изпиляване е 82%, а след изпиляване: 93%.

Научни публикации и прояви:

- Костурков Д, Узунов Ц. Приложение на пулсовата оксиметрия в денталната медицина за пулпна диагностика – литературен обзор. Проблеми на денталната медицина, 2017;43(1): 51-9.
- Костурков Д, Узунов Ц. Приложение на модифицирани крайници на пулсов оксиметър за диагностика на състоянието на зъбната пулпа. Проблеми на денталната медицина, 2017,43(2).
- Kosturkov, D., Uzunov, Ts., Uzunova, P. Influence of the gingival tissues on the measured saturation level of the dental pulp blood flow. Chemistry: Bulg J Sci Ed 2018;27(3):454-9

- Костурков, Д, Иванчева, В, Узунов Т. и др. Промени в пулпната микроциркулация след изпиляване на зъби за обвивни корони. 17 научен конгрес на БЗС, 15-17 Юни 2017, България
- Костурков Д, Узунов Ц, Узунова П. Влияние на гингивалните тъкани върху измереното ниво на сатурация на кръвта в пулпата. Национален форум по Физика „Физиката – вечно млада наука“, 27-29 Октомври 2017, Варна.
- Kosturkov D, Uzunov T. Dynamic follow-up by Pulse Oximetry and Electric Pulp Test of teeth with trauma. 27th Annual Assembly of IMAV, 11-14 May. 2017, Bulgaria

Оценки по скалата на СМН

ДОБРА - за извършената научноизследователска дейност;

ВИСОКА - за приноса за оформяне на дисертационния труд;

ВИСОКА - за приноса върху процеса на подготовката на докторанта.

КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2016”

Договор 1-С/2016 Въвеждане на биохимичен и молекулярно-генетичен подход за диагностика на биотинидазен дефицит в България

Изследователски екип: Акад. Проф. Ваньо Иванов Митев, дм, дбн

- Проф. Алексей Алексеев, дб
- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Гл. ас. Биляна Георгиева, дб
- Иглика Йорданова, дб

Базова организация: Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Биотинидазният дефицит е автозомно рецесивно наследствено метаболитно заболяване, което се дължи на частична или пълна липса на ензима биотинидаза. Характеризира се с неврологични и/или кожни симптоми, които могат да се лекуват с фармакологични дози биотин. Целта на проучването е да се въведе ензимен биохимичен и молекулярно-генетичен подход за диагностика на биотинидазен дефицит в България. Количественото определяне на биотинидазната активност в суха кръвна проба се основава на колориметрично определяне на *p*-аминобензоената киселина отделена от изкуствения субстрат биотинил-*p*-аминобензоат след инкубиране с пробата. Мутационният анализ включва секвениране на четирите екзона, екзон/интронните граници и промотора на *BTD* гена. За определяне референтните граници на биотинидазната активност са анализирани 157 клинично здрави контроли (68 възрастни, 36 деца и 53 новородени). Нормалната средна биотинидазна активност в суха кръвна проба е 5.34 pmol/min/диск (граници 3.95- 6.96 pmol/min/диск; n=100). При новородени, поради незрялост на черния дроб, нормалната средна биотинидазна активност е 3.05 pmol/min/disc (граници 2.18-3.96 pmol/min/диск; n=53) или 57% (граници 41-74%) от нормалната активност при възрастни, което е в съответствие с литературата. При четири от изследваните контролни проби се отчете намалена биотинидазна активност (3.16-3.36 pmol/min/диск) или около 63% от нормалната активност при възрастни. След секвениране се установи мутацията p.D444H в хетерозиготно състояние в екзон 4 на *BTD* гена. За тази мутация установихме висока честота на носителство (3.85%) за българската популация, подобно на други популации. При всички изследвани 28 семейства с подозрение за биотинидазен дефицит, тази диагноза беше отхвърлена. Беше въведен надежден ензимен метод за количествено определяне на биотинидазната активност в суха кръвна проба, както и генетичен тест за анализ на *BTD* гена. Този биохимичен и молекулярно-генетичен подход позволяват правилно диагностициране, профилактика и адекватно лечение на биотинидазния дефицит в България.

Научни публикации и прояви:

- Георгиева Б, Йорданова И, Тодорова А, и др. Въвеждане на биохимичен ензимен метод и молекулярно-генетичен подход за диагностика на биотинидазен дефицит в България. Педиатрия, бр. 3/2017, стр 37-40.
- Georgieva B, Yordanova I, Todorova A, et al. Development of a biochemical enzymatic

and molecular-genetic approach for diagnostics of biotinidase deficiency in Bulgaria. 16th Int Congress of Medical Sciences (ICMS 2017), Sofia, Bulgaria, May 11-14 2017; A37. Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 2-С/2016 Идентифициране и мониториране мутациите на *EGFR*, *K/N-RAS* *BRAF* върху клетъчно-свободната, циркулираща туморна ДНК по време на системна противотуморна лекарствена терапия при болни с метастатичен белодробен и колоректален карцином

Изследователски екип: Проф. Албена Първанова Тодорова-Георгиева, дбн

- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Доц. Жасмина Миланова, дб
- Добромира Петкова, дм - МБАЛ ВМА
- Венета Петрова, дм - МБАЛ ВМА
- Вера Мегданова, дм - МБАЛ ВМА
- ас. Андрей Киров, дб
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

Базова организация: Катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящата научна разработка беше идентифициране и мониторинг на мутации в гените *EGFR*, *K/N-RAS*, *BRAF* в циркулираща туморна ДНК по време на терапия при болни с метастатичен белодробен (НБК) и колоректален карцином (КРК). При изследваната група с КРК (22 пациента) бяха открити мутации единствено в кодон 12 на *KRAS* гена, с преобладаване на мутацията с.35G>A, p.Gly12Asp (~32%). Въпреки че, кодон 12 на *KRAS* гена е известен „горещ“ мутационен регион, е странно че няма открити мутации извън региона. Това може да се дължи на значително по-ниската честота на останалите мутации, поради което не ги откриваме в такава малка група от пациенти. Всички пациенти с мутации в cfDNA показват прогресия на заболяването, което е логично като се вземе в предвид биологичният ефект на мутацията. При негативните за *KRAS* пациенти, не бяха открити мутации и в *NRAS* гена. Получените резултати при пациентите с НБК (8 пациента) показват наличие на *EGFR* мутацията с.2369C>T (p.Thr790Met) при 50% от болните. Мутацията се асоциира с резистентност към тирозинкиназни инхибитори и обикновено тази мутация възниква в следствие, след като вече има възникнала „активираща“ мутация в *EGFR* гена. За анализ на нашите проби използвахме кит за детекция на 29 мутации, но открихме само гореописаната такава. Това показва, че мутациите свързани с резистентност към лечение, най-вероятно могат да възникват и в отсъствие на първоначална „активираща“ мутация, що се отнася до честите такива. При пациентите, негативни за *EGFR* мутациите, не бяха открити мутации в *BRAF* гена. Използването на циркулираща туморна ДНК за анализ на мутации в гените *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EGFR* дават важна информация имаща значение при диагностика, проследяване и лечение на колоректалния карцином, недребноклетъчен белодробен карцином и други онкологични заболявания. Въпреки това адекватното тълкуване на анализите от молекулярно-генетичните тестове изисква стандартизиране на използваните процедури и технологии за изолиране и количествено определяне на изследваните генетични варианти.

Научни публикации и прояви:

- Mihaylova Z, Kirov A, Petrova V, et al. KRAS mutation status on cell-free DNA monitoring in colorectal cancer patients with liver metastases, First Balkan Conference of Personalized Medicine, Best Western Expo Sofia Hotel, Sofia 26-27.10.2017, p.20

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 3-С/2016 Молекулярно-генетичен анализ на вирулентността, резистентността и епидемиологията на български клинично-значими изолати *Streptococcus pyogenes*

Изследователски екип: Доц. Райна Цветанова Гергова, дм

- Чл.-кор. Проф. Иван Митов, дм, дмн
- Доц. Румяна Марковска, дм
- Адиле Мухтарова, докторант
- Доц. Радка Кънева, дб
- Калина Михова

Базова организация: Катедра по медицинска микробиология, ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: От всички тествани 200 ДНК от *S. pyogenes* се доказва, че те носят типичните за GAS гени *speB*, *supSEP*, *sdaB*; повече от 80%, *mac* и *smeZ*; последвани от *speJ*, *speG* и гени за ДНК-зите *sdc*, *sdaD*, *Spd3*. Гените *speA*, *speF*, *speL* и *speM* или техните комбинации се откриват по-често в инвазивни изолати ($p < 0,05$), отколкото при неинвазивни. Минималните инхибиращи концентрации (MIC) на еритромицин, азитромицин, кларитромицин, клиндамицин са определяни чрез E-тестове. Почти 23% от изолатите GAS, изолирани през 2013-2014 и близо 40% от тях през 2015-2016, съдържат различни елементи на антибиотична резистентност. Преобладаващите в близо 60% от устойчивите на макролид щамове са *mef (A)* и *msr(D)* гените, които кодират ефлуксна помпа (M-фенотип). Следващият често преобладаващ механизъм е комбинация от *mef (A)* и *erm (B)* в 23%, което определя високо ниво на резистентност от индуктивен или конститутивен тип срещу макролиди, линкозамиди и стрептограмини (iMLSb или cMLSb). Най-високата стойност на MIC ($> 256 \text{ mg / L}$) е открита във връзка с *erm (B)* ($p < 0,05$). Много по-високи MIC стойности са наблюдавани в изолатите с комбинации от гени за резистентност спрямо тези с *mef* гени самостоятелно ($p < 0,05$). Голямо разнообразие от видове *erm* в изследваните български изолати на GAS с неинвазивни инфекции от 2015 до 2016 Инвазивните изолати са само от ем. 1, 3, 4, 12 и ем 28. Само *erm 3* силно корелира с инвазивни български изолати ($p < 0,05$). Най-преобладаващите типове в двете групи са *erm 3* и *erm 1*. Тяхната висока честота в нашата страна е тревожна, защото те имат ревматогенен ефект. Това е първото проучване за разпространението на *erm* генотиповете, които циркулират в България. Развитието на това епидемиологично проучване може да помогне за изясняването на патогенезата на заболяванията, причинени от GAS и да окаже помощ при разработването на ваксини.

Научни публикации и прояви:

- Гергова Р, А Мухтарова, И Митов, Арсенал от антибиотична резистентност и вирулентност на *Streptococcus pyogenes*. 15 Конгрес по Микробиология и Инфекции на БАМ, София, България, 18-20 май, 2017, стр.15.

- Gergova R, A Muhtarova, R Markovska, et al. Distribution of EMM genotypes in Bulgarian clinical significant isolates *Streptococcus pyogenes*. A pilot study. 10th Balkan Congress of Microbiology Microbiologia Balkanica '2017 Sofia, Bulgaria. Nov 16–18, 2017. MM-19 pp.33.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 4-С/2016 Серумен хепсидин и корелацията му с показатели за оценка на оксидативен стрес при невродегенеративни заболявания

Изследователски екип: Доц. Савина Петрова Хаджидекова, дм

- Гл. ас. Виктор Манолов, дм
- Гл. ас. Мария Петрова, дм
- Чл.-кор. Проф. Лъчезар Трайков, дмн
- Проф. Камен Цачев, дмн

Базова организация: Катедра по медицинска генетика, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В хода на проекта са използвани различни методологични подходи за диагностика на невродегенеративно заболяване, както и оценка на желязния статус при изследваните пациенти. Чрез имунологичен ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) метод с осъществяване на специфичен комплекс антиген-антитяло, отчитан спектрофотометрично се определи количествено серумен хепсидин в серум при пациенти с невродегенеративно заболяване. Чрез турбидиметричен метод се изследва С-реактивен протеин за установяване на възпаление, трансферин и разтворими трансферинови рецептори – за оценка на степента на нарушена обмяна на желязо, серумен феритин – за оценка нивото на натрупване на желязо в депата при пациенти с невродегенеративно заболяване. Пламъков атомно-абсорбционен спектрометричен FAAS (Flame atomic absorption spectrometry) и Електротермичен атомно-абсорбционен спектрометричен ETAAS (Electrotermic atomic absorption spectrometry) методи са използвани за оценка статуса на не-ензимен антиоксидантен баланс чрез определяне на Se, Zn, Cu. За оценка статуса на ензимен антиоксидантен баланс се използва имунологичен ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) метод чрез измерване нивата на глутатион пероксидаза (GPX) и супероксид дисмутаза (SOD). Получените резултати са сравнени с набор от вече известни стойности при контролна група. Подбрана е група от 79 пациента, диагностицирани с невродегенеративно заболяване от специалист – невролог в УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по неврология и с наличие на промени в желязния статус, установено чрез изследване на показателите общ брой еритроцити, цитометрични показатели – MCV, MCH, MCHC, хемоглобин, С-реактивен протеин, серумно желязо и ТЖСК, серумен трансферин, феритин и разтворими трансферинови рецептори извън съответните нормални граници за пол и възраст. Получените резултати са обработени чрез съответните статистически методи за определяне на значимост. Включените пациенти с невродегенеративно заболяване са на средна възраст 57.3 – 67.2 г. Установи се статистически значимо повишено ниво на серумен хепсидин при пациенти с невродегенеративно заболяване ($75.95 \pm 20.67 \mu\text{g/l}$ – общо за четирите нозологични единици) спрямо контролната група ($15.35 \pm 6.45 \mu\text{g/l}$), $P < 0.001$. Серумните нива на SOD ($18.26 \pm 0.88 \mu\text{g/ml}$) и GPX ($7.74 \pm 0.57 \text{ ng/ml}$) са статистически значимо понижени спрямо

контролната група ($128.3 \pm 10.9 \mu\text{g/ml}$) и ($40.8 \pm 2.1 \text{ ng/ml}$), респ. което потвърди дефицит на ензимна антиоксидантна защита при пациенти с невродегенеративно заболяване; $P < 0.001$. Концентрацията на селен при пациенти с невродегенеративно заболяване ($243.79 \pm 11.51 \text{ nmol/l}$) е понижена спрямо включената контролна група ($978.4 \pm 41.1 \text{ nmol/l}$), което показва дефицит на не-ензимна антиоксидантна защита, $P < 0.001$. Концентрациите на цинк ($35.47 \pm 1.43 \mu\text{mol/l}$) и мед ($31.34 \pm 1.14 \mu\text{mol/l}$) са повишени спрямо включената контролна група ($17.8 \pm 1.7 \mu\text{mol/l}$) и ($18.4 \pm 2.6 \mu\text{mol/l}$), респ., което показва натрупването на двата микроелемента в организма при пациенти с невродегенеративно заболяване; $P < 0.001$. При пациенти с невродегенеративно заболяване се установи: значителна положителна корелация между серумен хепсидин и желязо ($r = 0.740$; $P < 0.001$). Зависимостта между серумен хепсидин и феритин ($r = 0.770$; $P < 0.05$) е положителна. Изследваният серумен хепсидин корелира значително отрицателно с нивата на селен ($r = -0.780$; $P < 0.001$). Корелациите между серумен хепсидин и цинк ($r = 0.952$; $P < 0.005$), и между хепсидин и мед ($r = 0.836$; $P < 0.005$) показват значителна положителна степен при невродегенеративно заболяване. Установи се значителна отрицателна корелация между серумен хепсидин и SOD ($r = -0.843$; $P < 0.001$), и между хепсидин и GPX ($r = -0.821$; $P < 0.001$) при пациенти с невродегенеративно заболяване. Установи се статистически значимо повишение на серумните нива на хепсидин при пациенти с невродегенеративно заболяване, което обуславя свръхнатрупването на желязо в мозъчната тъкан. Медирианият оксидативен стрес от желязото предизвиква развитие на невродегенеративни заболявания. Определянето на серумен хепсидин е все още новост в клинично-лабораторната практика. Резултатите, получени от настоящето проучване допринасят за изясняване ролята на хепсидина при невродегенеративни заболявания и подпомагат диагностичното уточняване и изборът на подходящ терапевтичен подход при лечението им. Установена е връзката между хепсидина и серумните концентрации на GPX, SOD, Se, Zn, Cu, както и показателите на железен статус. Нивото на хепсидина може да отдиференцира пациенти с функционален дефицит на желязо от такива с ретикуло-ендотелна блокада. В тези случаи количественото определяне на серумния хепсидин може да послужи за индиректна оценка на степента на натрупване на желязо в организма, да предостави информация за ефикасността на терапията на основното заболяване и да алармира в случай на токсично свръхнатрупване. Количественото определяне на хепсидин допринася за по-пълно изясняване на механизма на оксидативния стрес в резултат на нарушена обмяна на желязото при невродегенеративни заболявания. Необходимо е въвеждането на изследване на хепсидин в серум като маркер за ранна диагностика на нарушената обмяна на желязото, водещ микроелемент в патогенезата на невродегенеративните заболявания.

Научни публикации и прояви:

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Med Rev* 2017;53(2):9-15.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. The role of iron homeostasis in Alzheimer's disease. *HSOA J Alzheimers Neurodegener Dis* 2017, 3:011.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Parkinson's disease and iron homeostasis, connection through hepcidin. *Clin Chem and Lab Med*. 2017;55, issue s1.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin levels in Alzheimer's disease. *Clin Chem and Lab Med*. 2017;55, issue s1.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Neurodegenerative diseases – a link to hepcidin quantification. *Clin Chem Lab Med* 2017;55, Special Suppl, pp S1262 – S1263

- Manolov VE. Hcpidin – physiological and clinical significance. Stenobg. Steno, Varna. 2017. 158 pp
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Parkinson’s disease and iron homeostasis, connection through hepcidin. 22nd IFCC-EFLM Eur Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine & 25th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF). 11-15.06.2017, Athens, Greece
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin levels in Alzheimer’s disease. 22nd IFCC-EFLM Eur Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine & 25th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF). 11-15.06.2017, Greece
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Iron homeostasis and hepcidin quantification in Alzheimer’s disease patients. 4th Int Conference on Neurodegenerative Disorders and Stroke. 05-06.07.2017, Frankfurt, Germany
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Parkinson’s diseases and oxidative stress (preliminary study). 3rd Neurological Disorders Summit. 06-08.07.2017, USA
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Evaluation of serum hepcidin and Apolipoprotein E in Alzheimer’s disease. 6th Int Conference on Neurology and Neuromuscular Diseases. 24.07.-26.07.2017, Rome, Italy
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Some clinical conditions with increased serum iron. Xth National Congress for Clinical Laboratory. 07.09.-09.09.2017, Bulgaria
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Hcpidin quantification in neurodegenerative diseases. 8th Int Conference on Dementia and Dementia Care. 18-19.09.2017, Ireland
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Neurodegenerative diseases – a new view through iron homeostasis. 17th Global Neuroscience Conference. 16-17.10.2017, Japan
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Neurodegenerative diseases – a link to hepcidin quantification. 23rd Int Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC World Lab 2017). 22.10.-25.10.2017, Durban, South Africa
- Manolov V, Petrova J, Hadjidekova S, et al. Iron Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinson’s Disease. Metabesity 2017. 30-31.10.2017, London, UK
- Manolov V, Petrova J, Hadjidekova S, et al. Hcpidin quantification in patients with amyotrophic lateral sclerosis. World Congress on Biotechnology and Biological Studies (WCBBS). 09-11.11.2017, New Delhi, India
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Evaluation of serum hepcidin concentrations in Parkinson’s disease patients. XXII World Congress on Parkinson’s Disease and Related Disorders. 12-15.11.2017, Ho Chi Mihn City, Vietnam

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 5-С/2016 Ролята на някои защитни механизми в слюнката при развитието на протезен стоматит у пациенти, с цели протези, подплатени с еластични материали на силиконова основа

Изследователски екип: Чл.-кор. Проф. Иван Гергов Митов, дмн

- Проф. Божидар Йорданов
- Ас. Мариана Янкова

- Доц. Валентин Лозанов, дб
- Доц. Весела Райкова
- Ас. Радослав Байкушев

Базова организация: Катедра по Медицинска микробиология ул. Здраве 2, София, 1431

РЕЗУЛТАТИ: Беше изследвана слюнката на 43 изцяло обеззъбени пациента на възраст от 48-90 години (средна възраст 68.4 ± 9.94). Целта на това изследване беше да се определи ролята на защитните механизми на слюнката за развитието на протезен стоматит при пациенти, лекувани с цели протези, подплатени с еластични силиконови материали. За определяне на вида и количеството на *Candida* spp. в обща нестимулирана слюнка бяха използвани следните методи – култивиране на клиничен материал на твърди и течни хранителни среди за доказване на микотичен причинител; ферментационни и асимилационни тестове за идентификация на различни видове *Candida* spp, спектрофотометричен анализ и полимеразно верижна реакция за доказването на *Candida* spp. За определяне нивата на LF и sIgA бяха използвани ELISA китове, а за определяне нивата на слюнчения поток, рН и буферният капацитет – Saliva Check-Buffer. След протезиране на третия и на шестия месец бяха установени повишени количества на *C. tropicalis* при пациенти от групи А и В, в слюнката на които беше установен протезен стоматит с изолация предимно на *C. tropicalis* (54%) в количества над 10^4 CFU/ml. Присъствието на *C. tropicalis* в слюнката при този тип протезиране създава предпоставка за развитието на труднолечими кандидози. Получените от нас резултати показват, че протезирането с материали, използвани в групи В и С повлиява специфично имуномодулиращото действие на LF и на sIgA в слюнката, докато протезирането с материали в група А, не води до промени в слюнчените нива на LF и sIgA. Установени бяха също статистически значими по-ниски нива на слюнчения ток преди протезиране при пациенти, които развиват протезен стоматит след протезиране и тенденция към понижаване на нивата на рН и буферен капацитет шест месеца след протетично лечение с конвенционални и двуслойни цели протези.

Научни публикации и прояви:

- Yankova M, Yordanov B, Baykuchev R, et al. Presence of *Candida* spp. in the saliva of patients with complete dentures, lined with silicone-based elastic materials. J of IMAV. 2017; 23(4)
- Янкова М, Йорданов Б, Митов И. Промени в слюнката при пациенти, лекувани с двуслойни цели протези, във връзка с развитието на протезен стоматит. Проблеми на денталната медицина. 2017; 43(2)

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 6-С/2016 Участие на високорискови типове папиломни вируси в развитие на простатен карцином и/или преканцерозни състояния

Изследователски екип: Гл. ас. Биляна Георгиева Георгиева, дб

- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн
- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дб, дбн
- Анита Кавръкова, дб

Базова организация: Катедра по Медицинска химия и Биохимия, ул.Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на разработката е изследване на неинвазивни уринни проби при суспектни за простатен карцином пациенти с панел, съдържащ *PCA3*, *TMPRSS2-ERG* фузии и *GSTP1* промоторно хиперметиране. В допълнение проверихме уринни проби за присъствие на високо-рискови човешки папиломни вируси (ЧПВ), като възпалителен кофактор в патогенезата на ПК. Бяха изследвани 50 пациента със завишени ПСА нива и/или физиологични симптоми. При повечето пациенти бяха открити отклонения в молекулния профил: неопластичен *GSTP1* алел, *PCA3* силно завишена експресия или свръхекспресия. Позитивен *TMPRSS2-ERG* статус беше детектиран само в 4 случая. Високо-рискови ЧПВ бяха детектирани в ~ 35 % от уринните проби, получени от пациенти с висок риск от развитие на ПК на база молекулен профил. Около 96% от детектираните високо-рискови ЧПВ са: 16, 33, 35, 31, спадащи към подгрупата с най-висок онкогенен потенциал и експериментално доказана асоциация със злокачествената трансформация на простатен епител. Честотата на разпространение на високо-рискови ЧПВ в контролната група мъже с полово-предавана уротелиална инфекция е значително по-ниска (11%). Патологичните находки от изследването на цитологичните препарати на ЧПВ позитивни пациенти показаха: възпаление, адаптационни изменения на клетъчен растеж и диференциация и частичен вирусен цитопатичен ефект. В някои пациенти бяха регистрирани морфологични изменения, кореспондиращи с преканцерозно състояние (увеличен брой примитивни клетки с нарушено съзряване, уголемени, хиперхромни ядра и кондензиран хроматин). Детектираните молекулни отклонения бяха потвърдени на клетъчно ниво с цитологични находки за високо степенни изменения, включително рак: неравномерно разпределена хроматинова текстура, неправилна, деформирана ядрена мембрана и сгъстяване, високо ядрено:цитоплазмено съотношение, идентични нуклеоли, представени във всички клетки в група, туморна диатеза. Настоящата разработка представя нови данни за българските пациенти с висок риск от развитие на ПК.

Научни публикации и прояви:

- Kavrakova A, Todorova A, Anachkov K, et al. Presence of high risk Human Papilloma Viruses in noninvasive urine samples with molecular profile fluctuations for prostate cancer, cytologically confirmed. 12th Balkan Congress of Human Genetics, 8-11 Sep 2017, Plovdiv, Bulgaria. p. 22.
- Kavrakova A, Todorova A, Anachkov K, et al. Investigation of noninvasive urine specimens with molecular profile fluctuations for a presence of high-risk Human Papilloma Viruses as an inflammatory cofactor in the complicated origin of prostate cancer. Global Congress on Prostate Cancer 28-30 June 2017, Lisbon, Portugal.
- Kavrakova A, Georgieva B, Anachkov K, et al. Investigation of noninvasive urine specimens with molecular fluctuations for a presence of high-risk Human Papilloma Viruses as an inflammatory cofactor in the prostate cancer. *Biology and Medicine*, 2018,10, Issue 3,

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 7-С/2016 Изследване на трансдукционните механизми, регулиращи пролиферацията на стволовите епидермални кератиноцити

Изследователски екип: Гл. ас. Николай Димитров Ишкитиев, дм, дб

- Доц. Мария Драгнева, дб
- Розалия Циканделова
- Ас. Зорница Михайлова
- Марина Митева, студент
- Стелиана Ташкова, студент
- Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

Базова организация: МФ, Катедра Медицинска химия и биохимия, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Обект на изследване на настоящия проект са човешките епидермални кератиноцити и в частност онази малка част от тях, която съхранява характеристиките на стволовите клетки на епидермиса. За да анализираме тези клетки, проведохме магнитна сепарация, използвайки два маркера - интегрин $\alpha_6\beta_4$, рецептор за ламинин и CD71, рецептор за трансферин. В резултат на тази двустъпална сепарация получихме три клетъчни фракции - $\alpha_6\beta_4^-$ (клетки, отключили програмата си за диференцировка), $\alpha_6\beta_4^+ CD71^+$ (транзитно делящи се клетки) и $\alpha_6\beta_4^+ CD71^-$ (стволово клетъчна фракция). С това постигнахме първата част от поставената цел на този проект – успешно отделихме фракцията от стволови клетки на епидермиса. Доказахме характеристиките на клетките от всяка фракция посредством анализ на разпределението на клетките по фази на клетъчния цикъл. Така установихме, че $\alpha_6\beta_4^-$ кератиноцитите са предимно неделящи се клетки, $\alpha_6\beta_4^+ CD71^+$ са активно пролифериращи, а $\alpha_6\beta_4^+ CD71^-$ са с типични характеристики на стволови клетки – около 2/3 от тях в G1 фазата на клетъчно делене. За да изследваме наличието на белтъчни молекули, които имат специфична експресия във фракцията на стволовите, сравнени с транзитно пролифериращите кератиноцити, проведохме двуизмерна гел електрофореза. Открихме седем различно експресирани белтъци в стволови спрямо транзитно пролифериращи кератиноцити. Предстои ни да подложим тези кандидат протеини на мас спектрален анализ. Идентифицирането на белтъците, чиято експресия е различна в анализираниите от нас фракции би ни насочило към конкретни функционални молекули, към които да насочим нашите изследвания в бъдеще. Резултатите от нашето изследване имат както научен, така и практически принос - да контролираме процеси в кожата, свързани с нейната по-бърза регенерация след нараняване, предотвратяване на формирането на фиброзна тъкан, избиране на подходящи методи за изследване и евентуално лечение на туморни образувания с епидермален произход. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 8-С/2016 Нов подход за изследване на локализацията на медикаментозно индуцирани невродегенеративни процеси в мозък на плъх посредством диференциална сканираща калориметрия

Изследователски екип: Проф. Борис Гоцев Тенчов, дф, дбн

- Гл.ас. Силвия Абарова, дф
- Гл.ас. Любомир Трайков, дб
- Доц. Роман Ташев, дм
- Доц. Любка Танчева, дф

- Д-р Атанас Славов
- Александра Маринкова, студент
- Анелия Зашева, студент
- Стела Захарина, студент
- Анастасия Джамбазова, студент

Базова организация: Катедра Медицинска Физика и Биофизика, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Разработен е нов, основан на ДСК подход за изследване на локализацията на медикаментозно индуцирани невродегенеративни нарушения в мозъка на плъх. В работата са използвани 3 различни животински модела – скополамин- и стрептозотоцин-индуцирани модели на деменция от АБ тип и предизвикани с 6-хидроксидопамин нарушения от ПБ тип. Доколкото ни е известно, това изследване е първото в света, в което са регистрирани денатурационни профили на протеома от различни дялове на мозъка на животни (плъхове Wistar). Посредством ДСК са регистрирани също и термограмите на цереброспинална течност и на кръвна плазма на плъховете за идентифициране на промените в техните протеоми при невродегенеративните процеси. Термограмите, получени за отделните мозъчни дялове, съществено се различават в ред случаи, което позволява да се заключи, че разработеният подход е перспективен и дава интересни нови сведения за локализираните промени в протеома на различните мозъчни дялове при невродегенеративни нарушения. Особено голям интерес представляват следните нови резултати: Скополаминът предизвиква обратни по знак промени в позициите на екзотермите в протеома на кортекса и стриатума, които благоприятно се повлияват в посока на възстановяване на нормата при третиране с БАВ с протекторно действие. Тези БАВ не оказват обаче влияние върху предизвиканите от скополамина промени в екзотермите на хипокампуса; Стрептозотоцинът не променя съществено термограмите на кортекса, хипокампуса и церебелума, които остават подобни една на друга и на тези в контролите, но влияе съществено върху термограмата на стриатума; Индукторът 6-хидроксидопамин, приложен в стриатума на дясната хемисфера, води до големи различия между лява и дясна хемисфера на мозъка и до появата на нови денатурационни преходи в дясната хемисфера, които ясно се визуализират в ДСК и в ИТК профилите; Индукторите скополамин и стрептозотоцин предизвикват големи промени в денатурационните профили на цереброспиналната течност, докато термограмите на кръвната плазма не се повлияват и остават практически същите, както в контролите.

Научни публикации и прояви:

- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, et al. A novel DSC Approach for evaluating protectant drugs efficacy against dementia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863(11):2934-41.
- Tenchov B, Abarova S, Koynova R, et al. Low-Temperature Exothermic Transitions in Brain Proteome of Mice, Effect of Scopolamine. *Thermochim Acta* 2017, 650, 26–32.
- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, et al. New investigation of drug efficacy against scopolamine-induced dementia in mice using differential scanning calorimetry, The Royal Society Meeting "Of mice and mental health: facilitating dialogue between basic and clinical neuroscientists", Proceedings, Poster 1, 24-25 April 2017, London, Great Britain.
- Nizamova N, Abarova S, Traikov L, et al. Thermal denaturation profiles of brain proteome and blood serum of rats with drug-induced dementia. A DSC study, YES Meeting Abstracts, PS213, Porto Biomed. J. 2017;2(5):209

- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, et al. Differential Scanning Calorimetry Investigation of Drug Efficacy of Myrtenal Against Scopolamine-Induced Dementia In Rodents, Ежегодна научна конференция „Дни на науката 2017” на СУБ-Пловдив, България, 2-3 ноември 2017

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 9-С/2016 Комплексна оценка на характеристиките на глюкозния профил и сърдечно-съдовия риск при предиабетни състояния

Изследователски екип: Проф. Цветалина Иванова Танкова, дмн

- Проф. Георги Георгиев, дм
- Доц. Илияна Борисова, дм
- Гл.ас. Грета Грозева-Дамянова, дм
- Гл. ас. Невена Чакърлова, дм
- Гл. ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Гл. ас. Мария Бояджиева, дм
- Ани Годорова, докторант
- Мина Сердарова, докторант

Базова организация: Клиничен Център по ендокринология и геронтология, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването е да се направи оценка на глюкозната вариабилност при лица с предиабет и да се оцени връзката ѝ с оксидативния стрес и автономната функция. Изследвани са 50 лица, средна възраст 55.6 ± 9.7 години, среден ИТМ 28.4 ± 6.4 кг/м², разделени в 2 групи според глюкозния толеранс: 32 лица с предиабет и 18 с нормален глюкозен толеранс (НормГТ). Глюкозният толеранс е оценен с ОГТТ с изследване на серумна глюкоза по хесокиназен метод. Изследвани са имунореактивен инсулин по ECLIA метод, oxLDL и 5-Nitrotyrosine по ELISA метод. Индиректно са изчислени индекси за инсулинова резистентност и чувствителност. Изследван е HbA1c имунотурбидиметрично. Проведено е продължително глюкозно мониториране с професионален сензор FreeStyle LibrePro. В групата с предиабет се установяват значимо по-високи стойности на индексите за глюкозна вариабилност CV ($p < 0.041$), J-index ($p < 0.014$), CONGA ($p < 0.047$) и GRADE ($p < 0.036$). Времето в прицелния диапазон е значимо намалено ($p < 0.014$), а времето над прицелния диапазон – значимо увеличено ($p < 0.018$) при предиабет спрямо НормГТ. Сигнификантно по-високи са нивата на HbA1c ($p < 0.036$) и средна интерстициална глюкоза ($p < 0.025$) в групата с предиабет. Парасимпатиковият тонус при дълбоко дишане ($p = 0.009$) и симпатиковият тонус в покой ($p = 0.021$) и в хода на пробата Валсалва ($p = 0.026$) са значимо намалени в групата с предиабет. Симпатиковата активност е свързана със SD при участниците с предиабет ($F [1,31] = 7.91$, $p = 0.018$); докато парасимпатиковата активност - с J-index и времето над прицелния диапазон при лицата с предиабет ($F [1,31] = 7.20$, $p = 0.004$) и с индекса CONGA при еугликемичните лица ($F [1,18] = 6.75$, $p = 0.025$). Липсва сигнификантна корелация между автономния тонус и маркерите за инсулинова резистентност и оксидативен стрес. При предиабет се наблюдава значимо повишение както на средната глюкозна концентрация, така и на глюкозната вариабилност. Изследването на глюкозната

вариабилност вероятно има допълнителна роля в оценката на глюкозната хомеостаза още на този ранен етап на отклонения и вероятно е допълнителен рисков фактор за автономна дисфункция.

Научни публикации и прояви:

- Танкова Т, Димова Р, Чакърова Н и др. Оценка на глюкозната вариабилност при лица с предиабет. Ендокринология брой 2/2018
- Chakarova N, Dimova R, Grozeva G, et al. Assessment of glucose variability in subjects with prediabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2019; 151:56-64.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор 10-С/2016 Дизайн и антихолинестеразна активност на нови инхибитори на ацетилхолинестеразата – четвърти етап

Изследователски екип: Проф. Ирини Атанас Дойчинова, дхн

- Гл. ас. Георги Ставраков
- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Ива Вълкова
- Венцислав Йорданов, докторант

Базова организация: Катедра Химия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Проведен е виртуален скрининг чрез молекулен докинг върху ензима ацетилхолинестераза (AChE) на базата данни ZINC, съдържаща над 6 млн. лекарствени и лекарство-подобни молекули. Получени са няколко съединения с високи стойности на оценъчната функция ChemPLP, по-високи от тази на GAL. В настоящия етап на проекта, четирите съединения с най-високи ChemPLP стойности са закупени и тествани за афинитет към AChE, невротоксичност и пермеабилитет през кръвно-мозъчна бариера (КМБ) и чревна лигавица. Получените резултати показват, че и четирите нови съединения проявяват афинитет към AChE в наномоларни концентрации, три от тях са нетоксични в концентрации до 100 µM, всички имат добър пермеабилитет през КМБ и чревна лигавица. Анализирани са взаимодействията между инхибиторите и ензима. Трите нетоксични съединения са потенциални родители на нови серии производни-инхибитори на AChE. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 11-С/2016 Разработване на системен подход на база високоразделителна мас спектрометрия и биоинформационен анализ за доказване произход на растителни екстракти-приложение при *Portulaca oleracea* L. (тученица)

Изследователски екип: Доц. Ренета Славова Гевренова, дф

- Доц. Валентин Лозанов, дб
- Гл. ас. Силвия Русева, дх
- Гл. ас. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб
- Гл. ас. Ирина Лазарова, дх

- Мирена Ценова, студент
- Раяна Динкова, студент

Базова организация: Катедра Фармакогнозия, ул. Дунав 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проучването е да се разработи системен подход основан на ултра високо-ефективна течна хроматография (UHPLC), комбинирана с високоразделителна прецизна мас спектрометрия (HRAMS) и биоинформационни методи за анализ на 33 проби от *Portulaca oleracea* L. (тученица) (Portulacaceae), произхождащи от 13 флорални района от България и 5 проби с гръцки произход. Използвана е микровълнова екстракция на растителния материал с екстрагент 0.1% мравчена киселина. Анализирани са LC-MS метаболомните „отпечатъци“ на изследваните проби и е създадена метаболомна база данни за вида. LC-MS данните са обработени със софтуерен пакет Compound Discoverer 2.1.0.308, Trial version (Thermo Sci., USA). Разликите между Северна България vs Южна България, Северна България vs Гърция и Южна България vs Гърция са установени чрез Анализ на главните компоненти (PCA), комбиниран с дескриптивен и диференциален анализ. Установено е, че няма статистически значима разлика между изследваните български проби, докато 49 маркерни метаболити са намерени в диференциалния анализ между България и Гърция. На основата на точните маси (с масов толеранс 1 ppm), времената на задържане, сравняване със стандартни субстанции и литературни данни, тези вторични метаболити са идентифицирани след подробен анализ на Volcano-графиките. За първи път се съобщават 37 метаболити. Идентифицираните съединения са използвани за изследване на биогенетичния път на вторичните метаболити в тученица, използвайки софтуерна платформа KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Използването на статистическа обработка на данните може да послужи за идентифициране на маркери за разграничаване на произхода на набор от проби. Комбинацията на LC-MS данни с многовариантен статистически анализ доказва ефективността си в изследването на метаболити от тученица и интегрира фитохимичният състав с географският произход.

Научни публикации и прояви:

- Gevrenova R, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V et al. A liquid chromatography–high resolution mass spectrometry – based approach combined with bioinformatic analysis to integrate chemistry with geographical origin: application in the study of *Portulaca oleracea* L. (purslane). 3rd Int Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Bansko, Bulgaria, 18 - 21 Oct, 2017. p. 184
- Arnaudov P, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V et al. Bioinformatics inside on Bulgarian *Portulaca oleracea* (purslane). 2nd Int Biomedical Congress. Sofia, Bulgaria, 17-19 Nov, 2017.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор 12-С/2016 Влияние на половите хормони върху субгингивалната микрофлора и пародонталното здраве при деца през пубертета

Изследователски екип: Проф. Христина Лазарова Попова, дм

- Проф. Мая Рашкова, дм
- Гл.ас. Надежда Митова, дм
- Ас. Антон Козаров

- Ас. Величка Досева-Панова, дм

Базова организация: Катедра Детска дентална медицина, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването беше да се проучат микроорганизми от субгингивалния биофилм при деца с и без плаково индуциран гингивит, както и влиянието на половите хормони върху пародонта. Обект на изследването бяха 60 деца на възраст между 10 и 14 години, разпределени в две групи: - 30 деца без гингивит (PBI Saxer & Mulheman < 25%), ОНI-GV = 0,56, HI O'Leary = 80,3% свободни от плака повърхности; - 30 деца с плаково индуциран гингивит (PBI Saxer & Mulheman > 50%), ОНI-GV = 2,15, HI O'Leary - 32,2%. Чрез PCR Real time бяха изследвани 9 контролни щама от сборна проба - *A.actinomycetemcomitans* (лилав комплекс), *P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia* (червен комплекс), *P.intermedia*, *P.micros*, *F.nucleatum*, *E.nodatum* (оранжев комплекс), *C.gingivalis* (зелен комплекс). Чрез течна хроматография с мас-спектроскопия бяха изследвани тестостерон при момчета и естрадиол и прогестерон при момичета на проби от слюнка. Непосредствено след пробива на постоянните зъби, при здрав пародонт и минимално количество плака се срещат микроорганизми с по-слаба патогенност (*P.intermedia*, *P.micros*-оранжев комплекс) и такива, необходими за инициране на процесите на коагрегация (*F.nucleatum*, *C.gingivalis*). При децата с гингивит, субгингивалната микрофлора се усложнява като се изолират микроорганизми от червения комплекс (*P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia*) и се повишава честотата на микроорганизмите от оранжевия комплекс (*P.intermedia*, *P.micros*, *F.nucleatum*, *E.nodatum*). Микроорганизмите се срещат в микробни асоциации от по 1 до 7 микроорганизма, като разнообразието нараства при децата с гингивит. С възрастта субгингивалната екосистема се усложнява, като се повишава честотата на патогенните микроорганизми от червения комплекс. Нивата на изследваните полови хормони в слюнка показват слаби количествени промени, като единствено естрадиолът при момичетата показва по-високи стойности при гингивално възпаление.

Научни публикации и прояви:

- Митова Н, Рашкова М, Попова Х. Микробни асоциации от субгингивални микроорганизми при деца с плаково индуциран гингивит. Проблеми на денталната медицина, 2017;43(2):71-78
- Mitova N, Rashkova M, Popova H. Subgingival microbiota during the process of formation of permanent dentition. Folia Medica, 2018
- Митова Н, М Рашкова, А Козаров. Субгингивална микрофлора в процеса на формиране на постоянно съзъбие – 17-ти научен конгрес на БЗС, 15-17 юни 2017, Бургас, 65 стр

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

Договор 13-С/2016 Пилотно проучване на цитокиновия профил при пациенти, лекувани с дентални имплантати

Изследователски екип: Проф. Ангелина Илиева Киселова-Янева, дмн

- Акад. Проф. Богдан Петрунов, дмн – БАН, НЦЗПБ
- Доц. Георги Николов, дм – НЦЗПБ
- Доц. Мая Ляпина, дм

- Проф. Мариела Янева-Деливерска, дмн
- Проф. Мария Николова, дмн – НЦЗПБ
- Радослава Грозданова, дм – НЦЗПБ
- Йордан Гълъбов, докторант

Базова организация: Катедра "Образна и орална диагностика", ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Цел на настоящето проучване бе да се определят серумните нива на про-инфламаторни цитокини, медиращи възпалителните и остеолитични процеси при периимплантита: интерлевкин 1 (IL-1), тумор некротичен фактор алфа (TNF- α), интерлевкин-17 (IL-17) и интерлевкин-22 (IL-22) при пациенти, лекувани с дентални импланти и при лица с предполагаема или доказана сенсibiliзация към дентални материали. Измерването на серумните нива на цитокините се извърши с търговски ELISA китове, съгласно инструкцията на фирмата-производител. Проведе се епikutанно тестване с Ti, TiO₂, Titanium(III)nitride и Titanium(III)oxalate decahydrate. Извърши се количествено определяне на алерген-специфичен IgE в серум срещу панел инхалаторни и хранителни алергени чрез EUROIMUN. Бяха обхванати общо 100 лица: - основна група от 49 пациенти, лекувани с дентални импланти, от които 26 без реакции на отхвърляне и периимплантит и 23 – с периимплантит; - контролна група от 51 лица, от които 32 със сенсibiliзация към дентални материали и 19 без данни за алергия от различен пол, възраст и професии. Установихме достоверна по-високи средни серумни нива на TNF- α при пациентите без дентални импланти и със сенсibiliзация към дентални материали спрямо тези, лекувани с дентални импланти без реакции на отхвърляне и периимплантит. Честота на сенсibiliзация към титаниевите алергени бе ниска във всички групи пациенти, без достоверни разлики. Най-висока бе честотата на сенсibiliзация към Titanium(III)nitride, особено при пациентите с периимплантит. При отделни пациенти с IgE-медирана алергия и титанови импланти се установиха повишени нива на някои от изследваните цитокини (TNF- α и IL-22). При трима от установените 4 пациенти с IgE-медирана алергия и титанови импланти, на фона на повишени нива на един или два от изследваните цитокини, се установяват и положителни кожно-алергични проби към титаниевите соли. В заключение, не установихме достоверни разлики в серумните нива на цитокините при пациентите с титаниеви импланти, което не дава възможност за по-категорични заключения относно тяхната клинична значимост. Предполагаме, че освобождаването на про-инфламаторни медиатори отразява "нормален" неспецифичен отговор при пациентите, експонирани на Ti частици.

Научни публикации и прояви:

- Lyapina M, Cekova M, Deliverska M, et al. Immunotoxicological aspects of biocompatibility of titanium. J of IMAB. 2017;23(2):1550-1559.
- Lyapina M, Cekova M, Nikolov G, et al. Pilot study of serum proinflammatory cytokone levels in patients treated with dental implants. Intern J Curr Adv Res. 2018;7(4D):11555-11558.
- Lyapina M, Cekova M, Nikolov G, et al. Pilot study of serum proinflammatory cytokone levels in patients treated with dental implants. 28-th Annual Assembly of IMAB. 13 - 16 May 2018.

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2017”

Договор Д-232/15.12.2017 Чревно носителство на широкоспектърни бета-лактамаза и/или карбапенемаза-продуциращи *Enterobacteriaceae* при хоспитализирани, амбулаторни пациенти и здрави хора - деца и възрастни

Изследователски екип: Доц. Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм

- Проф. Теменуга Стоева, дм - МУ-Варна
- Петя Станкова
- Доц. Райна Гергова, дм
- Проф. Людмила Георгиева, дмн
- Калина Михова
- Проф. Радка Кънева, дб
- Проф. Мариана Мурджева, дм - МУ – Пловдив
- Проф. Магдалена Лесева, дм - УМБАЛСМ ”Н. И.Пирогов”
- Чл.-кор. Проф. Иван Митов, дмн

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска микробиология, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на настоящия проект беше да се проучат механизмите на резистентност и клоналната свързаност при широкоспектърни бета-лактамаза (ESBL) и/или карбапенемаза-продуциращи *Enterobacteriaceae*, изолирани от фецес на хоспитализирани, амбулаторни пациенти и здрави хора - деца и възрастни и да се сравнят с тези при клинични изолати карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*. Беше определена чувствителността чрез дифузионно-дисков метод и MIC strip метод, бяха използвани методи за доказване продукцията на ESBL и карбапенемази, AmpC и/или карбапенемази (при колекциониране на карбапенем-резистентни изолати). Изоелектрично фокусиране, bioassay и PCR за охарактеризиране на основните типове бета-лактамази, секвениране, PCR за определяне на основните механизми на плазмидната хинолонова резистентност, плазмидно типирание, епидемиологично типирание чрез ERIC-PCR и MLST. В заключение, при 105 клинични изолата от 8 болници от 4 града в България – София, Варна, Пловдив и Плевен установихме продукция на карбапенемази – KPC-2 (51%) и NDM-1(47%). KPC-2 продуциращите *K pneumoniae* принадлежаха на основно четири MLST типа – ST15, ST29, ST16, ST902 като при всички се установиха Inc FII плаزمиди. Почти всички NDM продуценти принадлежаха на ST11 типа. Тези продуценти бяха изолирани и от фецес на пациенти, хоспитализирани в участващите болници, което доказва възможността нормалната чревна флора да е резервоар за тези опасни микроорганизми. Процента на чревно носителство на изолати, резистентни на цефалоспорини трета генерация беше 28% (356 от 1255 изследвани), като този процент беше най-висок при деца и предимно при хоспитализирани деца – 54% и съответно беше най-нисък при здрави възрастни. Резистентността към цефалоспорини трета генерация се

дължеше на продукцията предимно на СТХ-М-15 ензими в 48%, последвано от СТХ-М-3 – 15%, хиперпродукция на AmpC – 14%, СТХ-М-14 – 6%. Комбинациите на colistin основно с rifampicin – в 36%, но също и с azithromycin, meropenem, doxycycline или gentamicin показаха синергичен ефект при карбапенем- и colistin - резистентни изолати *K. pneumoniae*.

Научни публикации и прояви:

- Marteva-Proevska Y, T Velinov, R Markovska, et al. Antibiotic combinations with colistin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* - *in vitro* assessment. J of IMAV. 2018;24(4):2258-66
- Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, et al. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Bulgarian hospitals - Interregional spread of ST11 NDM-1-producing *K. pneumoniae*. Infect Genet Evol. 2019;69:61-67.
- Marteva-Proevska Y, T Velinov, R Markovska, et al. High level of colistin resistant Gram-negative bacteria in a University Hospital in Bulgaria. CR Acad Bulg Sci., 2019
- Stankova P, R Markovska, T Stoeva, et al. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients in two hospitals in Varna and Sofia 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria, Hisarya 10-13.10. 2018

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-233/15.12.2017 Нови биохимични, генетични и клинични маркери за оптимизиране на диагностиката и мониторирането на неалкохолната стеатозна болест при пациенти със затлъстяване и предиабет

Изследователски екип: Проф. Здравко Асенов Каменов, дмн

- Проф. Людмила Владимирова, дмн
- Ас. Вера Карамфилова
- Гл. ас. Антоанета Гатева, дм
- Ирена Иванова, дм
- Проф. Асен Алексиев, дмн
- Ас. Надежда Милчева, дм
- Проф. Алексей Савов, дмн
- Надежда Янева
- Доц. Рая Иванова, дм
- Проф. Радина Иванова-Боянова, дм

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по вътрешни болести, УМБАЛ „Александровска”, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В проучването бяха включени 218 пациента, с ехографски установена чернодробна стеатоза разделени на две групи - *група 1* със затлъстяване без въглехидратни нарушения (n=135) и *група 2* със затлъстяване и предиабет (n=83). Средната възраст на участниците в проучването е 50,22±10,86 години. Установихме сигнификантно по-високи стойности на пентраксин 3 в групата на предиабет в сравнение с групата със затлъстяване (1877.03±895.45 vs. 2321.29±926,63 ng/ml, p=0.028). ELF-скорът и хиалуоновата

киселина, която е част от този показател, корелират умерено и правопрпорционално с дебелината интима-медиа и индекса за диабетна невропатия. WISP2 корелира умерено и правопрпорционално с индекса глезен-мишница, както и с вибрационния праг. Не се установи сигнификантна зависимост между пентраксин 3, WISP2 и ELF с изследваните два гена PNPLA3 и TM6SFL норми и варианти. В групата с предиабет се установи по-голям процент хетерозиготни носители на патологичните алели C>G и C>T и от двата изследвани гена в сравнение с групата без въглехидратни нарушения, където преобладават хомозиготните варианти на нормалните гени. По отношение на риска от възникване на въглехидратни нарушения, резултатите установиха, че при носителите на патологичния алел G в гена PNPLA3 спрямо нормалните хомозиготи, рискът за възникване на въглехидратни нарушения е около 9,6 пъти по-висок. При тези пациенти също така значително се увеличава и риска от инсулинова резистентност с 2,1 пъти в сравнение с нормалните хомозиготи. Дебелината на интима - медиа е със значимо по-висока средна стойност при C>G на PNPLA3. При носителите на патологичния алел C>T на гена TM6SF2 спрямо нормални хомозиготи, рискът за възникване на въглехидратни нарушения е около 3,9 пъти по-висок. По отношение на риска от метаболитен синдром при хетерозиготите C>G PNPLA3 спрямо нормалните хомозиготи е около 3 пъти по-висок. При хетерозиготите C>T TM6SF2 спрямо нормалните хомозиготи, риска за възникване на метаболитен синдром е около 8,4 пъти по-висок. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-234/15.12.2017 Остър панкреатит - оценка на тежестта на заболяването и ролята на ентералното хранене в терапевтичния процес

Изследователски екип: Проф. Борислав Георгиев Владимиров, дм.

- Проф. Бойко Коруков, дм
- Доц. Мая Белитова-Желязкова, дм
- Ас. Мила Ковачева-Славова, дм
- Д-р Станислава Керемидчиева-Христова

Базова организация: МУ - София, МФ, Катедра по гастроентерология, УМБАЛ “Царица Йоанна-ИСУЛ“, ул. Бяло море 8, София 1527

РЕЗУЛТАТИ: Ранното определяне тежестта на острия панкреатит (ОП) често бива клинично предизвикателство, а необходимостта от ранно ентерално хранене (ЕХ) е въпрос на дебат. Целта на настоящето изследване е да се проучи приносът на ранната оценка на системния възпалителен отговор посредством панел биохимични маркери (прокалцитонин, IL-6 и преалбумин), в допълнение към общоприетите методи с оглед оптимизиране на терапевтичния подход при пациенти с ОП. Тежестта на ОП се определи посредством ревизираните критерии от Атланта, APACHE-II, образни методи, рутинни лабораторни показатели и панелът биохимични възпалителни маркери. Пациентите с умерено тежък и тежък ОП проведеха ранно ЕХ. Проучването включва 120 пациента с ОП на средна възраст $53,21 \pm 15,9$ г., 61,67% бяха мъже. Водеща етиологична причина при жените бе билиопанкреатитът ($p=0,04$), а при мъжете алкохолната консумация ($p=0,01$). 52,50% от пациентите са с лек, 35,83% - с умерено тежък и 11,67% - с тежък ОП, независимо от пол, възраст и етиологичен фактор. 50% от изследваните имат APACHE-II

скор <3, а 2,5% имат >8. По-често се срещат локални усложнения при мъжете ($p=0,03$) и след алкохолен ексцес ($p=0,045$). 93,02% от получилите ЕХ ($n=57$) преминаха на хранене пер ос до 48 часа. Нежелани реакции и усложнения поради ЕХ наблюдаваме при 22,81%. Най-голяма полза от провеждане на ЕХ имат пациентите с тежък ОП и тези с WON/некроза и транзиторна мултиорганна недосатъчност. Антибиотично лечение при хоспитализацията започват 68,82% от провешите 93 пациента. Наблюдаваме значима правопрпорционална корелация между прокалцитонин и IL-6 помежду им и с CRP и обратнопропорционална корелация с преалбумин. Установиха се значимо по-високи нива прокалцитонин, CRP, IL-6 и по-ниски нива преалбумин при пациенти с мултиорганна недостатъчност, SIRS и с WON спрямо с псевдокисти. Степента на малнутриция (преалбумин) и средният болничен престой корелират с тежестта на ОП($p=0,04$). Смъртността бе 0,83%. Включването на панел биохимични маркери има потенциала да повиши специфичността при стартиране на антибиотична терапия и ЕХ, водещи до подобрене в изхода на заболяването.

Научни публикации и прояви:

- Ковачева-Славова М, Големанов Б, Генов Й, и др. Малнутритивен риск при пациенти с панкреасни заболявания. V Национален конгрес за млади гастроентеролози, София, България, Март 29-31, 2019
- Kovacheva-Slavova M, Genov J, Golemanov B, et al. Malnutrition screening in patients with pancreatic disorders. 51 Annual Meeting of the Eur Pancreatic Club, Bergen, Norway, Jun 25-29, 2019

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-235/15.12.2017 Оценка на връзката между хепсидин и феропортин с показатели за съдово-мозъчни атеросклеротични промени при пациенти с хронично бъбречно заболяване

Изследователски екип: Доц. Савина Петрова Хаджидекова, дм

- Гл. ас. Виктор Манолов, дм
- Гл. ас. Радослава Грозданова, дб - НЦЗПБ
- Акад. Проф. Лъчезар Трайков, дмн
- Проф. Юлия Петрова, дмн
- Проф. Камен Цачев, дмн
- Проф. Борис Богов, дм
- Проф. Евгений Възелов, дм
- Гл. ас. Георги Ангов, дм
- Доц. Мила Цанкова, дм
- Гл. ас. Мариета Караджова, дм
- Гл. ас. Мария Петрова, дм
- Ас. Ирен Петрова-Иванова
- Проф. Мария Николова, дмн - НЦЗПБ
- Тодор Кунчев, докторант
- Д-р Петър Желязков

Базова организация: МУ - София, МФ, Катедра по медицинска генетика, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Проучиха се серумните нива на хепсидин и се определи феропортиновата експресия в макрофаги при 28 жени и 32 мъже с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл.) и се проследи връзката им с показатели за съдово-мозъчни атеросклеротични промени. Получените резултати са сравнени с: 24 жени и 36 мъже с ХБЗ без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения, както и 30 жени и 30 мъже - поради очаквана промяна в част от показателите на хомеостазата на желязо, здрави доброволци без бъбречно заболяване и съдово-мозъчни атеросклеротични нарушения, установени с идентични клиничко-лабораторни и функционални изследвания. Установено е статистически значимо: Повишено серумно ниво на хепсидин при пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл.) с установени съдово-мозъчни атеросклеротични промени ($254.8 \pm 25.6 \mu\text{g/l}$) спрямо пациенти с ХБЗ без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения ($149.9 \pm 16.7 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. Количеството на хепсидин е увеличено и при двете групи пациенти спрямо здравите доброволци ($19.0 \pm 2.2 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. Повишени серумни нива на хомоцистеин и АДМА при пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл.) с установени съдово-мозъчни атеросклеротични промени ($23.6 \pm 2.9 \mu\text{mol/l}$ и $1.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$) спрямо пациенти с ХБЗ без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения ($20.1 \pm 1.5 \mu\text{mol/l}$ и $0.7 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$); $P < 0.05$. Количеството на хомоцистеин и АДМА е увеличено и при двете групи пациенти спрямо здравите доброволци ($1.9 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$ и $0.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$); $P < 0.001$. Серумното ниво на витамин В12 е статистически значимо понижено при пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл.) с установени съдово-мозъчни атеросклеротични промени ($25.7 \pm 6.1 \text{pmol/l}$) спрямо пациенти с ХБЗ без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения ($79.9 \pm 11.3 \text{pmol/l}$); $P < 0.005$. Количеството на витамин В12 е понижено и при двете групи пациенти спрямо здравите доброволци ($435.6 \pm 20.9 \text{pmol/l}$); $P < 0.001$. Повишени показатели за съдово-мозъчни атеросклеротични изменения (IMT и ABI) при пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл.) (1.20 ± 0.13 и 1.65 ± 0.11) спрямо пациенти с ХБЗ без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения (1.06 ± 0.13 и 1.59 ± 0.11); $P < 0.05$. И при двете групи пациенти показателите за съдово-мозъчни атеросклеротични изменения са повишени спрямо здравите доброволци (0.37 ± 0.09 и 1.15 ± 0.08); $P < 0.001$. При пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл.) с установени съдово-мозъчни атеросклеротични промени се откри значително понижена експресия на феропортин в макрофаги спрямо хепсидинова концентрация в серум; $P < 0.001$. Пациентите с ХБЗ без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения показва същата значимост между експресията на феропортин в макрофагите и серумни нива на хепсидин; $P < 0.001$. Установи се нарастване на серумните нива на хепсидин, хомоцистеин и АДМА при пациенти с ХБЗ (стадии II до V, вкл.) с съдово-мозъчни атеросклеротични изменения спрямо пациенти с ХБЗ (стадии II до V, вкл.) без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения, като средната степен на корелация $r=0.907$ при ниво на значимост $P<0.001$. Значимостта на нарастване на серумен хепсидин, хомоцистеин и АДМА при пациенти с ХБЗ с и без съдово-мозъчни атеросклеротични изменения спрямо здравата контролна група е $P<0.001$. Показателите за атеросклеротични изменения на а. carotis IMT и ABI също показва нарастване при пациентите пациенти с ХБЗ (от двете групи с и без АСИ) спрямо здравите доброволци; $P<0.001$. Установеното намаляване на нивото на витамин В12 и макрофагеланата експресия на феропортин при

пациенти с хронично бъбречно заболяване (ХБЗ) с и без атеросклеротични изменения на а. carotis (от двете групи) спрямо контролната здрава група показва степен на корелация $r=0.783$ с ниво на значимост $P<0.001$. Важно за клиничната практика е въвеждането на количествено определяне на хепсидин и феропортинова експресия в макрофаги като маркери за ранна диагностика на нарушената обмяна на желязото, микроелемент участващ в патогенезата на атеросклеротичните изменения на кръвоносните съдове при пациенти с хронично бъбречно заболяване (стадии II до V, вкл. и на хемодиализа). Двата показателя корелират с промените в ИМТ и АВІ при настъпващи атеросклеротични нарушения в организма. Повишено ниво на АДМА прогнозно се свързва с повишен риск от инсулт. Нивата на хепсидин и АДМА са едни от най-силните предиктори за стабилна и нестабилна ангина.

Научни публикации и прояви:

- Manolov V, Hadjidekova S, Grozdanova R, et al. Iron homeostasis and atherosclerotic changes in chronic kidney disease patients. *Modern Medicine* LXII (2/2018):47-62.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Evaluation of cognitive function in chronic kidney disease patients and its connection to serum hepcidin levels. *Orion Conferences on Neurology, Dementia & Alzheimer's disease*. 17-19.04.2018, Barcelona, Spain
- Manolov V, Hadjidekova S, Emilova R, et al. Atherosclerosis in chronic kidney disease patients is connected through hepcidin. *9th Annual World Congress of Neurotalk-2018 (NT-2018)*. 16-18.05.2018, Bangkok, Thailand
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Chronic kidney disease increases stroke cases; where is the hepcidin role? *4 Eur Stroke Organisation Conference (ESOC 2018)*. 16-18.05.2018, Gothenburg, Sweden
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Quantification of serum hepcidin in chronic kidney disease patients with atherosclerotic changes in a. carotis. *16th Annual Dialysis & Renal Medicine Conference*. 08-09.06.2018, Baltimore, USA
- Manolov V, Hadjidekova S, Emilova R, et al. Atherosclerotic changes and serum hepcidin levels in chronic kidney disease patients. *World Nephrology Congress*. 20-22.06.2018, Paris, France
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Correlation between IMT and serum hepcidin levels in atherosclerotic a. carotis changes in CKD. *22nd Biennial Meeting of the Int Society of Developmental Neuroscience*. 22-25.05.2018, Nara, Japan
- Manolov V, Hadjidekova S, Emilova R, et al. Atherosclerosis in chronic kidney diseases patients is connected through hepcidin. *2nd World Congress & Expo on Biotechnology and Bioengineering*. 25-27.06.2018, Dubai, UAE
- Hadjidekova S, Petrova I, Vasilev V, et al. Serum hepcidin in chronic kidney disease patients with atherosclerosis. *4 Annual World Pathology Conference (WPC-2018)*. 14-15.07.2018, Budapest, Hungary
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Atherosclerosis and changed iron metabolism in chronic kidney disease. *29 Conference on Public Mental Health and Neuroscience (World Mental Health 2018)*. 16-18.07.2018, Dubai, UAE
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. IMT correlates to serum hepcidin in atherosclerotic a. carotis changes in patients with chronic kidney disease. *27 Euro Global Neurologists Meeting*. 23-25.07.2018, Moscow, Russia

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Evaluation of iron homeostasis in chronic kidney disease patients with a. carotis atherosclerotic changes. 20 Edition of Int Conference on Clinical Nephrology. 06-07.08.2018, Madrid, Spain
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Evaluation of cognitive function disorders and connection to iron homeostasis in patients with chronic kidney disease. 26 Eur Neurology Congress. 06.08.-07.08.2018, Madrid, Spain
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Hcpidin quantification in chronic kidney disease patients with atherosclerotic changes. BIT's 16th Annual Congress of Int Drug Discovery Science and Technology. 16.08.-19.08.2018, Boston USA
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Atherosclerotic changes of a.carotis in chronic kidney disease patients with changes iron homeostasis. Annual Physicians Meeting 20018. 21-22.09.2018, Osaka, Japan
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Correlation between IMT and serum hepcidin in atherosclerotic changes in chronic kidney disease patients. 5th World Heart and Brain Conference. 24-26.09.2018, Abu Dhabi, UAE
- Manolov V, Petrova I, Hadjidekova S, et al. Evaluation of intima-media thickness in patients with chronic kidney disease and a. carotis atherosclerotic changes. XIth National Conference of clinical laboratory. 27-29.09.2018, Plovdiv, Bulgaria
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Evaluation of early cognitive function disturbances and serum hepcidin quantification in chronic kidney disease patients. Global Insight Conference on Neurology and Brain Disorders (ICNBD-2018). 18-20.10.2018, Las Vegas, Nevada, USA
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Quantification of serum hepcidin in chronic kidney disease patients with atherosclerotic changes in a. carotis. 16th Int Conference on Nephrology & Therapeutics. 19-20.10.2018, New York City, New York, USA
- Petrova I, Hadjidekova S, Manolov V, et al. Evaluation of cognitive function disturbances and connection to iron homeostasis in chronic kidney disease patients. Int Conference on Nephrology and Urology. 21-22.01.2019, Singapore

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-236/15.12.2017 Процеси на фибрилизация на белтъци от плазмения протеом при невродегенеративни заболявания

Изследователски екип: Проф. Борис Гоцев Тенчов, дбн, дф

- Гл.ас. Силвия Абарова, дбф
- Гл.ас. Любомир Трайков, дбф
- Проф. Регина Комса-Пенкова, дбн - МУ-Плевен
- Доц. Румяна Койнова, дбн
- Неци Низамова, студент
- Цветослав Георгиев, студент
- Анастасиос Папагеоргиу, студент
- Стела Захарина, студент
- Анелия Зашева, студент

- Акад. Проф. Лъчезар Трайков, дм, дмн
- гл. ас. Мария Петрова, дм
- Тодор Кунчев, докторант
- Димитър Бакалов, студент

Базова организация: МУ - София, МФ, Катедра по медицинска физика и биофизика, ул. Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Най-забележителният резултат от настоящото изследване се състои в това, че при болни от Паркинсон в напреднал стадий микрокалориметричните данни позволиха да бъдат ясно разграничени две дискретни, обособени групи пациенти със съществено различни денатурационни профили на тяхната кръвна плазма, които не са разграничени по никакъв начин в диагнозите, предоставени ни от лекарския екип. Най-характерният признак, по който тези две групи пациенти се различават е голямата разлика във височината на албуминовия пик в термограмите. В отчета сме обозначили тези две групи като високоалбуминови и нискоалбуминови пациенти. Този резултат показва, че изследванията на кръвна плазма посредством ДСК разкриват нови, неизвестни досега възможности за изясняване на молекулните механизми на заболяването. Друг забележителен, напълно оригинален резултат се състои в това, че изследваните проби от човешка цереброспинална течност показват добре изразени екзотермни преходи при нагряване, които предшестват по температура преходите на денатурация на протеините, за разлика от пробите от кръвна плазма, които показват само ендотермни денатурационни преходи. Тъй като тези екзотерми не са резултат от пост-денатурационна, високотемпературна агрегация на протеините, те очевидно показват наличието на специфични водоразтворими протеинови фракции в цереброспиналната течност, за които са характерни обратими процеси на фибрилизация и/или агрегация, настъпващи преди тяхната денатурация. За изясняване на природата на тези протеинови фракции са необходими допълнителни изследвания с други методи. Другите групи изследвани проби от пациенти с невродегенеративни нарушения, като болест на Алцхаймер и различни видове деменция, също така разкриват големи различия между термодинамичните характеристики на кръвната плазма на здрави и болни индивиди. Установеното голямо разнообразие от различни по форма денатурационни профили на кръвна плазма на пациенти с невродегенеративни заболявания дават основание да се заключи, че ДСК има несъмнен потенциал като диагностичен и изследователски метод, който може да се използва както за установяване на характера на невродегенеративното заболяване, така също и за оценка на неговата тежест и на ефекта от прилаганите терапии.

Научни публикации и прояви:

- Tenchov V, Koynova R, Antonova B, et al. Blood plasma thermal behavior and protein oxidation as indicators of multiple sclerosis clinical status and plasma exchange therapy progression. *Thermochim Acta* 2019;67, 193-9
- Tenchov V, Zaharinova S, Abarova S, et al. Thermodynamics of Protein Fibrillation. Relation to Molecular Basis of Diseases. 10th Jubilee Int Conference of the Balkan Physical Union, AIP Conf. Proc. 2018

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-238/15.12.2017 Оценка на нивата на витамин Д, витамин В12 и хомоцистеин в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2

Изследователски екип: Проф. Цветалина Иванова Танкова, дмн

- Проф. Георги Георгиев, дм
- Доц. Илияна Борисова, дм
- Гл.ас. Грета Грозева-Дамянова, дм
- Гл. ас. Невена Чакърлова, дм
- Гл. ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Ани Тодорова, докторант
- Мина Сердарова, докторант

Базова организация: МУ - София, МФ, Катедра по Ендокринология, УСБАЛЕ „Акад.Ив. Пенчев“, ул.Здраве 2, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на проучването е да се изследват нивата на витамин В12 и витамин Д в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2. Материал и методи Изследвани са 308 пациенти, 170 мъже и 138 жени, на средна възраст 60.3 ± 10.4 години и среден ИТМ 32.0 ± 5.9 кг/м². Витамин В12 и витамин Д се изследвани в серум по електрохемилюминцентен метод. Дефицит на витамин В 12 е установен при 34% от изследваната популация, ниско-нормални нива - при 28% и нормални нива - при 38%. С дефицит на витамин Д са 44% от изследваните, с тежък дефицит - 13%, с недостатъчност - 30%, и с достатъчност - 13%. С дефицит на витамин В12 са 18% от пациентите, приемащи метформин и 37.7 % от неприемащите метформин. Средното ниво на витамин В12 в групата с прием на метформин е 178 pmol/l, а в групата без прием - 235 pmol/l ($p = 0.006$). Нивото на витамин В12 корелира със средната доза на метформин ($r = -18$, $p=0.005$) и не корелира с продължителността на прием. Всяко увеличение на дозата на метформин с 250 мг, увеличава риска за В12 дефицит с 15 % ($p=0.005$). Около една трета от пациентите със захарен диабет тип 2 са с дефицит на витамин В12, а друга една трета е с ниско-нормални нива, което не изключва дефицит. Повече от половината от пациентите със захарен диабет тип 2 са с витамин Д дефицит и още една трета - с недостатъчност. Дефицитът на витамин В12 е два пъти по-чест при пациентите, приемащи метформин. Основният фактор, свързан с дефицит на витамин В12, е дозата на метформин.

Научни публикации и прояви:

- Чакърлова Н, Димова Р, Минчева Р и др. Витамин В12 статус в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2. Ендокринология 2019;3.

Научният отчет е приет със **ЗАДОВОЛИТЕЛНА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-239/15.12.2017 Въздействие на ротационни инструменти и техники за запълване върху стената на кореновия канал при ендодонтско лечение

Изследователски екип: Проф. Радосвета Иванова Василева, дм

- Доц. Емилия Карова, дм
- Ас. Ирина Ценова

Базова организация: МУ - София, ФДМ, Катедра по консервативно зъболечение, бул. Г Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването бе да се проследи въздействието на различни ротационни никел-титанови системи и техники за херметизиране на ендодонтското пространство върху появата и разпространението на пукнатини по дентиновата повърхност на кореновия канал. Влиянието на ендодонтските системи върху дентиновата стена се наблюдава при 84 долни резци, а на обтурационните техники – върху 50 долни премолара. И при двете изследвания бяха използвани положителна и отрицателна контролна група. След обработката и запълването, образците бяха срязани хоризонтално на три нива: 3, 6 и 9 mm от апекса на зъба като се получиха общо 252 среза на резците и 150 на премоларите. Всички срезове бяха наблюдавани със стереомикроскоп с х40 увеличение и заснети с дигитална камера. Сравнителният анализ между отелните системи, използвани за обработка на корено-каналното пространство разкрива по-висока честота на индуцирани дефекти в апикалната трета на кореновия канал като разликата е статистически значима в сравнение с пукнатините в средната и коронарната част на кореновия канал. Максимално щадящо е поведението на всички използвани ендодонтски пили в коронарната трета на кореновия канал. Най-много срезове с дефекти бяха регистрирани при обработката с *Pro Taper Universal* и *HyFlex* (по14). Ротационните никел-титанови системи генерират дентинови дефекти независимо от вида на тяхната сплав, коничност, напречно сечение, начин на задвижване и брой пили за цялостно оформяне на канала. Общият брой на срезове с дефекти, продуцирани от трите обтурационни техники е приблизително равен в трите нива на кореновата повърхност. Запълването с топла вертикална кондензация генерира пукнатини в коронарната и средна част на кореновия канал, а студената латерална кондензация – в апикалната и средна трета. Най-малко дефекти, само апикално, бяха регистрирани при обтурирането с *GuttaCore*. Стереомикроскопското изследване на зъбни срезове в апикалната, средната и коронарната трета е възпроизводим и надежден метод за оценка на микропукнатини в дентиновата стена. Не се отчете прогресия на съществуващите и поява на нови пукнатини в срезове след четириседмичен период.

Научни публикации и прояви:

- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. The ability of root canal cleaning and shaping procedures to initiate dentinal radicular microcracks. *Int J Sci Res.* 2018;7(8):1558-65.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Damages to radicular dentin during root canal filling and retreatment procedures: analysis, evaluation methods and methodological issues. *Int J Sci Res.* 2018;7(10):524-33.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Dentinal Microcrack Formation After Root Canal Filling with Thermoplasticized Gutta-percha: an in vitro study. *Int J Sci Res.* 2018;7(11):1360-4.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Incidence of dentinal microcracks after root canal preparation with two reciprocating systems: a stereomicroscopic study. *J of IMAB.* 2018;24(4):2245-9.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. The ability of ProTaper Next to induce microcracks: a stere-omicroscopic investigation. 11th Int Sofia Dental Meeting, Sofia, Bulgaria, 27–30 Sep 2018
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Nickel-titanium rotary files: potentials for fractures and damages of root canal dentin. 3rd Int Biomedical Congress, Sofia, Bulgaria, 16–18 Nov 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ’ 2016”

Договор 1-И/2016 Влиянието на половите хормони върху пародонталното здраве на деца през пубертета и изработване на клинични критерии за оценка на пародонта в детско юношеска възраст

Изследователски екип: Проф. Мая Рашева Рашкова, дм

- Гл.ас. Надежда Митова, дм
- Ас. Антон Козаров

Базова организация: Катедра Детска дентална медицина, ул. Г. Софийски 1, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: Целта на изследването беше да се изработят диагностични клинични критерии за оценка на пародонталното здраве в период на зъбен пробив и да се проучи влиянието на половите хормони върху пародонта при деца през пубертета. Обект на изследването бяха: 90 деца (6 и 14 год.), без гингивит и добра орална хигиена - за изработване на диагностични критерии, като беше измерена дълбочината на гингивалния сулкус на зъби в различна степен на пробив, с помощта на електронна сонда трето поколение Parometer (Orange). Бяха направени по 6 измервания на 1522 зъба; 60 деца (10 и 14 год) - 30 деца без гингивит и 30 деца с плаково-индуциран гингивит, за измерване с течна хроматография с мас-спектроскопия, тестостерон (при момчетата) и прогестерон и естрадиол (при момичетата) в проби от слюнка. Статистическа обработка с SPSS 19. Резултатите показаха, че дълбочината на гингивалния сулкус в периода на зъбен пробив варира при пробив до 1/3 от коронката средно от 2,55 мм и достига до 1,88 мм при зъби в оклузия. При резци и канини този процес е по-динамичен, докато при останалите групи зъби намаляването на дълбочината на гингивалния сулкус е по-плавно и с по-малки отклонения. При влизане на зъбите в оклузия се наблюдава стабилизиране на пародонта, като средните стойности са близки до стандарта за възрастни (2,20 мм). За първите молари, резци и първите премолари стабилизирането на пародонта е до 11-12 г., а за останалите зъби до 14г. Пародонталните индекси, които използват репрезентативни зъби – първи резци и първи молари могат успешно да се прилагат още от 8г. възраст. В периода 10-14 годишна възраст не се наблюдават разлики в количествата на половите хормони в проби от слюнка, като е налице леко покачване на хормоните при децата с гингивит, в сравнение със здравите деца.

Научни публикации и прояви:

- Митова Н, М Рашкова, Х Танкова. Дълбочина на гингивален сулкус при здрави деца със зъби в пробив. Проблеми на денталната медицина, 2017; 43(2):79-86
- Mitova N, Rashkova M, Tankova H. Depth of gingival sulcus in different tooth groups during eruption. Journal of IMAV, 2018

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ’ 2017”

Договор Д-230/15.12.2017 Повишаване капацитета на лаборатория „Анализ и синтез на биоактивни вещества“ към ЦММ на Катедра „Медицинска химия и биохимия“ в областта на омикс (метаболомикс, протеомикс, липидомикс) изследванията

Изследователски екип: Доц. Валентин Стойчев Лозанов, дб

- Доц. Ивайло Иванов дх
- Ас. Анелия Василева
- Ас. Весела Лозанова
- Паулина Сугарева
- Ясен Христов, докторант
- Делян Жеков, докторант

Базова организация: МУ-София, МФ, Катедра по медицинска химия и биохимия, ул Здраве 2, София 1000

РЕЗУЛТАТИ: В резултат на изпълнение на проекта бяха създадени съвременни условия за реализиране на метаболомни, липидомни и протеомни изследвания в лабораторията и университета респективно, в дългосрочен план. Бяха закупени и въведени в експлоатация работна компютърна станция и компютърен сървер с висока производителност и капацитет, които позволяват обработка на големи масиви от данни получени при реализирането на маспектроскопски изследвания. Осъвременен бе арсенала от софтуерни приложения за омикс изследвания и бе създаден колектив от млади учени обучен и квалифициран да работи пълноценно с тях. Новата инфраструктура се използва за изпълнение на няколко текущи проекта – откриване на нови биомаркери за диагностика на ХОББ (хронична обструктивна белодробна болест); липидни и ейконозаинови профили на псориазис; метаболитни профили на диворастващи гъби; идентификация на ароматни съединения в български кисели млека; идентификация на потенциални инхибитори на каспази и ацетилхолоестераза в екстракти от растението *Gypsophila glomerata*; идентификация на вещества с потенциален антитумоген ефект в екстракти от растението *Tanacetum vulgare* L. В ход на разработка е web базиран портал на лабораторията. Изградената инфраструктура позволи пълноценно включване на лабораторията към международната мрежа за обмен на информация ZCloud.

Научни публикации и прояви:

- Balabanova V, R Gevrenova, D Zheleva-Dimitova, et al. Bioinformatic inside on portulaca oleracea l. (purslane) with bulgarian and greek origin, 10th CMAPSEEC (10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast Eur Countries), May, 2018, Split, Croatia
- Dospatliev L, V Lozanov, M Ivanova, et al. 2018. Differences in amino acid composition of stem and cap of morchella esculenta from the Batak Mountain, Bulgaria. 2nd Int Conference on Bio-antioxidants (Bio-antioxidants 2018). Sep 2018, Varna, Bulgaria.
- Dospatliev L, V Lozanov, M Ivanova, et al. Amino acids in edible wild mushroom from the Batak Mountain, Bulgaria. 11 Chemistry Conference, Oct 2018, Plovdiv.

Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

Договор Д-231/15.12.2017 Изграждане на лаборатория за изследване на стойката и локомоцията към катедрата по кинезитерапия във ФОЗ при МУ-София (I-ви етап)

Изследователски екип: доц. Стефан Недков Янев, доктор

- Доц. Ванина Михайлова-Алакиди, дм
- Доц. Давид Кънчев, доктор
- Доц. Йоаннис Папатансиу, дм
- Проф. Ивет Колева-Йошинова, дмн
- Гл. Ас. Тодор Димитров, дм
- Гл. Ас. Жулиета Геренова, дм
- Ас. Инна Иванова, доктор
- Ас. Надя Манова
- Ас. Елена Желева
- Ас. Елвира Никовска
- Проф. Антония Янакиева, дм
- Проф. Мариела Янева-Деливерска, дмн
- Доц. Тодор Кундурджиев, дм
- Ас. Светлин Георгиев

Базова организация: МУ - София, ФОЗ, Катедра по кинезитерапия, Бул. Акад. Иван Евстратиев Гешов, 15, София 1431

РЕЗУЛТАТИ: В изградената на първи етап Лаборатория за изследване на стойката и локомоцията към Катедрата по кинезитерапия във ФОЗ при МУ – София е инсталирана бароподометрична пътека, предоставяща възможност за провеждане на базови биомеханични, кинезиологични на здрави индивиди и патокинезиологични изследвания на пациенти. Спектърът от пациенти със заболявания, обект на лабораторията съдържа различни състояния след травми на долните крайници, таза и гръбначния стълб; болести на костно-мускулната система и на съединителната тъкан; болести на нервната система (централна и периферна); болести на вътрешното ухо; мозъчно съдови болести; вродени аномалии, деформации и хромозомни аберации и др. Използваният хардуер Ultrasensor 3D Platform има възможност за приложение на постурално (статично) и динамично изследване, и стабилметрия. Пътеката е оборудвана със 7 сензора на квадратен сантиметър, което представлява резолюция по XY от 42,3dpi (или 6,5dpi). Резолюцията по Z е 16bit, матричната калибрация - 16bit, максимална честота на сканиране 400fps, точност +/-2%, максимално налягане на точка 150N/cm², дължина 200cm и ширина 50 cm. Прецизните дигитални измервания и анализ дават възможността за точно регистриране на симптомите, тяхната възпроизводимост и сравнимост във времето, чрез което се подпомага научната работа в клиниките по ортопедия и травматология, неврология, педиатрия, физикална и рехабилитационна медицина към университетските многопрофилни болници на МУ-София. Организиран са научни форуми и са проведени информационни срещи за популяризиране на възможностите на лабораторията не само в медицинските среди, но и с партньори от други висши училища в България. Организиран са дейностите по попълване на регистри в платформата електронно събиране на данни REDCap. Чрез съвместната дейност на Катедрата по кинезитерапия и Diasu Research

Centre, Rome, Italy екипът има възможност за участие в проекти по международни програми. Повишаване на качеството на обучението по специалност Кинезитерапия в МУ-София, чрез провеждане на практически упражнения в лабораторията на студенти от специалността, както и чрез направена актуализация на учебните програми.

Научни публикации и прояви:

- Янев Ст. Бароподометрия – възможности за клиничната кинезитерапия. Известия на Съюза на учените в България – Русе. 2019;9(4)
- Янев Ст, Андреев, Ал. Изследване на равновесието след отстраняване на вермиса - доклад на случай. Известия на Съюза на учените в България – Русе. 2019;9(4)
- Янев Ст, Иванова И, Кундуржиев Т. Статичен бароподометричен анализ на студентите от специалност кинезитерапия в Медицински университет – София. Физиотерапия, 2019;1/2
- Колева И. Рехабилитация на захвата и походката (Сборник лекции). Симел прес, София, 2019
- Колева И, Йошинов Р, Йошинов Б. Сборник тестове по физикална медицина, физикална терапия и рехабилитация. Симел прес, София, 2019

Научният отчет е приет с **ВИСОКА** оценка по скалата на СМН.

SCIENTIFIC PROJECTS 2016 – 2017
WITH FINANCIAL SUPPORT OF
MEDICAL UNIVERSITY – SOFIA

MEDICO-BIOLOGICAL AREA “GRANT 2016”

Contract 1/2016 Optimisation and validation of molecular genetic approach for diagnostics of myotonia congenita type Becker in Bulgaria

Research team: Assoc. Prof. Albena Parvanova Todorova – Georgieva, DSci

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSc
- Assist. Prof. Bilyana Georgieva, PhD
- Andrey Kirov, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Medical Faculty, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: The aim of the present study is to optimize and validate a molecular genetic approach for diagnostics of myotonia congenita type Becker in Bulgaria in order to elucidate the molecular characteristics of the disease in Bulgarian patients. Using the optimized molecular genetic approach for identification of pathological changes in the *CLCN1* gene we managed to confirm the clinical diagnosis in a significant number of patients (7/9 = 78%). These data suggest also a very precisely selected patient group. We also identified the probable most common *CLCN1* mutation for the Bulgarian population – the splice-site mutation c.1471+1G>A. It was detected in 3 of the analyzed families with clinical diagnosis of myotonia congenita type Becker. The Bulgarian population is characterized by a number of endemic genetic patterns, proven by the identification a novel still unpublished in the literature mutation even in a very well studied gene as it is the *CLCN1* gene - c.1571A>G, p.Tyr524Cys. Two regions in Bulgaria are interesting from populational point of view: the regions of Gotse Delchev and Mezdra represent presumable endemic regions for the c.817G>A, p.Val273Met and the c.1571A>G, p.Tyr524Cys mutation respectively.

Scientific publications and presentations:

- Tincheva S, Georgieva B, Todorov T, et al. Myotonia congenita type Becker in Bulgaria: First genetically proven cases and mutation screening of two presumable endemic regions. *Neuromuscular Disorders* 2016;26 (10): 675–680.

Contract 2/2016 Effects of Leptin on Thermoregulation in Rats with model of Obesity: Role of GABA_B Receptor Mechanisms

Research team: Prof. Krassimira Simeonova Yakimova, MD, PhD, DSci

- Milen Hristov MD
- Assoc. Prof. Rumen Nikolov, MD, PhD
- Sonia Ivanova
- Elisabetta DiBlazi, student

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: We examined the change in body temperature of male Wistar rats with diet-induced obesity after systemic (intraperitoneal) administration of leptin, GABA_B-agonist baclofen and GABA_B-antagonist CGP35348, administered alone or in different combinations. In our results, systemic administration of leptin induced statistically significant hyperthermia in rats with experimental model of obesity as well as GABA_B antagonist CGP35348 while GABA_B agonist baclofen induced a decrease in body temperature. No synergism was observed in the hyperthermic effect of combining leptin and GABA_B antagonist. The effect of the combination was less than the effects of the substances administered alone. In the combined administration of baclofen and leptin, a fall in body temperature was observed and the effect was less pronounced than that of the baclofen alone. The effects of baclofen and CGP35348 on body temperature were less pronounced in rats with a model of obesity compared to rats with normal weight. In our *in vitro* studies on neurons from preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH), leptin slightly increased the firing rate of PO/AH neurons in rats with a model of obesity, indicating the presence of leptin resistance. In conclusion, despite the poor response to the neuronal activity of PO/AH neurons, leptin resulted in an increase in body temperature following its systemic administration in rats with a model of obesity. There was no synergism between leptin and GABA_B antagonist or GABA_B agonist when co-administered. The effects of leptin, baclofen and CGP35348 were less pronounced in the rats with a model of obesity compared to rats with normal weight

Scientific publications and presentations:

- Hristov M, Yakimova K. Effects of leptin on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in rats with normal weight and experimental model of obesity.- C R Acad Bulg Sci. 2017;70(8):1163-70
- Hristov M, Blasi E, Nikolov R, et al. Leptin and GABA interactions on body temperature of rats with experimental model of obesity. Asian J Med Health 2017;5(2):1-8.
- Yakimova K, Hristov M. Effects of leptin on thermoregulation: *in vivo* and *in vitro* investigations on normal and obese rats.- 6th Int Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation, Ljubljana, Slovenia, 5-9 December, 2016, Abstr. 86.
- Hristov M, Yakimova K. Effects of leptin on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in normal and obese rats.- 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 October, 2016, A190.
- DiBlazi E, Hristov M, Nikolov R, Yakimova K. Thermoregulatory interactions between leptin and modulators of GABA_B receptor function in rats with normal weight and experimental model of obesity. – XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 11-14 May, 2017, A41.
- Yakimova K, Hristov M. Leptin-induced change on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in normal and obese rats. - Int Workshop “Metabolic diseases: genetics, epigenetics and proteomics”, Sofia, Bulgaria, 16-20 May, 2017, Abstr. 26.

Contract 3/2016 Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and investigation of probiotics with potential for infection control

Research team: Prof. Lyudmila Boyanova Georgieva, MD, PhD, DMSc.

- Galina Gergova, MD
- Daniel Yordanov, MD
- Assoc. Prof. Romyana Markovska-Davidkova, MD, Ph.D.

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept of Medical Microbiology, G. Sofiiyski Str. 1, 1431 Sofia

RESULTS: Anti-*Helicobacter pylori* activity of seven *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* strains was assessed by 4 cell free supernatants (CFS): non-neutralized non-heated (CFS1), non-neutralized heated (CFS2), pH-neutralized, catalase-treated, non-heated (CFS3) or neutralized catalase-treated and heated (CFS4) against 18 *H. pylori* strains in 301 combinations. All GLB strains produced bacteriocin-like substances (BLISs). Neutralized CFS inhibited > 2/3 of the strains tested. CFS3 and CFS4 of two GLB strains suppressed > 81% of all isolates, and those of four GLB strains were active against >71% of antibiotic resistant isolates. Neutralization reduced CFS activity, while the heating did not influence the effects. All GLB strains produced thermostable BLISs with differences according to both GLB and *H. pylori* strain. The prominent anti-*H. pylori* BLIS activity is a strong advantage in the probiotic choice to control the infection. By a ¹³C UBT, *H. pylori* prevalence among 134 symptomatic children was 41.8% and more common (52.7%) in untreated children with gastritis or duodenal ulcer compared to the rest (18.5%). Over 1/3 of the treated patients were positive. Four of five children who had taken propolis and/or lactobacilli before the study were negative. *H. pylori* infection was common in the symptomatic children and was acquired in early childhood. The need to avoid propolis and probiotic use before UBT should be further evaluated. Eradication was suboptimal and both treatment optimization and tailored therapy are required. *H. pylori* IgG and CagA IgG rate in asymptomatic children was studied by ELISA. The prevalence of *H. pylori* IgG was 24.2% and CagA IgG was found in 40% of *H. pylori* IgG-positive children. Both rates were significantly lower than those in our recent study on asymptomatic adults. The *H. pylori* seroprevalence was the lowest (13.5%) in children aged 1-3. The prevalence of infection and virulence of the strains in Bulgaria showed a steady decrease.

Scientific publications and presentations:

- Boyanova L, Koumanova R, Hadzhiyski P, et al. *Helicobacter pylori* infection in Bulgarian pediatric patients. C.R.Acad. Bulg. Sci. 2018;71(7):971-7.
- Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* IgG and CagA IgG in Bulgarian children. C. R. Acad. Bulg. Sci. 2018;71(8):1124-9
- Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* IgG and CagA IgG in Bulgarian children. XV National Congress on Clinical Microbiology and Infections of BAM, Sofia, Park Hotel Moscow, 17-19 May 2017:74-75
- Boyanova L, Gergova G, Markovska R, et al. Bacteriocin activities of seven *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* strains against antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* strains. XV National Congress on Clinical Microbiology and Infections of BAM, Sofia, Park Hotel Moscow, 17-19 May 2017. Page 19

Contract 4/2016 Microbiological and molecular genetic investigations on the resistance mechanisms to carbapenems in problematic clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from four university hospitals in Bulgaria

Research team: Assoc. Prof. Tanya Vasileva Strateva, MD, PhD

- Corr. Member Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci
- Prof. Encho Savov, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Temenuga Stoeva, MD, PhD
- Assoc. Prof. Svetoslav Dimov
- Assist. Prof. Ivo Sirakov, VMD, PhD
- Assist. Prof. Yuliya Marteva-Proevska, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: A total of 226 carbapenem-non-susceptible nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* (AB) with multidrug resistance (MDR), identified by the *gyrB* polymerase chain reaction, was collected during the period 2014-2016 from four university hospitals in Bulgaria. The aims of this study were: to determine the antimicrobial susceptibility, according to the EUCAST-2016 criteria; to perform molecular genetic investigations on the carbapenem resistance mechanisms and epidemiological typing of the isolates, as well as to ensure appropriate recommendations for the treatment. The antibiotic resistance rates were: to imipenem – 90.7%, meropenem 98.3%, doripenem 100%, amikacin 92.8%, gentamicin 87.2%, tobramycin 55.6%, levofloxacin 98.2%, trimethoprim-sulfamethoxazole 86.2%, tigecycline (TGC) 22.1%, colistin (COL) 0% and ampicillin-sulbactam (SAM) 41.6% (interpreted according to the CLSI-2016 guideline). Twenty-eight isolates out of the tested strains (12.4%) were extensively drug-resistant (XDRAB), susceptible only to COL. The majority of the carbapenem resistant strains harbored *bla*_{OXA-23-like} genes associated with the upstream-located *ISAbal* (26.1%) or *bla*_{OXA-24-like} (46.7%), forty-five *A. baumannii* isolates (19.9%) – both genes, and one isolate contained *bla*_{OXA-58-like}. In the course of the present study, for the first time in the Balkan States, a carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* strain was identified. The isolate produced only OXA-58 carbapenemase. The genetic environment of the *bla*_{OXA-58} gene was defined by *ISAbal3*-like and *ISAbal3*, located upstream and downstream, respectively. Epidemiological typing of the nosocomial *A. baumannii* isolates using RAPD-PCR and UPGMA-analysis revealed the persistence of strains with clonal relatedness (threshold of 70% similarity) belonging to 6 clusters in Military Medical Academy, 4 clusters (UMHAT “St. Marina”), 3 clusters (UMHAT “Alexandrovska”) and 2 clusters (UMHAT “St. Ivan Rilski”), respectively. Carbapenems have been regarded as effective antimicrobial agents to treat AB infections. The carbapenem resistance and the MDR necessitate the use of other classes of antibiotics and combination therapies. Usually, the choices of antimicrobial treatment for MDRAB and XDRAB are severely limited. There are only a few effective options available, including COL, TGC and SAM. In conclusion, the permanent dissemination of endemic clones comprised of OXA carbapenemase-producing MDR *A. baumannii* in the monitored hospitals over a 3-year period is of concern and requires intensified investigations in the future.

Scientific publications and presentations:

- Strateva T. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates – spread and mechanisms of antimicrobial drug resistance. Health and Science. 2016; VI (4): 20-25.
- Strateva T, Stoeva T, Savov E, et al. Carbapenem-non-susceptible nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* with multidrug resistance (2014-2016): antimicrobial resistance surveillance and treatment recommendations. Medical Review. 2017; 53 (6): 27-36.

- Strateva T, Sirakov I, Mitov I. First detection of an OXA-58 carbapenemase-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. J Glob Antimicrob Resist 2018;13:123-4.
- Strateva T, Stoeva T, Savov E, et al. Multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* (2014-2016) – antimicrobial resistance mechanisms and epidemiological typing. 15th National Congress of Clinical Microbiology and Infections of Bulgarian Association of Microbiologists. Sofia. May 17-19, 2017. Book of Scientific Publications: 13-14.
- Strateva T, Sirakov I, Savov E, et al. First report of an OXA-58-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. 10th Balkan Congress of Microbiology Microbiologia Balkanica'2017. Sofia. November 16-18, 2017; Poster Session Two, Nosocomial infections, Poster Nos-32; Abstracts: p. 121.

Contract 5/2016 Postoperative pain in streptozocin-induced diabetes: pharmacological modulation

Research team: Prof. Mila Vasileva Vlaskovska, MD, PhD, DSci

- Prof. Slavina Surcheva, MD, PhD
- Assist. Prof. Pavlina Gateva, MD, PhD
- Lubina Todorova, MD
- Kiril Surchev, MD - UMHATEM “N.I.Pirogov”
- Ludmila Dimitrova
- Nikol Hristova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology, «Zdrave» 2, Sofia 1431.

RESULTS: Purpose of study is to compare the effects of some analgesics on pain hypersensitivity in model of incisional pain in naïve/diabetic male Wistar rats. Using evoked mechanical and thermal hypersensitivity tests and hind limb weight bearing, we evaluated the antinociceptive effects of metamizol (150 mg/kg), paracetamol (100 mg/kg), gabapentin (60 and 100 mg/kg) or amitriptyline (25mg/kg) in model of incisional pain in naïve/diabetic rats. Metamizol and paracetamol reversed mechanical and tactile hyperalgesia in the incised paw on 2nd and 24h after incision. Acute Gabapentin treatment, more pronounced in dose 100 mg/kg, after incision alleviated thermal hyperalgesia in diabetic rats and reduced weight borne on the injured limb was found. Gabapentin alone provided insufficient analgesia in naïve rats but showed increased postoperative efficacy on hyperalgesia and weight bearing in diabetic rats. Preoperatively given gabapentin augments the antihyperalgesic effects of both gabapentin and metamizol when administered on 2 and 24 hours after plantar incision in diabetic rats. Preoperative treatment with amitriptyline increased narcosis (shortened sleeping and prolonged waking) in rats but did not have a significant effect on hyperalgesia and weight bearing. Our results suggest that preoperative treatment with gabapentin improves postoperative analgesia in diabetic rats.

Scientific publications and presentations:

- Surcheva S, Todorova L, Maslarov D, et al. Preclinic and clinic effectiveness of gabapentin and pregabalin for treatment of neuropathic pain in rats and diabetic patients, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2017;31(3):568-57.
- Surcheva S, Marchev S, Surchev K, et al. Treatment of diabetic postoperative pain: experimental, clinical and regulatory studies. The 13th Congress of Eur Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), Prague, Czech Republic, June 24-27, 2017.

Contract 6/2016 Antiangiogenic effect and cytotoxic mechanisms of hydroxyanthraquinone aloe-emodin in human brain microvascular endothelial cells

Research team: Assist. Prof. Bilyana Georgieva, PhD

- Prof. Vanio Mitev, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Albena Todorova, PhD, DSci
- Assist. Prof. Miglena Koprinarova, PhD
- Assoc. Prof. Ivanka Dimova, MD, PhD
- Kremena Slavova, PhD student
- Viktor Slavov, PhD student
- Assoc. Prof. Svetla Danova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Medical Faculty, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria

RESULTS: The aim of this work was to investigate the mechanisms of cytotoxicity of phytohydroxyanthraquinone aloe-emodin (AE) on human brain microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 and to assess the cellular response in the early stage of treatment in order to extend the knowledge of AE's anti-angiogenic properties. The brain endothelial hCMEC/D3 cells were treated with a series of AE concentrations (5 - 200 μ M) for a period of 24 hours. The cell viability was determined by MTS assay. The cellular adenosine triphosphate (ATP) levels were evaluated by CellTiter-Glo® luminescent assay. The intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined by 2',7'-dichlorofluorescein (CM-H2DCFDA) fluorescence assay. The mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) staining, while Fluo-4 was used to measure the intracellular free Ca^{2+} concentrations inside living cells analysed by High Content Analysis using the Arrayscan VTI 740. Twenty-four-hour treatment of hCMEC/D3 cells with AE, in concentrations between 50 and 200 μ M, decreased the cell viability as well as the intracellular ATP levels in a dose-dependent manner. Increased ROS production and disruption of the mitochondrial membrane potential have also been detected. Notably, AE at a concentration greater than 5 μ M dramatically increased intracellular calcium levels. Our results collectively indicate that AE inhibits proliferation of human brain microvascular cells *via* a mechanism involving ROS generation, disruption of Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial damage.

Scientific publications and presentations:

- Dimova I, Danova S, Slavova K, et al. Aloe-emodin triggers ROS and Ca^{2+} production and decreases the levels of mitochondrial membrane potential of human brain capillary endothelial cells. XXVII Int conference of the union of scientists in Stara Zagora, 1-2 Jun 2017.

Contract 7/2016 Screening of newly synthesized coumarin and chromene derivatives (phases II and III) with evaluation of ED50 and TD50 and application of 6Hz model of pharmaco-resistant epilepsy

Research team: Prof. Slavina Kirilova Surcheva, MD, PhD

- Assoc. Prof. Pavlina Gateva, MD, PhD
- Assist. Prof. Violina Stoyanova, PhD
- Assoc. Prof. Jane Tchekalarova, PhD - BAS
- Prof. Nikolay Vassilev, PhD, MSci - BAS
- Assist. Prof. Radka Tafradjiiska-Hadjiolova, MD, PhD
- Assist. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Sonia Kalinova
- Enrico Meduri, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology

RESULTS: This Project is a successive stage (phases II and III) of a screening of substances with potentially antiepileptic activity. After a previous identification of several differently functionalized coumarin and 2H-chromene hydrazide/hydrazones with positive results when testing with maximal electroshock (MES) and subcutaneous injection of pentylentetrazole (scPTZ) in mice, now we (1) determined time-to-pick effect (TPE); (2) assessed median effective dose (ED50), median toxic dose (TD50) and protective index (PI) of the same substances in MES and scPTZ and (3) evaluated TPE, ED50, TD50 and PI with 6Hz test as a model of partial treatment resistant seizures. Results from the quantitative screening are as follows:

Test substance	MES			scPTZ			6Hz		
	TPE (h)	ED50 (mg/kg)	PI	TPE (h)	ED50 (mg/kg)	PI	TPE (h)	ED50 (mg/kg)	PI
4a	0.5	99.71	> 3.01	0.5	-	-	-	-	-
4b	0.5	68.66	> 4.37	0.5	-	-	0.5	137.3	> 2.18
4c	0.5	81.29	> 3.69	0.5	-	-	0.5	94.37	> 3.18
8a	0.5	87.63	> 3.42	0.5	218.50	> 1.37	-	-	-
8b	0.5	12.51	> 23.98	0.5	127.10	> 2.36	-	-	-
8c	-	-	-	0.5	-	-	0.5	1.08	> 1.51

Moreover, we enriched the screening with new pyrazole-bearing coumarin derivatives from cyclization of acylhydrazones, which unfortunately did not demonstrate activity in applied by us tests. Trying to elucidate the structure-function relationship of the biologically active substances, we applied the computer method of molecular docking of the coumarin and chromene derivatives on GABA-A receptor. We find that there is a correspondence between the most active in vivo substances and the molecular docking. We performed in silico evaluations of the physicochemical parameters predicting the possibility of the tested substances to cross the blood-brain barrier.

Our results encourage us to continue with further testing of similar chromene derivatives with models of chronic epilepsy and spontaneous epileptic activity.

Scientific publications and presentations:

- Angelova VT, Voynikov Y, Andreeva-Gateva P, et al. In vitro and in silico evaluation of chromene based aroyl hydrazones as anticonvulsant agents. *Med Chem Res* 2017;26:1884-96.
- Angelova VT, Valcheva V, Pencheva T, et al. Synthesis, antimycobacterial activity and docking study of 2-aroyle-[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one derivatives and related hydrazide-hydrazones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(13):2996-3002.
- Angelova VT, Karabelyov VR, Tchekalarova J, et al. Molecular docking study on chromene based aroylhydrazones as anticonvulsant agents. Spring Student Scientific Session. Faculty of Pharmacy, MU-Sofia, 22.04.2017.
- Andreeva-Gateva P, Tchekalarova J, Angelova V, et al. Preclinical Screening of Coumarin and 2H-chromene substituted hydrazide-Hydrazone Derivatives, as Potential Anticounvulsants. The 13th Congress of the Eur Assoc Clin Pharmacol Therapeut, Prague 2017.
- Shakar Sh, Kasi A, Zhelyazkov D, et al. Evaluation of Mediane Effective Doses (ED50), Median Toxic Doses (TD50) and Protective Indices (PI) of six newly synthesized anticonvulsants. XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 11-14 May 2017, p. 62.

Contract 8/2016 Researches on toxigenic genes in Bulgarian strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC, STEC)

Research team: Corr. Prof. Ivan Gergov Mitov, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Ivo Sirakov, DVM, PhD
- Assoc. prof. Tanya Strateva, MD, PhD
- assist. prof. Ralitzia Popova-Ilinkina, DVM, PhD - BFSa
- Prof. Hristo Daskalov, DVM, PhD, DSci – BFSa
- Assist. prof. Irina Alexandar, PhD – BAS

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: The purpose of the study is through classical, molecular-biological techniques, phylogenetic and evolutionary analyzes to prove and study Bulgarian isolates of *E.coli*, which have a gene for the production of shiga toxin and intimin. We studied various raw materials and food products to isolate them. We used selective media and biochemical tests to prove *E.coli*, we also compared different methods for DNA extraction and performed multiplex and conventional PCR to prove *stx1*, *stx2*, *eae* and 16s RNA gene and to determine the subtypes of *stx1* and *stx2*. We sequenced the genes and studied them phylogenetically and evolutionally with data from NCBI. Serological and PCR method were used to determine serogroups of the isolates and their antibiotic susceptibility was studied. We cultivated and isolated 25 isolates of *E.coli*, of which 11 had toxigenic gene/genes. Five isolates were carriers of *stx1*, one isolate was *stx2* positive and 5 were carriers of *eae* gene. For the first time in Bulgaria subtypes of *stx1* and *stx2* were determined. After sequencing the *stx1A* subunit and phylogenetic assay, our isolates were separated into two distinct groups. Analysing the 16s rRNA gene, the *stx1*, *stx2* and *eae* positive isolates of *E.coli* showed different topology, but the sequence differences were not pro selective for the restrictive enzymes. Isolates are a limited number, and it can be speculated that there is a

connection between the topology of isolate 348RP and the presence of the *stx2* gene. Isolates positive for the *eae* gene are genotypic different and are grouped in a separate phylogenetic group as compared to the other isolates. They also differ from each other on the *eae* gene, but not on the 16s rRNA gene, most likely due to their different source and common ancestor. After evaluating evolutionary differences, we found such only in one of the reference sequences. Antimicrobial susceptibility results showed resistance to several antimicrobial agents most likely used in the treatment of infections caused by food pathogens in humans and animals, while four of the *stx1* positive isolates did not show resistance to the antibiotics used.

Scientific publications and presentations:

- Popova R, Sirakov I, Alexandar I, et al. Subtyping of Stx and 16s rRNA Gene Analysis of Some Bulgarian Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Isolates. Acta Microbiol Bulg 2017;33(1):17-23.
- Sirakov I, Popova R, Alexandar I, et al. Partial genome analysis of intimin (*eae*) positive *E.coli* isolates from food. 10th Balkan Congress of microbiology, Microbiologia Balkanica, 16-18 Nov, 2017, Sofia, Bulgaria, p.316.

Contract 9/2016 Contemporary trends in conventional and molecular methods in the species identification of microorganisms causing vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and their chronic forms

Research team: Assoc. Prof. Vessela Vaskova Raykova, MD, PhD

- Assist. Radoslav Baykushev
- Cor. Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 2 "Zdrave" street, 1431 Sofia, Bulgaria

RESULTS: The objective of this study was to apply PCR-based method for detection of *Candida* spp. and BV-associated organisms in symptomatic and asymptomatic women and to assess the need of PCR in the diagnostic algorithm of these conditions. Two vaginal samples were taken from 98 women (74 symptomatic, 24 controls). Amsel criteria and Nugent scoring were used together with tests such as: vaginal pH, Gram staining, routine culture, culture on dextrose agar with Gentamycin and Chromagar candida, and PCR for identification of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Eggerthella-like bacterium*, *Leptotrichia*, BVAB1, BVAB2, and *Megasphaera* type1. In the symptomatic group 17 swabs were with vulvovaginal candidiasis (VVC); 24 with BV, 8 with intermediate BV, 13 with co-infections, and 12 with other infections. In the control group 2 swabs were with VVC, 1 with BV and 1 with other infection. Using PCR in the group with complaints *G. vaginalis* was found in 59 samples (79.7%), *A. vaginae* in 21 (28.4%), *Eggerthella-like bacterium* in 15 (20.3%), *Leptotrichia* in 21 (28.4%), BVAB1 in 3 (4.1%), BVAB2 in 16 (21.6%), *Megasphaera* type1 in 25 (33.8%). In the control group *G. vaginalis* was identified in 4 samples, *A. vaginae* in 2, PCR for other bacteria remained negative. *Eggerthella-like bacterium*, *Leptotrichia*, BVAB2, and *Megasphaera* type1 could be used as strong markers of BV meanwhile *G. vaginalis* could not. PCR-based technique is sensitive and specific, but a combined approach is needed in the diagnosis of vaginal discharge conditions in which pathogens such as fungi, aerobe, anaerobe bacteria or different their combinations could be reason for the disease.

Scientific publications and presentations:

- Raykova V, Ovnarska D, Baykushev R. The role of probiotics in the therapeutic scheme of bacterial vaginosis. Med. Rev. 2016; 52(5):29-33.
- Raykova V, Baykushev R, Mitov I. PCR in the bacterial vaginosis diagnostic algorithm. Acta Microbiol. Bul. 2017;33(1):24-9.

Contract 10/2016 Applying high resolution of mass spectrometrical analysis to investigate the involvement of protein kinase CK2 into the hetero-oligomeric BMPRs complexes in normal human primary dental pulp cells

Research team: Prof. Vanio Ivanov Mitev, MD, PhD, DSc

- Assoc. Prof Valentin Lozanov
- Assist. Antonia Isaeva
- Assist. Violeta Dimitrova
- Assist Anelia Vasileva
- Assist Zornitsa Michailova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medical Chemistry and Biochemistry

RESULTS: In the present study we first show data obtained as a result of the presence of a subpopulation of cells expressing its BMPRI α receptor surface. The involvement of the oligomeric receptor complex transducing BMP signals were first investigated in cell cultures, which were isolated from normal human dental pulp. In the present work, the isolation of dental papillary cell cultures were successfully done, as well as their culturing in high glucose DMEM containing 0.5% FBS, 2 mmol / L glutamine, 100 U / ml penicillin / 100 mg / ml streptomycin at 37⁰ C and 5% CO₂. Successfully was discovered the crucial role of the magnetic separation MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), on the basis of which was obtained the homogeneous cell culture, which were expressed on their surface a receptor BMPRI α . The transfection was successfully performed with siRNA CK α of BMPRs-expressing cells sorted by the primary heterogeneous dental pulp cell culture. The results obtained from the proteomic methods used do not support the working hypothesis for the involvement of CK2 in the molecular signaling of BMP receptors.

Contract 11/2016 Effect of WNT3A on expression of apoptotic and stem cell markers in human mesenchymal stem cells from apical papilla

Research team: Assoc. Prof. Mariya Dimitrova Dragneva, PhD

- Assoc. Prof. Mariya Dragneva, PhD
- Prof. Vanyo Mitev, MD, PHD, DSci
- Assist. Prof. Zornitsa Mihaylova, DDS
- Rozaliya Tsikandelova
- Assist. Prof. Violeta Dimitrova
- Assist.Prof. Nikolay Ishkitiev, DDS, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

RESULTS: The results outlined here would serve as the basis for an even more extensive study of the regulation of the Wnt pathway in apical papillary cells. Flow cytometric analyzes indicate that after treatment with a high concentration of Wnt3a, cells do not undergo programmed cell death, and the effect of loss of cell adhesion observed in autocrine media is not due to the onset apoptosis. Using flow cytometry, it was also found that treatment did not alter the expression of stem cell markers such as CD271 and nestin. Western blot analysis confirmed the results of the quantitative immunofluorescence assay whereby it was established that when treating apical papilla cells with 50ng / ml Wnt3a successful activation of the Wnt signaling pathway was observed with clear upregulation of Wnt target and decreased expression of the mineralization marker alkaline phosphatase. Additionally, a real-time quantitative RT-PCR analysis was performed, which identified differences in the expression of the matrix RNA of genes involved in the degradation of the extracellular matrix, the mounting of an immune response and mineralization. Future studies on the role of the Wnt signaling pathway can be performed using lithium chloride to elucidate the observed phenomenon of loss of cell adhesion observed in this study.

Contract 12/2016 Interactions between serotonergic and GABA-ergic neurotransmitters systems in lower vertebrates retina

Research team: Prof. Liliya Vitanova, MD, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Elka Popova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Petia Kупenova, MD, PhD
- Assist. Prof. Desislava Jekova, MD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. Physiology, G. Sofiyski str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The aim of this project was to study the interactions between serotonin and the ionotropic GABA-ergic receptors in lower vertebrate retina. Two methods were used: immunocytochemical and electrophysiological one. The retinal distribution of serotonergic and GABAergic neurons and the synaptic localization of GABA_C receptors in frog *Rana ridibunda* were demonstrated by the indirect immunocytochemical method. On open frog eyecups of the same species we investigated the effects of isolated or combined stimulation of the serotonin and ionotropic GABA receptors (with TACA) on the electroretinographic b-and d-waves. It was found that serotonin alone produced a significant enhancement of the b-and d-wave amplitudes, while TACA alone caused their marked diminution. The relative amplitude diminution, caused by the TACA treatment, was significantly smaller during combined (serotonin + TACA) treatment. In order to separately evaluate the effects of the GABA_C receptor activation, in a subset of experiments the effects of TACA or (TACA + serotonin) were tested during GABA_A receptor blockade (by bicuculline). Bicuculline caused a marked b- and d-wave amplitude increase. During the GABA_A receptor blockade, the GABA_C receptor stimulation with TACA produced a strong diminution of the b- and d-wave amplitudes. Similar relative decrease of the b-wave amplitude was produced during treatment with (serotonin + TACA), while the decrease of the d-wave amplitude was less pronounced. Our results indicate that in the ON-response generating pathway serotonin decreases the effects of GABA_A receptor activation, while in the OFF-response generating pathway it decreases both the effects of GABA_A and GABA_C receptor

activation. Immunocytochemically, using double labeling with serotonin antibody and GABA_C receptor antibody, we demonstrated numerous colocalizations in the IPL proximal part (the off-sublayer). As retina is a part of CNS, it may be supposed that similar interactions between the two neurotransmitters systems are also present in the brain.

Scientific publications and presentations:

- Vitanova L, P Kупenova, E Popova. Immunocytochemical study on the possible interactions between serotonin and GABA C (GABA A rho) receptors in frog retina. IUPS 38th Word Congress: Rio de Janeiro, 1-5 Aug 2017, Brazil.
- Popova E, P Kупenova, L Vitanova. Interaction between the serotonergic and GABAergic systems in the frog retina as revealed by electroretinogram. UPS 38th Word Congress: Rio de Janeiro, 1-5 Aug 2017, Brazil.

Contract 13/2016 Investigation of virulence factors among clinically- significant carbapenemase or/and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E.coli* and *K.pneumoniae* isolates, in five hospitals in Sofia, Varna and Pleven

Research team: Assoc. Prof. Romyana Markovska –Davidkova, MD, PhD

- Corr. mem. Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Tzvetan Velinov, MD, PhD
- Prof. Marya Sredkova, MD, PhD - MU-Pleven
- Prof. Emma Keuleyan, MD, PhD
- Assoc. Prof. Temenuga Stoeva, MD, PhD - MU-Varna
- Dobrinka Ivanova, Second MHAT-Sofia
- Rositza Dimova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Medical Microbiology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: Forty one carbapenemase producing *K. pneumoniae* clinical isolates were collected from four medical centers. The distribution of carbapenemases shows the predominance of KPC enzymes - (80%). NDM and OXA enzymes have been proven. Isolates were grouped into 7 clusters. KPC producers showed the presence of 6 clusters with 3 to 6 representatives. NDM producers belonged to one cluster. We found it in all participating clinics, associated with the production of CTX-M-15 like enzymes. The determination of antimicrobial susceptibility showed high levels of resistance, they retained high sensitivity only for amikacin. Colistin, tigecycline and fosfomycin also had very good sensitivity. Sixty-nine percent of all *E. coli* isolates belonged to the highly virulent B2 phylogenetic group and were predominantly associated with the production of CTX-M-15 enzymes. In a very high percentage were detected genes encoding type 1 fimbriae, gene encoding a receptor for a yersiniobactin and for a protein specific for uropathogenic microorganisms.

Scientific publications and presentations:

- Markovska R, Keuleyan E, Stankova P et al. Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to cephalosporins third generation collected from patients in Bulgarian hospitals. C. R. Acad. Bulg. Sci. 2018;71(8):1130-8

- Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, et al. Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Dec; 89(4):310-313.
- Markovska R, Stoeva T, Stankova P et al. Wide dissemination of CTX-M-15 producing *Klebsiella spp.* in Bulgarian hospitals. XV Congress BAM. Sofia, 17-19 May, 2017:19-20.

Contract 14/2016 Study the role of angiotensin AT1 receptors in mechanisms regulating brain reactivity in kainate model of epilepsy in hypertensive and normotensive Wistar rats

Research team: Prof. Nikolai Elenkov Lazarov, MD, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Jana Tchekalarova, PhD - BAS
- Assist. Prof. Angel Dandov, MD, PhD
- Assist. Prof. Dimitrinka Atanasova, PhD - BAS
- Assist. Prof. Zlatina Nenchovska, PhD student
- Assist. Todor Kirov
- Andrey Valchev, student
- Sabina Mitova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Anatomy, Histology and Embryology

RESULTS: The aim of the present project was to study the effect of continuous treatment with the selective AT1 receptor antagonist losartan on changes in spatial hippocampus-dependent memory during chronic phase of kainate-induced epilepsy in spontaneously hypertensive (SHRs) and normotensive Wistar rats. Losartan was administered at a dose of 10 mg/kg/day for a month during a period of epileptogenesis. The spontaneous epileptiform activity and chronic epilepsy were verified by a video 24-h recording. Spatial memory was studied by radial arm maze (RAM) while expression of AT1 receptors in specific brain structures by immunohistochemistry. The results of this study showed strain-dependent variations in spatial memory under physiological and pathological conditions. Hypertensive rats demonstrated better performance compared to normotensive rats under physiological conditions and after status epilepticus. Long-term treatment with losartan showed alleviating effect on impairment in the hippocampus-dependent memory of Wistar rats with epilepsy. The results of immunohistochemistry study of plastic changes in AT1 receptors and in particular the effects of continuous treatment with losartan in specific brain structures in SHRs and Wistar rats showed that chronic phase of KA-induced model of temporal lobe epilepsy is characterized by an up-regulation of CA1, CA2, CA3a, CA3c fields and hilus of dentate gyrus but lower immunoreactivity in the piriform cortex. Unlike the normotensive Wistar rats, in the hypertensive rats was found increased expression in the basolateral amygdala. The selective AT1 antagonist losartan showed stronger suppression of the increased immunoreactivity in a model of comorbid hypertension and epilepsy. In conclusion, our results have theoretical and applied meaning for improving the therapy with antihypertensive drug losartan comorbid hypertension and epilepsy.

Scientific publications and presentations:

- Ivanova N, Tchekalarova J, Atanasova D, et al. Strain-dependent effects of AT1 receptor antagonist losartan on spatial memory performance of Wistar and spontaneously

hypertensive rats in kainate model of temporal epilepsy. C R Acad Bulg Sci. 2018;71(6):839-46.

- Tchekalarova J, Atanasova D, Nenchovska Zl et al. Agomelatine protects against neuronal damage without preventing epileptogenesis in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis. 2017; 104:1-14.
- Atanasova D, Tchekalarova J, Ivanova N et al. Losartan suppresses the kainate-induced changes of angiotensin AT₁ receptor expression in a model of comorbid hypertension and epilepsy. Life Sci 2018;193:40-6.
- Ivanova N, Atanasova D, Lazarov N, et al. Study role of AT₁ receptors on spatial memory impairment in the kainate model of epilepsy. Scientific Meeting of Bulg Soc Physiol Sci - Sofia branch, 25 Nov, 2016, page 8.
- Goranova P, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Effects of chronic treatment with agomelatine on seizure activity, comorbid behavioral changes and neuronal damage in the kainate model of temporal lobe epilepsy. XVII Intern Cong Med Sci, Sofia 11-14 May, 2017, page 112.
- Tchekalarova J, Atanasova A, Atanasova M, et al. Antidepressant effect of chronic agomelatine treatment in kainate model of epilepsy-associated depression involves a suppression of inflammatory signalling. Neurogenesis in the developing and adult primate brain, Varna, 19-21 May 2017, page 1.

Contract 15/2016 Role of the cannabinoid and the catecholaminergic systems on nociception and Behavioral responses after stress in rats

Research team: Assist. Prof. Hristina Hristova Nocheva-Dimitrova, MD, PhD

- Prof. Adriana Bocheva, MD, PhD
- Assoc. Prof. Roman Tashev, MD, PhD
- Assoc. Prof. Dimo Krastev, MD, PhD
- Assist. Prof. Radka Tafrađjiiska, MD, PhD
- Assist. Prof. Mimoza Tzvetkova, MD, PhD
- Assist. Prof. Ivelina Himcheva - MU-Plovdiv
- Dimitar Kochev, PhD student
- Ljudmila Yankova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pathophysiology

RESULTS: The results obtained concord with our expectations about the interactions between the cannabinoids and the catecholaminergic systems. Immobilization stress-induced analgesia (I-SIA) was potentiated mainly by Desipramine administered both before the CB₁-receptors agonist anandamide and the CB₁-receptors antagonist AM251. Cold stress-induced analgesia (C-SIA) is also mainly influenced by Desipramine. The analgesic effect is when administered before anandamide fades after the 20-th min, while AM251 elongates the analgesic even after the 30-th min of the experiment. Heat stress-induced analgesia (H-SIA) mainly increases after Clonidine, and its effect is most pronounced when administered before the agonist than before the antagonist AM251. The three types of stress (immobilization, cold, heat) worsen memory and learning behavior in experimental animals. The combined application of Clonidine and anandamide improve learning after all three stresses, while AM251 and Desipramine don't

change it. As for the exploratory behavior, anandamide and the catecholaminergic system decrease vertical and horizontal movements in experimental animals. The results acquired are concordant with the hypothesis of the scientific team about the interactions between the endogenous and the adrenergic systems. Both the systems influence pain perception, exploratory behavior, motor activity, learning and memory. The analysis of the results obtained shows that SIA is mostly increased after cold stress and the administration of the inhibitor of epinephrine re-uptake Desipramine along with the CB1-receptors agonist anandamide.

Contract 16/2016 Model of depression: Participation in behavioral reactions of angiotensin II microinjected to into the amygdala of rats

Research team: Assoc. Prof. Roman Emilov Tashev, MD, PhD

- Prof. Alexander Stoynev, MD, PhD, DSci
- Prof. Adreana Bocheva, MD, PhD
- Assist. Prof. Hristina Nocheva, MD, PhD
- Assist. Prof. Radka Tafradjiiska, MD, PhD
- Assist. Prof. Mimoza Tzvetkova, MD
- Dimitar Kochev, MD, PhD student
- Todor Toromanov, student
- Petra Vasileva, student
- Ludmila Yankova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pathophysiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: The effects of angiotensin II (Ang II) and losartan (AT1 receptor antagonist) infused unilaterally or bilaterally into the central nucleus of the amygdala (CeA) of rats with a model of depression (olfactory bulbectomy, OBX) on exploratory behavior, locomotor activity, anxiety and nociception were examined. The changes in exploratory and locomotor activity were registered in an Opto Varimex apparatus. The increased exploratory and locomotor activity with disturbed habituation is a typical behavioral phenomenon in OBX rats. It was found that Ang II (50 µg) microinjected into left CeA increased exploration and locomotion in bulbectomized rats, while losartan (100 µg) infused bilaterally and into the left-side, decreased them, as compared to OBX controls. The effects of Ang II and losartan microinjected uni- and bilaterally into CeA of depressive rats on anxiety (plus-maze) were investigated. Infusion of Ang II did not change the anxiety-like behavior of OBX rats, while losartan microinjected bilaterally and left-side showed an anxiolytic-like behavior. The nociception was examined by applying mechanical pressure on the paw of the rat (analgesy-meter). Ang II microinjected bilaterally and into right-side CeA decreased the pain threshold (nociceptive effect). The inhibition of AT1 receptors by losartan microinjected uni- or bilaterally into CeA of bulbectomized rats, increased pain threshold (antinociceptive effect) compared to the respective OBX controls; the antinociceptive effect was more pronounced in the right-side. Thus, the effects of Ang II and losartan were opposite and asymmetric into left and right amygdala. This study for the first time provides information on a pronounced lateralized losartan effect on the exploratory behavior, locomotor activity, anxiety, nociception and point to a possible AT1 receptors involvement in the mechanisms of depressive-

like syndrome, suggesting an asymmetry of the Ang II-connected behavior responses of the left or right CeA and a different distribution of AT1 receptors into the two hemispheres.

Scientific publications and presentations:

- Tashev R, P Vasileva, S Belcheva, et al. Differential effects of angiotensin II and losartan on exploratory behavior after microinjections into rat amygdala. Jubilee Conferences "Audacity and youth in pharmacology". Zigor chark, Oct 7-9, 2016.
- Tashev R, H. Nocheva, M. Tzvetkova et al. Differential effects of angiotensin II and losartan on exploratory behaviour after microinjections into rat amygdala. C R Acad Bulg Sci. 2017;70(6):863-70.
- Tashev R, S Belcheva, T Toromanov, et al. Asymmetry in exploratory behaviour to losartan microinjected into amygdala in rats with a model of depression. Jubilee Conferences "Audacity and youth in pharmacology". Zigor chark, Oct 7-9, 2016.

Contract 17/2016 Role of hormones leptin, adiponectin, and ghrelin in the mechanisms of insulin resistance in hypo- and hyperfunction of thyroid gland

Research team: Assoc. Prof. Teodora Svetoslavova Handjieva-Darlenska

- Prof. Nadka Boyadjieva, MD, PhD
- Desimira Mironova, PhD student
- Galina Dobrevska
- Kalina Kamenova
- Rosica Metodieva

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and toxicology, Zdrave str. 2, Sofia, 1000

RESULTS: The presented study followed the correlation between thyroid disorders and mass tissue endocrine changes. The models of experimentally induced disorders of the thyroid gland were created by drug application of Propycil 50 mg, ALMEDA LTD, daily dose 1 mg/ml for hypothyroidism and L-tyroxin 100 µg, Berlin-Chemie, in dose of 2µg/ml for. The change in body weight was followed and a slight difference was found out, that is related to the short period of one month. A biochemical assessment of the thyroid hormones was applied. (TSH, fT3, fT4). Those changes confirmed the successful models- for hypothyroid models TSH levels 20,49 ng/ml; for the hyperthyroid group- 1.05 ng/ml and control group 1.08 ng/ml. The measurement only of fT3 and fT4 is not sufficient due to the difference connected with the conversion of fT4 to fT3 as well as the factors of the environment. The endocrine connection between thyroid gland and mass tissue was also followed by the results of the changes in leptin, adiponectin and ghrelin levels. A positive relationship between leptin levels and TSH was found, which is also connected to the metabolic disorders that accompany the thyroid dysfunction. Mean levels of leptin in hypothyroid group were 2,28 ng/l compared to 1,81 ng/l and control group- 2.56 ng/l. Those data show that the higher fT3 levels have a protective role in the leptin resistance, which confirms the information about fT3 hormones and their effect on leptin secretion. Insulin resistance was established as well by HOMA- index calculation. Immunoreactive insulin and morning glucose levels were followed. It was noticed that the hypothyroid group were with lower glucose levels (mean value 7,48 mmol/l). That was an unexpected phenomenon. That might be due to the factor of the nature.

Scientific publications and presentations:

- Mironova D, Darlenska T. Hypothyroidism leads to leptin resistance in male Wistar rats, ECO2017 - the 24th Eur Congress on Obesity, Portugal, Porto, 17 to 20 May 2017, p 96
- Mironova D, Darlenska T. The effect of metformin and SGLT 2 inhibitors on insulin resistance in rats with experimental model of hypothyroidism, Eur Obesity Summit (EOS) - Joint Congress of EASO and IFSO-EC, Gothenburg, Sweden, Jun 1 - 4, 2016, p 94.
- Mironova D, Darlenska T. Experimental model of hypothyroidism in male Wistar rats. Int Congress of Medical Sciences (ICMS), 12.05-15.06.2016
- Mironova D, Darlenska T. Effects of Empagliflozin on body weight in male Wistar with experimentally induced hypothyroidism, 6th Congress of Pharmacy 13-16.10. 2016

Contract 18/2016 The role of kiotorphin in behavioral and histological changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease

Research team: Prof. Boycho Vasilev Landzhov, MD, PhD

- Assoc. Prof. Lina Malinova, MD, PhD
- Assist. Prof. Alexandar Iliev, MD, PhD
- Assist. Prof. Stancho Stanchev, MD, PhD student
- Assist. Prof. Hristina Angelova, PhD student
- Assoc. Prof. Daniela Pechlivanova - BAS
- Assoc. Prof. Elena Dzhambazova - SU

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Anatomy, Histology and Embryology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: In the present study we found significant changes in brain structures and behavioral characteristics of rats with an experimental model of sporadic Alzheimer's disease (AD) induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ, icv). The early phase of model development (one month after injection) is characterized by increased motor and exploratory activity, decreased level of anxiety, single spontaneous seizures and memory impairment. Sub-chronic treatment with the dipeptide kiotorphin (KTP, icv) 7 days before and 7 days after administration of the toxin inhibited the anxiolysis and abolished the memory-damaging effect of the experimental model but did not result in a decrease in motor activity. During the advanced phase of AD (four months after the induction), we recorded an abnormal habituation with high levels of motor and exploratory activity, anxiolysis and impairment of working and spatial memory. KTP treatment during the initiation of the model in rats normalised habituation and a state of anxiety in an unknown environment and prevented memory impairment but did not change the disturbed spatial memory. Histological studies in rats four months after induction of AD showed morphological changes in brain structures associated with cerebral ventricular enlargement, decreased volume of hippocampus and neocortex. Selective staining with Congo red showed deposition of A β amyloid in hippocampus and cerebral blood vessels. Rats pre-treated with KTP did not show significant changes in the levels of A β amyloid in specific brain structures compared to the saline treated group of AD. The histochemical findings indicate that NADPH-d expressing neurons are highly susceptible to neurodegeneration and that NO and KTP might contribute to the pathogenesis of AD. Taken together data show a moderate protective

effect of the dipeptide KTP after its injection into the brain, on the pathological changes induced by an experimental model of AD in the rat.

Scientific publications and presentations:

- Angelova H, Iliev A, Stanchev S, et al. Expression of NADPH-d reactive neurons in hippocampus of Alzheimer's disease rat model. A histochemical study. X Int symposium on clinical anatomy, 6-8 October 2016, Varna, Bulgaria. Scripta Scientifica Medica, vol. 48, 2016, supplement 2, pp 42-43.
- Angelova H, Pechlivanova D, Dzhambazova E, et al. Effects of kyotorphin on the early behavioral and histological changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. C R Acad Bulg Sci 2018;71(3):424-30.
- Angelova H, Pechlivanova D, Dzhambazova E, et al. Role of kyotorphin in the behavioral changes induced by an experimental model of Alzheimer's disease in rats. Bulgarian society of physiological sciences, 25 Nov 2016, Sofia, Bulgaria, p. 12.
- Angelova H, Pechlivanova D, Dzhambazova E, et al. Impact of sub-chronic intracerebroventricular injection of the dipeptide kyotorphin on the behaviour in a model of sporadic Alzheimer's disease. Of mice and mental health: facilitating dialogue between basic and clinical neuroscientists. London, 24-25 Apr 2017. P20.
- Angelova H, Katsiou A, Pechlivanova D, et al. Behavioral alterations induced by a model of sporadic Alzheimer disease: influence of an intracerebroventricular injection of the kyotorphin. 16th Int Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors, May 11-14, Sofia, Bulgaria, 2017. p. 91.
- Korcheva K., Angelova H, Dzhambazova E, et al. Changes in rat's brain on 2nd and 5th month after Alzheimer's disease model. 16th Int Congress of Medical Sciences for Students and Young doctors, May 11-14, Sofia, Bulgaria, 2017. p. 97.

Contract 19/2016 Role and distribution of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the epiligament of collateral ligaments of the knee joint in rat under normal and experimental conditions

Research team: Assoc. Prof. Lina Georgieva Malinova, MD, PhD

- Assist. Prof. Georgi Georgiev, MD, PhD
- Prof. Boycho Landzhov, MD, PhD
- Iva Dimitrova, MD
- Assist. Prof. Alexandar Iliev, MD, PhD

Organization unit: Medical University - Sofia, Dept. of Anatomy, Histology and Embryology

RESULTS: The aim of this study was to investigate the presence of matrix metalloproteinase-2 and 9 (MMP-2 and 9) during early healing of the medial collateral ligament epiligament in rat knee model. We describe and compare the different expression of MMP-2 and 9 in the epiligament (EL) of the medial collateral ligament (MCL) of the rat knee. The MCL of the knee joint of twelve male Wistar rats was surgically transected and was left to heal spontaneously in nine of them. On the eighth, sixteenth, and thirtieth day after injury, the animals were sacrificed and the ligaments were examined. The MMP-2 and 9 distributions were investigated in these periods. The description of the EL and the expression of MMP-2 and 9 were implemented by light microscopic and immunohistochemical analysis. The expression of the MMP-2 and MMP-9

was found in the adventitia of the vessels and in the fibroblast in the EL. The reaction of MMP-2 and 9 was more intensive in comparison to MMP-9. We present one of the first study of immunohistochemical localization and distribution of the enzyme MMP-2 and 9 in EL tissue and furthermore we describe and compare the enzyme activity of MMP-2 and 9 in the EL. We observed a well defined immunopositive reaction in all periods after surgical trauma, in contrast with normal tissue. We also discovered that the main source of MMP-2 is localized in the epiligament tissue. The current study offers a more complete description of the epiligament healing process and illustrates for the first time the presence of MMPs during epiligament healing.

Scientific publications and presentations:

- Iliev A, Georgiev GP, Dimitrova IN, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. Acad Anat Int. 2016;2(2):44-8.
- Georgiev GP, Iliev A, Landzhov B, et al. Localization of matrix metalloproteinase-2 in injured medial collateral ligament epiligament in rat knee. C R Acad Bulg Sci. 2017;70:273-8.
- Iliev A, Georgiev GP, Landzhov B, et al. Localization of matrix metalloproteinase -2 and - 9 in the medial collateral ligament epiligament in rat knee. X Int Symposium on Clinical Anatomy. Varna, Bulgaria. Oct 6-8, 2016. A45.

Contract 20/2016 Participation of angiotensin AT1 receptors in the mechanism of behavioral changes in spontaneously hypertensive rats with with diabetes mellitus type 2

Research team: Prof. Alexander Gueorguiev Stoynev, MD, PhD, DSci.

- Assist. Kiril Petrov, MD
- Assoc. Prof. Daniela Pechlivanova, PhD - BAS
- Rumiana Mitreva

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine

RESULTS: The aim of this study was to investigate the effects of subchronic treatment with the angiotensin AT1 receptor antagonist losartan on behavioral and biochemical changes induced by type 2 experimental diabetes mellitus (T2DM) in normotensive (Wistar) and spontaneously hypertensive rats (SHRs). The experimental model of T2DM was induced by a combination of a long-term administration of a saturated fat-rich fat diet and a single i.p. injection of streptozotocin (STZ, 30 mg/kg) to animals treated subchronically with losartan (10 mg/kg daily, i.p., for 15 days). Weight gain, food and water intakes and excreted urine were studied by means of metabolic cages= Bblood glucose concentrations were determined by test strips. Behavioral experiments for study of motor activity, anxiety, nociception, working memory were carried out two weeks after the injection of STZ. Our data showed an increase in blood glucose levels, a decreased weight gain and increased water intake in T2DM-SHRs. Subchronic treatment with losartan normalized the weight gain of SHRs and increased 24-hour water intake in T2DM-SHRs.T2DM decreased motor activity in the two rat's strains, which was partially abolished after losartan treatment without significantly affecting the level of anxiety behavior. T2DM reduced the pain sensitivity and induced damage in short-term memory in SHRs without causing such changes in normotensive rats. Losartan treatment reduced the T2D-induced abnormalities in

SHRs behavior and improved short-term memory in normotensive rats with a T2DM model. Losartan treatment showed a moderate protective effect on post- T2DM induced adverse changes in rat behavior, and this effect was more pronounced in rats with spontaneous hypertension.

Scientific publications and presentations:

- Petridis A, D Pechlivanova, K Petrov, et al. Behavioral characteristics of normotensive Wistar and spontaneously hypertensive rats with an experimental model of diabetes mellitus type 2. Black sea symposium for young scientists in biomedicine, 6-9 Apr 2017, Varna, A119.
- Pechlivanova D, Petrov K, Mitreva R, et al. Effects of AT1 receptor antagonist losartan on the type 2 diabetes mellitus-induced behavioral changes in Wistar rats. XXVII Int Scientific Conference of Assembly of Scientists – Stara Zagora 1-2 Jun 2017

Contract 21/2016 Участие на аденозин A₁ рецепторите и азотния оксид, синтезиран от невроналната форма на азотен оксид синтазата в регулацията на бързите колебания на бъбречния кръвоток у плъхове

Research team: Assoc. Prof. Yuri Penkov Nyagolov, MD, PhD

- Petya Markova, PhD
- Lazar Mitrov, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Physiology

RESULTS: The studies were conducted on anesthetized male Wistar rats. The renal blood flow (RBF) and arterial blood pressure (ABP) were registered directly (Biopac MP150WS). The fast fluctuations of systolic (SAP), diastolic (DAP), mean (MAP) arterial pressure as well as fluctuations in the maximum (MAX), minimum (MIN) and mean (MEAN) values in the RBF wave (LabView 3.11) were investigated by spectral analysis. In the spectrograms of ABP and RBF, the low (L: 0.020-0.195 Hz), mid (M: 0.195-0.605 Hz) and high (H: 0.605-3.00 Hz) frequency band were studied. The percentages of low (L /T%), mean (M/T%) and high frequency (H/T%) fluctuations in the overall variation (T) of ABP and RBF were studied. To study the role of adenosine A₁ receptors; NO synthesized from the neuronal nitric oxide synthase (nNOS), as well as the role of L-type Ca²⁺ channels in RBF regulation a selective adenosine A₁ receptor agonist N6-Cyclopentyladenosine (0.125 mkg.kg⁻¹.min), a selective inhibitor of nNOS 7-Nitroindazole (2mg.kg⁻¹.h) and a selective L-type Ca²⁺ channel blocker Amlodipine besylate (200 mkg.kg⁻¹ bolus + 50 mkg.kg⁻¹.h infusion) were applied. The results showed that adenosine via A₁ receptors as well as NO synthesized by nNOS, have a significant role in regulation of fast fluctuations of RBF and ABP. We have found interaction between them in the RBF regulation and in modulation the sympathetic mediated RBF midrange fluctuations. We assume that adenosine is involved in the regulation of RBF by activating A₁ receptors, through a mechanism excluding interaction with L-type Ca²⁺ channels. We have found that the activity of L-type Ca²⁺ channels plays an important role in controlling the RBF and the fast mechanisms involved in its regulation. Under conditions of inactivated L-type Ca²⁺ channels NO synthesized by nNOS plays a significant role in generating fast fluctuations of RBF.

Scientific publications and presentations:

- Mitrov L, Pramatarova D, Markova P, et al. Involvement of adenosine acting by adenosine A1 receptor subtype and neuronal nitric oxide synthase in the renal blood flow

Contract 23/2016 Effects of quercetin and dihydroquercetin on the apoptotic signaling cascade in normal human keratinocytes

Research team: Assoc. Prof. Valentin Stoychev Lozanov, PhD

- Assoc. Prof. Maria Dragneva, PhD
- Assist. Prof. Vesela Lozanova
- Assist. Prof. Violeta Dimitrova
- Assist. Prof. Aneliya Vasileva

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: The aim of the present project was to determine the effects of quercetin and dihydroquercetin on normal human keratinocytes, with focus on cell viability, proliferation capacity, morphology and the expression and activity of components of the apoptotic signaling cascade. Treatment of keratinocyte cultures with quercetin (0-100 μ M) and dihydroquercetin (0-100 μ M) results in a decrease of the percentage of viable cells, estimated with the MTT test, to up to 72% and 73% when a 24-hour incubation period was used, and up to 61% and 52% when 48 hour treatment was applied. With the decrease in cells viability, were also morphological changes. Using immunocytochemistry and Western blot analysis it was determined that treatment with quercetin and dihydroquercetin at a concentration of 10 μ M does not result in a change in the level of expression of different proteins, components of the apoptotic signaling cascade, including the executor caspase caspase-3 and various components of the MAP signaling cascade. In the tested primary cultures of normal human keratinocytes, isolated from skin, neither quercetin, nor dihydroquercetin treatment resulted in a significant change in the level of expression of MEK-1/2, p38 MAPK, ERK-1/2, and the kinase Akt. Treatment of cells with those two compounds did not result also in a significant change in the levels of free radicals in the cell. Treatment of normal human keratinocytes with the antioxidants quercetin and dihydroquercetin at a concentration of 10 μ M does not result in a change in the level of several key regulatory proteins in the cells, but significantly alters cell morphology. The observed morphological changes could not be explained by the induction of apoptosis via the classical mitochondrial and extracellular pathway, mediated by the death receptors.

Scientific publications and presentations:

- Lozanova V, Dimitrova V, Vasileva A, et al. Effects of quercetin and dihydroquercetin on proliferation and morphology in normal human keratinocytes. Second PhD symposium. Institute of Molecular Biology "Acad. Roumen Tsanev", BAS, 6-7 Apr 2017, p.33

Contract 24/2016 Analysis of somatic mutations in the main lung cancer histologic subtypes: SCC, AC, NET (CT, SCLC and LCNET) in group of Bulgarian patient by NGS of tumour-associated genes

Research team: Assist. Prof. Atanaska Velichkova Mitkova, PhD

- Assoc. prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad prof. Vanyo Mitev, MD, DSci
- Gergana Stancheva, PhD
- Darina Kachakova, PhD
- Ivan Popov, PhD
- Kalina Mihova
- Prof. Yanina Slavova-Marinova, MD
- Prof. Dimitar Kostadinov, MD
- Assist. Dora Marinova, MD
- Evgeni Mekov, MD
- Aleksandar Lilov, DM

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical chemistry and biochemistry, Zdrave Str. 2, 1431 Sofia

RESULTS: In the current study DNA isolated from tumour tissues of 8 patients with AC and 6 with SCC were included. Somatic mutations in panel of 48 tumour-associated genes (TSACP) were analyzed by NGS platform MiSeq (Illumina). The performed bioinformatics analysis showed that the most frequent mutated gene in studied samples is *TP53* with 10 different pathogenic variants. Pathogenic mutations in *TP53* were found in 5 patients with SCC and in 5 patients with AC. Four of them are present in more than one patient (p.Arg156fs; p.Asn200fs; p.Ser99Cys и p.Tyr236Cys). The second most commonly mutated gene in the analyzed group of patients is *KRAS* gene. We found the following activating variants p.Ala11Val, p.Gly12Cys, p.Gly12Val, p.Gly12Asp. The mutation p.Gly12Val was detected in four patients. Very often with the mutation in *KRAS* gene were observed mutations in *TP53*, *GNAS* and *STK11*. In the studied group of patients EGFR mutations were not observed but in one of them with AC we found BRAF V600E mutation leading to decreased sensitivity to TKI- gefitinib treatment and good response to therapy with vemurafenib or dabrafenib. In addition the pathogenic mutations p.Ser1355fs in *APC* and p.Ala201Gly in *RBI* were detected. In conclusion, molecular profiling of lung cancer with NGS reveal new opportunities patient stratification for existing target therapies and finding new therapeutic target, which is a step forward in individualized medicine.

Scientific publications and presentations:

- Mitkova A. Molecular profiling and target therapy in solid tumors”, Symposium “Chudomir Natchev” – Application of New Technologies in Genetic and Genomic Diagnostics 03.12.2016.
- Petkova V. et al. Analysis of somatic mutations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas with targeted NGS. 2th Balkan Congress of Human Genetics, Plovdiv 8-10.09.2017

Contract 25/2016 Investigation of quality of oogenesis in vivo and in vitro in oocytes from mice with experimentally induced systemic lupus

Research team: Assoc. Prof. Stefka Metodieva Delimitreva, PhD

- Assoc. Prof. Maya Markova, PhD

- Assoc. Prof. Ralitsa Zhivkova, PhD
- Assist. Prof. Venera Nikolova, PhD
- Assist. Prof. Irina Chakarova, PhD
- Assist. Prof. Valentina Hadzhinesheva
- Assist. Prof. Katerina Kavaldzhieva
- Assoc. Prof. Andrey Tchorbanov, PhD – BAS
- Assist. Prof. Kalina Nikolova-Ganeva, PhD – BAS
- Violeta Kostadinova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Biology

RESULTS: The aim of this study was to investigate if (and how) systemic lupus erythematosus (SLE) experimentally provoked in mice changes the quality of their oogenesis. For this purpose, the quality of cytoskeletal and chromatin structures was estimated in oocytes derived by hormonally stimulated ovulation in lupus mice and the results were compared with those from healthy mice. The same experiment was carried out with in vitro matured oocytes derived from lupus and healthy mice. Lupus was induced through intraperitoneal injection of hydrocarbon oil Pristane in Balb/c mice. Flow cytometry was used to detect CD25/CD69 activation markers. The levels of cytokines, autoantibodies and autoantibody-producing plasma cells were quantified by ELISA, ELISpot and protein array. Ovulated in vivo matured oocytes were derived from oviducts after hormonal stimulation. Oocytes for in vitro maturation were derived from preovulatory ovarian follicles. Chromatin, tubulin and actin structures in oocytes were detected by Hoechst 33258, anti alpha-tubulin antibody and rhodamine-labeled phalloidin, respectively. The total number of obtained metaphase oocytes from lupus mice was lower compared to healthy controls. The maturation rate was 9,8% for lupus mice, 12,7% for 7 months old controls and 14,3% for the younger controls. For each oocyte, four characteristics were described – spindle morphology, actin cap, chromosomal condensation and alignment. Two major differences were detected. First, the lowest quality of metaphase I spindles in ovulated oocytes was registered for those derived from lupus mice (60% normal spindles). For young and older controls this proportion was 86% and 81% respectively. For metaphase II spindles such difference was not registered. For both metaphase I and metaphase II oocytes, no difference was detected in the proportions of normal actin cap, chromosomal condensation and alignment. Second, in all in vitro matured oocytes derived from lupus mice all metaphase I and metaphase II spindles as well as their actin caps were disorganised.

Scientific publications and presentations:

- Zhivkova R, M Markova, V Hadzhinesheva et al. Factors of reproductive failure in women with lupus erythematosus *Akusherstvo i ginekologija* 2016;55(7):20-3.
- Kostainova V, R Zhivkova, M Markova, et al. Autoimmunity and reproduction – lessons from the animal models. VIIth working meeting “Reproductive medicine 2017 – contradictions and consensus” 28-30 Apr 2017, Pleven

Contract 26/2016 Association analysis of polymorphic markers or/ in to the selected candidate - genes associated with susceptibility to arterial hypertension in Bulgarians

Research team: Prof. Kiril Lyubenov Naydenov

- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, PhD

- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Assoc. Prof. Dobrin Vasilev, MD, PhD
- Prof. Romyana Tarnovska-Kadreva, MD
- Assist. Prof. Teodora Yaneva-Sirakova, MD, PhD
- Reni Tzveova, PhD student

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave str. 2, 1431, Sofia

RESULTS: The study included 108 hypertensive patients and 112 population controls. We tested the possible association of rs9349379 in *PHACTR1* gene with the risk of developing arterial hypertension in Bulgarian population. The studied variants were genotyped by using TaqMan genotyping assays (Applied Biosystems). Non-adjusted χ^2 -based analysis was applied for evaluation of *PHACTR1* genotype and allele association with AH by using the PLINK 1.7. All patients in current study were with difficult antihypertensive control. The mean hypertension history was 11.98 (± 8.91) years. The mean Home Measured Blood Pressure Values were: 142.59 (± 18.81) mmHg for the systolic, 83.33 (± 10.37) mmHg for the diastolic and 58.84 (± 13.60) mmHg. There was not found statistically significant difference in distribution of allelic and genotypic frequencies of a selected polymorphic variant with primary AH in general population and in the female subgroup. Statistically significant difference in distribution of allelic frequencies for studied genetic marker was found only in group of men ($p=0.03$), which shows the association of this polymorphism with susceptibility to the AH development in Bulgarians. Probably, studied polymorphic variant is associated with the pathogenesis of high blood pressure and this relation is a sex depended. In order to confirm this finding should be increased the number of patients and control subjects. Because of the extremely weak effect of the studied polymorphism in relation to the risk of primary hypertension, the test sample of patients and population controls is not sufficient and despite the relatively high values of OR 2,206 [SE 0,3676 (1,073-4,534)], statistical significance was not observed or it was with very weak effect.

Contract 27/2016 Analysis of somatic mutations in Bulgarian patients with colorectal and gastric carcinomas by Next generation sequencing of a panel of tumor-associated genes

Research team: Prof. Georgi Todorov Todorov, MD, PhD

- Assoc. Prof. Kostadin Angelov, MD, PhD
- Mariela Vasileva, PhD
- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSc
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Assist. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Daniela Dacheva, MSc
- Romyana Dodova, PhD
- Gergana Stancheva, PhD
- Ivan Popov, PhD
- Konstantin Grozdev, MD, PhD student
- Mohamed Nabil Hajat, MD, PhD student
- Assist. Prof. Georgi Velev, MD

- Assist. Anton Koichev, MD
- Assist. Prof. Nikolay Goranov, MD
- Assist. Prof. Nikolay Stoyanov Katev, MD, PhD
- Assist. Prof. Kamen Pirinski, MD
- Assist. Prof. Wenzel Mladenovski, MD
- Assist. Prof. Vladimir Neychev, MD, PhD
- Assist. Prof. Vesselin Ilinov, MD
- Assist. Prof. Svetoslav Toshev, MD, PhD
- Assist. Prof. Manol Sokolov, MD, PhD
- Assist. Prof. Svilen Masliankov, MD, PhD
- Assit. Prof. Vasil Pavlov, MD, PhD
- Assist. Prof. Iliya Fidoshev, MD, PhD
- Assist. Prof. Petar Grivnev, MD
- Prof. Svetlana Hristova, MD, PhD
- Assist. Prof. Alexandrina Vlahova, MD
- Assist. Prof. Tihomir Dikov, MD
- Assist. Prof. Diana Stefanova Kyoseva, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Surgery, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: Five colorectal and 5 gastric cancer patients were included in the present study. DNA was extracted from the tumor tissues using a kit (Qiagen). The analysis of somatic mutations in a panel of 48 tumor-associated genes (TSACP) was performed by NGS on the MiSeq platform (Illumina). After evaluation of the raw NGS data, 2 of the gastric carcinomas were excluded from the study due to poor coverage. The bioinformatic analysis revealed 12 pathogenic (5 FS, 1 SG, 6 "missense") of total of 27 variants (44.4%) in the colorectal and 6 (3 FS, 3 "missense") in the gastric tumors (50%, 6/12). Seven of the tumors harbored more than one mutation. The most commonly mutated gene in the colorectal tumors was TP53, in which 4 pathogenic variants were identified (33%, 4/12). One FS in FGFR3 was observed in two patients. Mutations were also found in BRAF (p.Val600Glu), HNF1A, JAK3, SMAD4, APC, SMARCB1 and GNAS. Each of them was observed once with a frequency of 8.3% (1/12). One pathogenic "hot-spot" variant in PIK3CA and 2 in HNF1A were discovered in all three gastric carcinomas. Mutations were also found in EGFR (one FS in 2 patients), KDR (one "missense" in 2 patients) and TP53 (one "missense" in 1 patient). In conclusion, somatic mutations not only play an important role in tumorigenesis of gastric and colon carcinomas but are reliable molecular biomarkers for diagnosis, prognosis, precise tumor typing, and choice of therapy. Molecular profiling of tumors through NGS opens up new opportunities for personalized treatment.

Scientific publications and presentations:

- Molecular profiling and target therapy in solid tumors”, Lecture, Symposium “Chudomir Natchev” – Application of New Technologies in Genetic and Genomic Diagnostics. Presidium of Bulgarian Academy of Sciences. 29.10.2016

Contract 29/2016 Molecular markers with diagnostic and prognostic value for treatment of children’s solid tumours

Research team: Assoc. Prof. Radka Petrova Kaneva, PhD

- Assoc. Prof. Margarita Kamenova, MD - UMHATEM “N.I.Pirogov”
- Olga Bogdanova - UMHATEM “N.I.Pirogov”
- Assoc. Prof. Hristo Shivachev, MD – UMHATEM “N.I.Pirogov”
- Gabriela Slavkova - UMHATEM “N.I.Pirogov”
- Ivan Shtarbanov, MD
- Assoc. Prof. Dobrin Konstantinov, MD
- Daniela Pencheva, PhD
- Gergana Stancheva, PhD
- Assist. Olga Beltcheva, PhD
- Assist. Atanaska Mitkova, PhD
- Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: The relevance of the research topic is determined by the high incidence of PST, their great malignancy potential, with high mortality rates and the possibility to offer the patients reliable therapy when timely and accurate diagnosis is made. A large number of chromosomal aberrations, deletions, duplications and uniparental disomies have impact on WILMS tumour pathogenesis (1q duplications, deletions of 11p, 16q and 22), neuroblastoma (17q duplications, deletions of 1p and 11q) and the rest PST tumours. Apart from the presence of frequent large DNA copy number alterations such as those affecting 17q, 1p, 3p and 11q, the discovery of rare focal genomic imbalances allows the researchers to elucidate the role of other important genes in PST aetiology. MLPA analysis of large genomic deletions/duplications, performed using MLPA kits P251, P252 and P253, showed the highest aberration frequency in chromosome arms 1p, 1q, 2p, 4p and 9p. Survival analysis showed significant negative correlation in patients with duplication in chromosome loci 1p ($p=0.011$), 1q ($p=1.05$), 3p ($p=0.011$) and 3q ($p<0.001$). Duplications in 2p have been observed more frequently in neuroblastoma patients yet no significant association with overall survival in PST patients ($p=0.628$) was found.

Contract 30/2016 Genetic profiling of laryngeal cancer by Next Gen Sequencing

Research team: Prof. Diana Petrova Popova, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Todor Popov MD, PhD
- Assist. Prof. Stanislav Yordanov, PhD
- Dimitar Konov MD,
- Silva Giorgosian, PhD student
- Gergana Stancheva MD
- Darina Kachakova MD
- Kalina Mihova, PhD student
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad. Prof. Vanyo Ivnov Mitev, MD, DSc

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of ENT Diseases, Hospital "Tsaritsa Yoanna - ISUL"

RESULTS: Tumor heterogeneity in larynx cancer is a known feature of these tumors, but the "driver" somatic mutations and processes in which they are still involved are fully and extensively studied. The results obtained from the analysis of samples isolated from fresh blunt tissue in 14 patients (892 variants) were compared, with 498 variants remaining after filtration of the variants. The conditions for analysis of materials from tumor, fresh frozen tissue were established, without giving false positive and negative results. As a result, New Generation Sequence Analysis (NGS) was performed in patients with laryngeal cancer indicating the presence of pathogenic mutations in the patients studied. The total number of annotated variants found in patients with laryngeal carcinoma counts 498 and includes all types of SNVs and small insertions and deletions. A total of 101 known different pathogen mutations were detected - 3 stop-gained mutations, 19 small insertions / deletions, 37 known in the databases and proven pathogenic missense mutations (missense); 14 3'UTR and 15'UTR variants; 22 splice variants that have a role in RNA splicing distributed among 30% of the genes under study. Mutational events are detected in the genes KDR, TP53, HNF1A, FLT, GNAQ and KIT.

Contract 31/2016 Glutamate transporter EAAT2 in brain of rats with a model of neonatal epilepsy and pups with fetal alcohol syndrome

Research team: Prof. Nadka Ivanova Boyadjieva, MD, PhD

- Assoc. Prof. Miroslava Varadinova, MD, PhD, DSci
- Assist. Radoslav Klisurov, MD
- Elena Stefanova, student
- Rositsa Metodieva

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology

RESULTS: Experiments on newborn rats were performed in 2 studies: 1) On pups born from alcohol treated rats during pregnancy; 2) pups with experimental epilepsy (a model of neonatal epilepsy) pretreated with ceftriaxone. Glutamate was detected in nmol/mg protein in cortex of brain of pups by ELISA kit. EAAT was studied by immunocytochemistry method. Result and discussions: 1) Glutamate in the cortex of brain of pups after prenatal treatment with ethanol was elevated significantly as compared with the controls. Ceftriaxone decreased elevated levels of glutamate in brain of alcohol treated prenatally pups. Results demonstrated that alcohol given on pregnant rats increased the glutamate levels of toxic neurotransmitter glutamate. It is possible, that glutamate plays a role in some of neurological brain changes in fetal alcohol syndrome of pups. 2) A model of neonatal epilepsy was developed on pups by i.p. injection of kainic acid (30 mg/kg). Group of pups were pretreated for a period of 10 days with ceftriaxone before kainic acid. Then all rats were decapitated under Nembutal anesthesia and brains/cortexes were taken. Glutamate levels were determined. Results demonstrated that the application of kainic acid caused seizures and increase levels of cortical glutamate. Chronic treatment of pups with ceftriaxone prevented the severe seizures and decreased the glutamate levels in cortex. Studies with ceftriaxone (drug which activates glutamate transporter EAAT2 in brain) suggest a new direction for prophylaxis of neonatal epilepsy by activating the re-uptake of glutamate in brain synapses. Taken together, the results from both studies indicate that glutamate plays a role in fetal alcohol neurotoxicity and in pathogenesis of severe neonatal epilepsy. Ceftriaxone may prevent glutamate neurotoxicity by activating the glutamate transporter EAAT2.

Scientific publications and presentations:

- Boyadjieva N, R Metodieva. Fetal alcohol syndrome and glutamate transporter EAAT2. Medical practice, 2017;3:9-12.

Contract 32/2016 Comparative studies of the effects of risperidone and probiotic on molecular and behavioral parameters of male rats in experimental models of autism and fetal alcohol syndrome

Research team: Assos. Prof. Miroslava Georgieva Varadinova, MD, PhD

- Prof. Nadka Boyadjieva, MD, PhD, DSci
- Assist. Georgi Bogdanov, MD, PhD
- Kalina Kamenova
- Sonya Ivanova
- Rositsa Metodieva
- Spas Kerimov, student
- Elena Stefanova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology

RESULTS: Experimental models of autism and fetal alcohol syndrome (FAS) were developed in the offspring of female rats treated during pregnancy with valproic acid (600 mg/kg i.p.) or 10% aqueous ethanol p.o. The effects of 21-day administration of risperidone (1 mg/kg p.o.) or probiotic (1%, p.o.) on metabolic parameters (body weight, fasting blood glucose levels), nociception parameters (tail-flick test stimulus), learning and memory (latency time and error number in shuttle-box test), proinflammatory cytokines (IL-1beta and IL-6) and BDNF concentration in serum were studied. Significant differences in the body weight of rats with a model of autism were found compared to the control animals. In addition, after risperidone or probiotic treatment, an increase in the mean body weight of the rats was recorded in both controls and autistic or FAS rats. A more significant increase in this parameter was observed in the probiotic-treated groups. However, at the end of the experiment, no abnormal glucose levels were recorded in any of the animal groups, and no significant difference was recorded between the groups. The autistic and FAS experimental rats demonstrated a decreased pain threshold, but after probiotic treatment, their tail-flick response time did not differ significantly from that of the controls. In the shuttle-box test, the latency time of FAS rats treated with probiotics was comparable to that of the control animals. In addition, the most significant shortening of latency in the 5-day training sessions in the shuttle-box is recorded in autistic groups treated with probiotics, and especially with risperidone. BDNF study data showed elevated values in probiotic-treated autism model rats. Taken together, our results suggest an important role in the use of risperidone and/or probiotic for the improvement of cognitive parameters in autistic and FAS patients. In addition, our data show the significance of the microbiome, the function of the GIT-CNS axis and the potential beneficial effects of probiotics in the treatment of different autistic symptoms and other neuronal developmental disorders.

Scientific publications and presentations:

- Varadinova M, Bogdanov G. Experimental Models of Autism and Fetal Alcohol Syndrome: Study of Learning and Memory Parameters. Jubilee Conferences on Pharmacology and Clinical Pharmacology for Young Scientists. 2016:124-128.

- Varadinova M, Bogdanov G. Experimental models of autism and fetal alcohol syndrome: study of learning and memory parameters. Jubilee Scientific Conference “Audacity and youth in pharmacology”, Zigov Chark, Oct 7-9, 2016.
- Stefanova T, Stefanova Z, Varadinova M. Role of risperidone and probiotic in active avoidance test of rats in experimental model of autism, XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, 2017, p.125.
- Bogdanov G, Varadinova M. Effects of risperidone and probiotic in experimental model of autism: metabolic issues, XVI Int Congress of Medical Sciences, Sofia, 2017, p. 89.

Contract 33/2016 Effect of Pentoxifylline on skin changes in hypothyroid rats

Research team: Assoc. Prof. Georgeta Stoyanova Bocheva, MD, PhD

- Assist. Prof. Georgi Bogdanov
- Assoc. Prof. Lina Malinova
- Kalina Kamenova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of pharmacology and toxicology, G. Sofiyski Str. 1, 1431 Sofia

RESULTS: With this project, using ELISA kits, we measured the levels of cytokines TNF- α и IL-6 in hypothyroid skin after application of Pentoxifylline with doses from 25 mg/kg, 50 mg/kg и 100 mg/kg for 7 days, or without Pentoxifylline treatment. It was found a decrease in pro-inflammatory cytokines that could be explained with slowed metabolism in PTU-induced hypothyroid model. The seven-day treatment of hypothyroid rats with Pentoxifylline showed an increase of TNF- α и IL-6 only in dose of 25 mg/kg, but less than their level in the skin of healthy rats. With histology of the skin sections, we found the characteristic for hypothyroidism mixoedematous dermal changes without any changes in the epidermis. The hypothyroid skin clearly showed retraction between collagen fibers, better visible using van Gieson coloring. Pentoxifylline treatment caused a dose-dependent decrease of proteoglycans depositions in the dermis, histologically visible with a decrease of collagen fibers retraction and normalization of the histology.

Scientific publications and presentations:

- Bocheva G, Bogdanov G. Immunomodulatory effects of the phosphodiesterase inhibitor Pentoxifylline. Jubilee Conferences of Pharmacology and Clinical Pharmacology for young scientistsи - Zigov chark, 7-9 Oct 2016.
- Bocheva G, Bogdanov G, Malinova L. Anti-inflammatory effect of Pentoxiphylline on hypothyroid rat skin. Int workshop metabolic diseases – genetics, epigenetics and proteomics – Sofia, 16-20 May 2017.

Contract 34/2016 Investigation of antidepressant effects of escitalopram and physical activity in experimental models of depression

Research team: Evgeni Yuriev Haritov, MD, PhD

- Doc. Vesela Uzunova-Raykova, MD, PhD

- Petar Angelov, student
- Georgi Galev, student
- Venelin Petrov, student
- Elena Angeleska, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology, Zdrave str. 2, Sofia 1431

RESULTS: The aim of our study is to evaluate the antidepressant and anti-inflammatory effects of combined application of physical activity and escitalopram in LPS-induced model of depression in Wistar rats. Depression was induced by administration on postnatal day 10 (PND 10) of LPS (50 µg/ kg, i.p.). After the weaning of rats at 21 PND, they received escitalopram (10 mg/kg) per os and had a free access to running wheel for 3 weeks. After the end of this period the animals were subject of forced swim test, sucrose preference test and were sacrificed in order to assess the levels of IL-1beta by ELISA in the hippocampus. The results of our study showed that combined application of escitalopram and running wheel produce significantly higher effect, compared to single application of both on immobility time in FST, sucrose consumption and importantly on the reduction of the level of IL-1beta in the hippocampus of rats. The present study provides novel evidence that physical activity act in a synergic manner with SSRI^s in treating depression by suppressing the brain proinflammatory milieu. Our study provides strong evidence that by augmentation of anti-inflammatory properties of SSRI^s, physical activity is valuable tool for the treatment of therapeutic-resistant depression.

Scientific publications and presentations:

- Haritov E, Uzunov I, Radeva J et al. Neuroimmune mechanisms in the antidepressive activity of physical activity. *Lekarska praktika*. 2016;5:20-29.
- Haritov E, Radeva J, Uzunov I et al. Immune mechanisms of psychological stress. *Lekarska paraktika*. 2016;6:17-24.
- Haritov E, Kirkov V, Kirkova M et al. Antidepressive effects of physical activity. *Neurology & Psychiatry*. 2017
- Haritov E, Bosilkova E, Radeva J et al. Interactions between escitalopram and physical activity in neonatal LPS-induced model of depression in rats. *Neurology & Psychiatry*. 2017;48(2):3-15

Contract 35/2016 Validation of potentially pathogenic variants in genes associated with Parkinson Disease found with next generation sequencing

Research team: Assoc. prof. Albena Kirilova Jordanova

- Prof Latchezar Traykov, MD, PhD, DSc
- Assoc. prof. Shima Mehrabian-Spasova, MD, PhD
- Cheff. Assist. Maria Petrova, MD, PhD
- Assoc. prof. Margarita Raycheva, MD, PhD
- Kalina Mihova, MSc
- Daniela Pencheva, PhD
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD,
- Acad. Prof Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

RESULTS: In this study we choose the best candidate genes after next generation sequencing in big Bulgarian cohort including of 69 well characterized patients with Parkinson disease for srragation analysis and testing the variants in healthy control individuals with direct Sanger sequencing. Our findigs shows that variants c.632C>T, c.784A>G and c.1000G>A in *LRRK2*, c.845C>T in *MAPT* and c.581A>G, c.796G>C in *GRN* genes are rare benign polymorphisms. Mutations c.260-262delCTG in *PARK7* and c.1231G>A, in *PINK1* are pathogenic. Our findings contribute to a better understanding the molecular basis of Parkinson disease and have implications for diagnostic testing and genetic counseling in Bulgarian population. The identification of mutations in genes linked to Parkinson disease would clarify their role in disease progression. This would increase opportunities for early diagnosis and clarification of genotype-phenotype correlations that help clarify the function of the protein and its relationship with the pathology of the disease. Our findings contribute to a better understanding the molecular basis of Parkinson disease and have implications for diagnostic testing and genetic counseling in Bulgarian population.

Scientific publications and presentations:

- Mihova K, Verstraeten A, Theuns J, et al. First systematic genetic study of Bulgarian patients with Parkinson disease” 12th Balkan Congress of Human Genetics, 8-10 Sep 2017, Plovdiv, Bulgaria, p. 76-77
- Mihova K. Genetic Genetic markers in Parkinson's disease, Annual Symposium „Acad. Chudomir Nachev“, 03 Dec 2016, Sofia, Bulgaria, p. 14

Contract 36/2016 Production of flavonoids in in vitro cultures of *Astragalus vesicarius* L. and their potential antioxidant activity

Research team: Prof. Iliana Ilieva Ionkova, PhD, DSci

- Hristo Vasilev, PhD student
- Pavlinka Popova
- Boryana Uzunova, student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav str., 1000 Sofia

RESULTS: For the first time the effect of some plant growth regulators and their combination on biomass and flavonoid production in suspension cultures of *A. vesicarius* L. was examined. Higher formation of flavonoids is correlated to good growth of the cells. Content of flavonoids was severally decreased in higher concentrations of auxins. Addition of cytokinin stimulated both proliferation and flavonoid production. Kinetin was favorable for flavonoid production in *A. vesicarius* L. cells. The flavonoid spectrum of conventional crops of the species was studied, identifying for the first time flavonoids in in vitro cultures of the tested species by HPLC. Major flavonoids in all in vitro cultures are of isoquercitrin and apigenin. In the recent years an increasing number of evidences confirm the role of free radicals in the contribution of aging and degenerative diseases associated with it. The potential antioxidant activity was evaluated by an established radical scavenging method using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and the activity was determined by using standard curves from referent substances: ascorbic acid and

hyperoside. The diversity of the flavonoid composition of the suspension cultures from *A. vesicarius* defines the high radical-scavenging activity of extracts from them. The highest activity is shown by suspensions, grown on medium, containing 2 mg/L Kinetin and 0.3 mg/L auxin in light conditions equal to 1217.58 µg equivalent of ascorbic acid and 890.82 µg equivalent of hyperoside. The presence of auxins and darkness suppressed the production of molecules with radical-scavenging potential.

Scientific publications and presentations:

- Vasilev H, P Popova, I Ionkova. Radical-Scavenging Potential of Bioflavonoids from in vitro Cultures of *Astragalus vesicarius* L., 9 CMAPSEEC, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria, p.126

Contract Nr 38/2016 Incorporation of bromo-hydrazones in polymeric nanoparticles and in vitro evaluation of their antioxidant activity

Research team: Prof. Krassimira Pavlova Yoncheva, PhD

- Prof. Nikolai Lambov, PhD
- Assist. Prof. Boryana Nikolova-Mladenova, PhD
- Assoc. Prof. Vera Hadjimitova, PhD
- Assist. Prof. Nadya Hristova-Avakumova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics

RESULTS: Three bromo-derivatives were selected for the study - 5-bromosalicylaldehyde benzoylhydrazone, 5-bromosalicylaldehyde-4-hydroxybenzoylhydrazone and 5-bromosalicylaldehyde isonicotinoylhydrazone. The bromo-hydrazones were loaded into two types of nanoparticles: first type based on chitosan and sodium alginate, and second type based on poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) methyl ether. The chitosan-alginate nanoparticles were characterized with lower polydispersity and were considered as more appropriate carrier for the selected hydrazones. The in vitro release profiles showed that the encapsulation of the hydrazones into nanoparticles provided sustained release. Further, the incubation of the hydrazones with ABTS radical revealed that they possess high antioxidant activity. However, the antioxidant activity decreased with more than 5 % during 5 days storage. The encapsulation of bromo-hydrazones into chitosan-alginate nanoparticles led to retention of their activity during 30 days of storage, whereas the activity of non-encapsulated hydrazones declined with more than 40 %. In conclusion, the encapsulation of the hydrazones into chitosan-alginate nanoparticles seems suitable approach for stabilization and retention of their antioxidant activity.

Scientific publications and presentations:

- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Yoncheva K, et al. Novel hydrazones – antioxidant potential and stabilization via polysaccharide particles. *J Physics* 2017;780(1): 012004.
- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Yoncheva K, et al. Novel hydrazones – antioxidant potential and stabilization via polysaccharide particles. *INERA Workshop, Membrane and Liquid Crystal Nanostructures (MELINA-2016)*, Varna, 3-6 Sep 2016.

- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Hadjimitova V, et al. Antioxidant study of chitosan-alginate particles containing new designed bromo-salicylaldehyde aroylhydrazones. VIth Congress of Pharmacy, Sandanski, 13-16 Oct 2016, 90-91.

Contract 40/2016 Multifactor analysis of extraction combined with liquid-chromatography mass spectrometric determination of biological active substances in *Portulaca oleracea* L. (purslan)

Research team: Assist. Prof. Dimitrina Zhivkova Zheleva-Dimitrova, PhD – Dept. of Pharmacognosy

- Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD
- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Prof. Irini Doychinova, DSci
- Assist. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Assoc. Prof. Paraskev Nedialkov, PhD
- Bilyana Dobрева, student
- Mario Borissov, student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav str., 1000 Sofia

RESULTS: *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) is well known edible and ethno-medicinal plant. Purslane has been called “vegetable for long life” in Chinese herbal medicine. A rapid and reliable ultrasound extraction and liquid chromatography (LC) coupled with quadrupole-orbitrap mass spectrometer method was developed for the determination of 12 phenolic acids together with 2 flavonol glycosides in twelve purslane batches. The ultrasound-assisted extraction, optimized by orthogonal design, was performed at 50°C 2 × 15 min with methanol-water (50:50, v/v) as the extracting solvent, and the solvent to solid ratio was 40:1. The total polyphenol and saponin contents as well as antioxidant activity (DPPH) were used as the criteria for selecting the optimal extraction condition. The accessed phenolic acids and flavonoids were eluted in 10 min on a Kromasil EternityXT C18 (1.8 μm, 2.1×100 mm) column using acetonitrile and formic acid-water solution as a mobile with a flow rate at 0.3 ml/min. All calibration curves showed good linearity ($r > 0.996$) within the tested ranges. Ferulic acid was the major compound being presented with up to 315.39 ± 2.349 ng/g dry weigh. The highest content of gentisic acid was found in Greek purslane batch (35.590 ± 0.419 ng/gdw). With respect to flavonol glycosides, rutin was present in the highest amount, up to 40.135 ± 0.264 ng/g dw in a Bulgarian sample. Data were analyzed by principal component analysis (PCA). The PCA scoring plot grouped most of the Bulgarian batches into one well defined cluster. Two Bulgarian samples displayed the highest combined levels of studied compounds. The PCA loading plot pointed gentisic and caffeic acids as the compounds with the highest contribution in PC1, while chlorogenic and neochlorogenic acids dominate in PC2. In conclusion, the improved LC-HRMS method enables the simultaneous determination of common antioxidants in relatively low concentration levels as well as fingerprint analysis in *P. oleracea* herb.

Scientific publications and presentations:

- Voynikov Y, Nedialkov P, Gevrenova R, et al. Rapid determination of antioxidant compounds in *Portulaca oleracea* L. (purslane) by the optimal ultrasound extraction

combined with liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (LC-HRMS).
First Int Conference on Bio-antioxidants 25-29 Jun 2017, Sofia, Bulgaria.

Contract 41/2016 *Gypsophila glomerata* Pall ex M.B. (Caryophyllaceae): potential source of bioactive compounds

Research team: Assoc. Prof. Reneta Slavova Gevrenova, PhD

- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Assist. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Bilyana Dobрева, student
- Mario Borisov, student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav str., 1000 Sofia

RESULTS: In the present study, a good capacity of germination of *Gypsophila glomerata* Pall ex M. B. seeds was found 3 months after collection (72%). But the seedlings were vulnerable and the plants did not survive at the beginning of their development. We aimed at investigating Glucuronide Oleanane-type Triterpenoid Carboxylic Acid 3, 28-Bidesmosides (GOTCAB) saponins in ethanol-aqueous extract from *G. glomerata* roots (GGR), using liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The methanol extract from aerial parts (GGA) was screened for phenolic acids and C-flavonoids. On the basis of the accurate mass measurements, fragmentation patterns in MS/MS and comparison with authentic references, a total of 41 GOTCAB saponins were identified or tentatively elucidated in GGR, including 12 pairs of isobars/isomers and 17 new saponins. Possible fragmentation pathways for three groups of GOTCAB were suggested. The majority of group I was GOTCAB of gypsogenin with two carbohydrate chains: branched trisaccharide at C-3 and tri- to hexa-saccharide attached to C-28 of the aglycone. Saponins with monoacetylated (group II) or sulfated (group III) C-28 chain were found, as well as quillaic and oleanolic acid GOTCAB. The most of *G. glomerata* saponins occur as isomeric pairs. Seven phenolic acids together with C-glucosylflavones homoorientin, orientin, vitexin, isovitexin and C,O-diglucoside saponarin were evidenced in GGA by LC-HRMS. The content of *Gypsophila* prosaponins, gypsogenin 3-O-glucuronide (7.4079 ± 0.0723 mg/g dry weight) and quillaic acid 3-O-glucuronide (4.4593 ± 0.1207 mg/g), was determined by solid phase extraction – high-performance liquid chromatography (SPE-HPLC). Total phenolic content in GGA reached to 20.59 mgGAE/g extract. Two GOTCAB saponins were isolated by semi-preparative HPLC. For the first time, triterpenoid saponins in *G. glomerata* roots were characterized along with a variety of phenolic compounds. LC-ESI/HRMS (Orbitrap) acquisition strategy for the structure elucidation of *Gypsophila* GOTCAB saponins and C-flavonoids would be important for their identification in plant extracts.

Scientific publications and presentations:

- Gevrenova R, Bardarov K, Voynikov Y, et al. GOTCAB saponin profiles of two Bulgarian *Gypsophila* L. species (Caryophyllaceae) by LC-ESI/MS. 6th Int Congress of Aromatic and Medicinal Plants. Coimbra, Portugal. 29.05.-01.06.2016. Abstr. p. 172

- Gevrenova R, Bardarov K, Voynikov Y, et al. Preliminary study on sulfated GOTCAB saponins from two Bulgarian *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae) species. C R Acad Bulg Sci. 2017;70(11):1539-48.

Contract 44/2016 *Geigeria alata*: a source of caffeoylquinic acids with a potential antioxidant, antihypertensive and antidiabetic effects

Research team: Assoc. Prof. Rumyana Lyubomirova Simeonova, PhD

- Assoc. Prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD
- Assist. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Vessela Balabanova, PhD
- Alexandra Kassabova, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: The purpose of the present study was to isolate and identify the primary secondary dicaffeoylquinic acid metabolite (DCQA) in roots of African species of *Geigeria alata*, Asteraceae and to investigate its possible antioxidant, antihypertensive and antidiabetic activity on Streptozotocin-induced diabetes in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) - experimental model of essential hypertension. Diabetes was induced by the administration of streptozotocin (40 mg/kg, i.p.). The following biochemical parameters: reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) as well as the activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase and glutathione S-transferase (GST) were measured spectrophotometrically in the hepatic homogenate, isolated from the experimental animals. Arterial blood pressure was monitored by a non-invasive tail-cuff instrumentation method as well as the glycemic status of the animals was evaluated by an express “MULTICARE” blood-sugar test. The DCQA lowered arterial hypertension (AH) by 19% ($p < 0.05$) in control SHR, but did not change the pressure in the Diabetic SHR (SHR-D). Blood glucose levels increased by 78% ($p < 0.05$) and by 171% ($p < 0.05$) respectively in diabetes-induced NTR and SHR-D respectively. In control SHR, the basic level of MDA (a marker of lipid peroxidation) was 197% ($p < 0.05$) higher, and GSH levels were 24% ($p < 0.05$) lower than the levels in control NTR. Significant decreases in GPx, GR and GST activities were measured in the liver of all diabetic rats, NTR and SHR. The three-week oral administration of DCQA improved biochemical liver parameters in both types of diabetic animals, but the effects were less pronounced in SHR with induced diabetes. The results clearly showed that diabetes and hypertension in combination are more difficult to modulate with naturally occurring DCQA.

Scientific publications and presentations:

- Simeonova R, Kondeva-Burdina M, Zheleva-Dimitrova D, et al. Antidiabetic, antioxidant and antihypertensive effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid from *Geigeria alata* (Dc) Oliv. & Hiern. on streptozotocin-induced diabetic normotensive and hypertensive rats. 52-th EUROTOX Congres, Seville, Spain, 4-7 Sep, 2016, S293

- Vitcheva V, Simeonova R, Kondev-Burdina M, et al. “*In vitro/in vivo* evaluation of the antioxidant potential of Dicafeoylquinic acid isolated from *Geigeria alata*” Ist Int Conference on Bio-antioxidants, BAS 25-29 Jun 2017 Sofia, Bulgaria

Contract 45/2016 Phytochemical and pharmacological investigation of the flavonoid content of *Astragalus spruneri*

Research team: Prof. Iilina Nikolaeva Krasteva, PhD

- Assoc. Prof. Romyana Simeonova, PhD
- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Petranka Zdraveva, PhD
- Assist. Prof. Alexander Shkondrov, PhD

Organization unit: MU–Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav St., 1000 Sofia

RESULTS: Phytochemical investigation of the aerial parts of *Astragalus spruneri* Boiss. led to isolation of three rare flavonoids, isobioquercetin, baimaside as well as a flavonol with unusual hydroxy methyl glutaric acid as a moiety kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-galactopyranoside. Their structures were elucidated by acid hydrolysis, 1D and 2D NMR experiments and HRESIMS. In addition, four flavonoids rutin, hyperoside, quercitrin and kaempferol-7-rhamnoside were identified by HPLC analysis. *In vitro/in vivo* administered alone, the purified extract of *A. spruneri* and the flavonoids isolated proved statistically non-toxic for the liver. Using *in vitro* models with different underlying mechanisms (metabolic bioactivation and oxidative stress), the extract and the flavonoids proved statistically significant antioxidant and cytoprotective effects. The activity observed was stronger for the extract, compared to the pure compounds and comparable to those of silybin. *In vivo* investigation of the extract proved hepatoprotective and antioxidant effects, comparable to silymarin. The pathohistological study proved the effects observed. This activity will serve as a perspective for further investigations as possible hepatoprotectors and antioxidants.

Scientific publications and presentations:

- Shkondrov A. Phytochemical investigation of species of genus *Astragalus* L. PhD thesis. Sofia, 2017.
- Shkondrov A, Kondeva-Burdina M, Simeonova R, et al. Phytochemical investigation of *Astragalus* species occurring in Bulgaria. Sixth pharmaceutical congress Sandanski. 13-16.10.2016. p. 41.
- Simeonova R, Vitcheva V, Kondeva-Burdina M, et al. Evaluation of the antioxidant potential of defatted extract from *Astragalus spruneri* (Fabaceae) in spontaneously hypertensive rats. First Int Conference of Bio-Antioxidants. 25-29.06.2017

Contract 46/2016 Antioxidant and cytoprotective activity of biologically active lanthanide complexes

Research team: Prof. Irena Petkova Kostova, PhD, DSci

- Stefan Balkanski, PhD
- Assoc. Prof. Virdjinia Tzankova, PhD
- Assoc. Prof. Магдалена Кондева-Бурдина, PhD
- Alexandra Kasabova, PhD student

Organization unit: MU–Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Chemistry, 2 Dunav Str. 1000 Sofia

RESULTS: The Ga(III), In(III) and Ln(III) complexes of biologically active ligands have been synthesized. The structures of the complexes were determined by means of elemental analysis, NMR, FTIR and FTRaman spectroscopies. Significant differences in the vibrational spectra of the complexes were observed as compared to the spectra of the free ligands. The marker bands of characteristic functional groups were identified, in order to use them as data bank for further application in trace analysis of rare-earth complexes. Detailed vibrational analysis of HOA, HAOA and M(III)-OA and M(III)-AOA systems revealed that the binding mode in the complexes was bidentate through the carboxylic oxygen atoms. NMR spectra of the ligands and the complexes confirmed the complex formation. Comparative spectral analysis of the newly synthesized Ga(III), In(III) and Ln(III) complexes helped to predict the coordination behavior of the ligands and the binding modes of Ga(III), In(III) and Ln(III) complexes. On isolated rat liver microsomes, all complexes, administered alone (at concentration 100 μ M), didn't show pro-oxidant effects, but in conditions of non-enzyme lipid peroxidation they revealed good antioxidant activity, most prominent in PrAOA, HoAOA, ErAOA, InAOA and GaAOA. On isolated rat hepatocytes, PrAOA, HoAOA, ErAOA, InAOA and GaAOA showed lower cytotoxic effects and in conditions of *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress, these complexes revealed good cytoprotective and antioxidant activity, most prominent in InAOA and GaAOA. The effects were closer to those of quercetin. The complexes InAOA and GaAOA revealed good neuroprotective and antioxidant effects in model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress on isolated rat brain synaptosomes.

Scientific publications and presentations:

- Kostova I, Atanasova V, Kondeva-Burdina MS, et al. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of newly synthesized Ho(III) complex. *Biointerface Res Appl Chem*. 2016;6(5):1541-49.
- Kostova I, Valcheva-Traykova M, Balkansky S. Vibrational characterization and prooxidant activity of newly synthesized dysprosium(III) complex. *J Iran Chem Soc*. 2016;13(5):891-902.
- Kostova I, Atanasova V, Kondeva-Burdina MS, et al. Vibrational Characterization and Antioxidant Activity of Newly Synthesized Gallium(III) Complex. *Peertechz J Med Chem Res*. 2016;2(1):1-8.
- Kostova I, Atanasov P. Antioxidant Properties of Pyrimidine and Uracil Derivatives. *Curr Org Chem*. 2017;21(20):2096-108.
- Kostova I. Lanthanide(III) Complexes with Biologically Active Ligands. 16-a editie a Congresului National de Farmacie (CNFR2016), Bucuresti, Romania, Sep 28-Oct 1, 2016; p. 19.
- Kostova I. Application of Density Functional Approximation and Vibrational Spectroscopy in Coordination Chemistry of Lanthanide(III) Complexes. 6th Int Conference on Perspectives in Vibrational Spectroscopy (ICOPVS 2016), Lucknow, India, 5-8 Nov, 2016; IL35, p. 67.

Contract 47/2016 Evaluation of chemical stability and biological activity of antimicrobial peptides type alfa-defensin 2

Research team: Assoc. Prof. Ivanka Petkova Pencheva-El Tibi, PhD

- Assoc. Prof. Vania Maslarska, PhD
- Prof. Christo Naidenski, DVM, DSc – BAS
- Assist.Prof. Maya Zacharieva, PhD - BAS
- Meri Amerikova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaseutical chemistry, Dunav str. 2, Sofia 1000

RESULTS: Recently the facilities of scientists have been forced to investigation of a potential for applications of antimicrobial peptides (AMPs) type alfa-defensin 2 in the clinical practice. The efforts are in the producing of vaccines, pharmaceutical systems for delivery of peptides with safe structure and methods for identification of bacteria with AMPs. For purposes HPLC method for identification and assay of alfa-defensin 2 in media with different chemical modifiers was developed. The HPLC method was validated according to European Pharmacopoeia and ICH requirements. Chromatographic and analytical parameters specificity, reproducibility, linearity, LOD, LOQ and system suitability test were studied and optimized. The stability of peptide at pH 2, 7.4 and 9 pH units was determined depending on factor time. In parallel the antimicrobial activity of test solutions of defensins against pathogenic microorganisms by determination of MIC and respiratory activity of bacteria by using of colorimetric test was studied.

Scientific publications and presentations:

- Amerikova M. Diploma thesis „Evaluation of chemical stability and biological activity of antimicrobial peptides type alfa-defensin 2“, 2016.
- Amerikova M. Evaluation of chemical stability and biological activity of antimicrobial peptides type alfa-defensin 2, Student Scientific session, Faculty of Pharmacy, 2016, p. 47.

Contract 48/2016 Investigation of nsoids for in vitro anti-tumor / antiproliferative activity in experimental model systems

Research team: prof. Nikolai Damyanov Danchev

- Assist. Prof. Lyubomir Marinov
- Assist. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Assoc. Prof. Stoyan Shishkov, PhD
- Assist. Prof. Anton Hinkov, PhD - SU
- Assist. Prof. Kalina Shishkova, PhD - SU
- Petiya Angelova, PhD student
- Prof. Reneta Toshkova, PhD – BSA
- Assist. Prof. Ani Georgieva, PhD - BSA

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology

RESULTS: The ability of tumor cells to penetrate and destroy basal membranes and adjacent tissues plays a central role in the complex multi-stage metastasis process. The studied NSAIDs show varying degrees of anti-tumor / antiproliferative activity to the human tumour cell lines used [(cervical adenocarcinoma (HeLa), colorectal adenocarcinoma (HT-29) and breast cancer (MCF-7)]. According to the migration activity established by the Scratch Wound healing assay, human tumor cells under investigation can be ordered in descending order - with the highest migration activity - HeLa, medium - MCF - 7 and low - HT - 29. Cell migration is the result of dynamic interactions between the cell, the extracellular matrix (ECM) and the cytoskeleton. The most sensitive to NSAIDs are MCF-7 cells, followed by HeLa and HT-29. Most effective on migration of all three human tumor lines are dexketoprofen (370 µg/ml) and diclofenac (90 µg/ml). NSAIDs induced varying degrees of morphological changes and cell death in the three used HeLa, HT-29 and MCF-7 tumor cells. Severe morphological signs of early or late apoptosis are seen in a high percentage of NSAIDs treated preparations. It is noteworthy the presence of entosis after treatment of MCF-7 tumor cells with meloxicam. The most pronounced signs of apoptosis - fused chromatin, nuclear fragmentation, and apoptotic body formation is observed in diclofenac, meloxicam and metamizole treated cells. Subsequent detailed studies are required in order to more accurately identify potential anti-tumor effects of different representatives of conventional NSAIDs.

Contract 49/2016 Synthesis and characterization of new methoxy derivatives of salicylaldehyde benzoylhydrazone and their Ga (III) metal complexes with potential biological activity

Research team: Prof. Georgi Tsvetanov Momekov, PhD

- Prof. Alexander Zlatkov, PhD
- Prof. Darvin Ivanov, PhD
- Assist. Prof. Boryana Nikolova-Mladenova, PhD
- Assoc. Prof. Maya Georgieva, PhD
- Assoc. Prof. Lili Peikova, PhD
- Gabriela Mitev, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: 8 new compounds were synthesized - 5 new 5-methoxyderivative salicylaldehyde-benzoylhydrazones and 3 new Ga(III) complexes. The 5-methoxyhydrazones were prepared by condensation in ethanol of 5-methoxysalicylaldehyde with hydrazides - benzhydrazide, 4-hydroxy-benzhydrazide, 4-pyridinecarbohydrazide, 4-methylbenzhydrazide and 4-chlorobenzhydrazide. The complexes were synthesized by reaction of $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ with the ligands in a molar ratio of 1: 2. The compounds were characterized by elemental, thermogravimetric and mass spectral analysis, IR and NMR-spectroscopy. The structures of the complexes were determined by comparison of their spectra with the spectra of the ligands. The following general formula $\text{Ga}(\text{L-H})_2\text{NO}_3$ was proposed. The 5-methoxyhydrazones were expressed as tridentate ligands in coordination with Ga(III) ions. The complexes are mononuclear, with Ga(III) ions linked to two ligands by the oxygen atom of the deprotonated aldehydehydroxyl group, the nitrogen atom of the azomethine group and the oxygen atom of the

amide group. Geometric optimization of some of the 5-methoxyhydrazones and Ga(III) complexes through B3LYP / 6-31 + G (d, p) method was performed. The calculated lengths of the hydrazone bonds are close to those experimentally determined for salicylaldehyde benzoylhydrazone. The values of the calculated double-walled angles indicate that the aldehyde and hydrazide aromatic nuclei do not lie in one plane, and the hydrazone molecule is not planar in general. 5-methoxyderivativehydrazones were tested by the "Lipinski Rule" to assess their pharmacokinetic behavior and drug likeness. All hydrazones have a suitable lipophilicity and potentially good permeability across the cell membranes. 5-methoxyhydrazones were studied for cytotoxic activity on a spectrum of 5 human tumor and 1 non-tumor cell lines using an MTT-assay. The compounds show concentration-dependent cytotoxic activity in all cell lines examined. The IC₅₀ values are lower than those of the reference cytostatics cisplatin and melphalan. Cytotoxic activity of Ga(III) complexes on some of the cell lines is more pronounced than that of the starting hydrazones.

Scientific publications and presentations:

- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D, et al. Design and drug-like properties of new 5-methoxysalicylaldehyde based hydrazones with anti-breast cancer activity. *J Appl Biomed*, 2017;15(3):233-40
- Nikolova-Mladenova B, Angelova S, Ivanov D, et al. Synthesis and Structural Study of Ga(III) complexes with 3-, 4- and 5-methoxy Substituted Salicylaldehyde Benzoylhydrazones. *Zbornik referatov Slovenski kemijski dnevi 2016*
- Nikolova-Mladenova BI, Peikova LP, Georgieva MB, et al. Application of a RP-HPLC method for determination of chemical and physiological stability of two newly synthesized methoxy-benzoylhydrazone derivatives. *Bulg Chem Commun*, 2017;49(spec. issue D):153-8.
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D. Design and drug-like properties of new 5-methoxysalicylaldehyde based hydrazones with anti-breast cancer activity, 8th Central Eur Conference "Chemistry Towards Biology", Brno, Czech Republic, 28 Aug-1 Sep 2016, p. 133
- Nikolova-Mladenova B, Angelova S, Ivanov D, et al. Synthesis and Structural Study of Ga(III) Complexes with 3-, 4- and 5-methoxy Substituted Salicylaldehyde Benzoylhydrazones. *Slovenski kemijski dnevi 2016*, Portorož, Slovenia, 28–30 Sep 2016, 167
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Ivanov D. Gallium(III) Complexes with Bioactive Ligands 5-methoxysalicylaldehyde benzoylhydrazone and 5-methoxysalicylaldehyde isonicotinoylhydrazone. 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016, p 160
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G, Mitev G, et al. Synthesis, Spectral Characterization and Cytotoxic Activity of New 5-Methoxy-Derivatives of Salicylaldehyde Benzoylhydrazone. 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016
- Peikova L, Nikolova-Mladenova B, Georgieva M. Modification and validation of RP-HPLC method for stability determination of new benzoylhydrazone at close to physiological conditions. 6th Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016, p 136

- Mitev G, Nikolova-Mladenova B. Synthesis and Characterization of 5-methoxysalicylaldehyde isonicotinoylhydrazone. Student scientific session, Faculty of pharmacy, Sofia, Bulgaria, 3 Dec 2016, p 50

Contract 50/2016 Study on possibilities for preparation of modified-release drug forms with theophylline via single- and multi-stage extrusion

Research team: Prof. Milen Ventsislavov Dimitrov, MPharm, MPH-HMP, PhD

- Teodora Popova, MPharm

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, 2 Dunav Str.1000 Sofia

RESULTS: The literature data on the preparation and characterization of modified-release theophylline drug delivery systems with potential relevance to bronchial asthma and COPD therapy has been collected and analyzed. Theophylline formulations prepared after single and multi-stage extrusion, both by direct tableting and by the press-coating method, have been developed and technologically and biopharmaceutically characterized. The method of preparing the systems has a significant influence on the rate and degree of release of theophylline. In systems prepared by extrusion, there is a significant decrease in the rate and degree of release of theophylline, compared to the systems prepared by press-coating. In all systems tested, the release of theophylline from HPMC-treated systems occurred significantly slower than those prepared with CMC-sodium, and in the systems prepared with HPMC with different molecular masses, with an increase in the molecular weight of HPMC, the release of the active substance is delayed. The extrusion process also has a significant effect on the rate and degree of release of theophylline; there is a delay in release in direction from one to multistage extrusion. The most advantageous from the chronopharmaceutical point of view are tablets obtained after single and multi-stage extrusion. Taken in the evening, these tablets will release a minimum amount of theophylline in the first few hours with a release peak after the 5th hour, which is consistent with the asthma chronopharmaceutical requirements.

Scientific publications and presentations:

- Popova T, Petkova V, Dimitrov M. Comparison of single- and multi-stage extrusion versus press-coating technique in formulation of modified-release tablets with theophylline. WJPPS. 2017; 6(6): 01-18
- T. Popova, M. Dimitrov, N. Lambov. Ethanol as potential tool for extending the release rate of theophylline from ethylcellulose containing-pellets, prepared by extrusion/spheronization, 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, UK, 4-7 Apr 2016

Contract 51/2016 Platinum complexes with mixed ammine/amine ligands. Design, synthesis, spectral characterization, theoretical prediction and pharmacological study

Research team: Assoc. Prof. Adriana Georgieva Bakalova, PhD

- Prof. Spiro Konstantinov, MD, PhD
- Assist. Prof. Emiliya Cherneva, PhD

- Yanitsa Rusenova, student
- Petar Arnaudov, student
- Ivelina Zhelezova, PhD student
- Teodora Atanasova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Chemistry, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: Based on literature data, two organic compounds were selected to synthesize and examine new Pt(II) and Pt(IV) complexes. Using the Lipinski rule of five, the drug similarity of several organic compounds (including those subject to the present study) and their pharmacokinetic properties in the human body has been evaluated. A 3-amino-5-methyl-5-phenylhydantoin and 3'-amino-4-thio-1H-tetrahydropyransyoro-5'-hydantoin are used as carrier ligands for the synthesis of four new Pt(II) and Pt(IV) complexes. The Pt(II) complexes have the general formula *cis*-[Pt(NH₃)LCl₂] and those of Pt(IV) - *cis,cis,trans*-[Pt(NH₃)LCl₂(OH)₂], where L is the corresponding aminohydantoin or an aminospirohydantoin derivative. The newly synthesized compounds were studied by modern physico-chemical methods of analysis - elemental analysis, IR and NMR spectral analyses. For a theoretical prediction of their structures, a DFT method is used at high base levels. Certain lengths of connections, energies, and angles are defined. The most likely chemical formulas of the compounds are proposed. All newly synthesized complexes were tested for cytotoxic activity *in vitro* on panel of human tumor cell lines. The results show that the complexes have better cytotoxicity than the organic compounds used as ligands. As the *cis,cis,trans*-[Pt(NH₃)LCl₂(OH)₂] complex where L is 3-amino-5-methyl-5-phenylhydantoin exhibits a better cytotoxic effect than the cisplatin reference. In conclusion, Pt(IV) complexes are more active than Pt(II) complexes.

Scientific publications and presentations:

- Bakalova A, Cherneva E, Zhelezova I. Design, Drug-likeness and Antiproliferative Activity of Some 3-substituted S-containing Spiro-5'-hydantoins, Zbornik referatov Slovenski kemijski dnevi. Portorož, Slovenia. 28–30 Sept 2016.
- Cherneva E, Bakalova A, Michailova R, et al. Preparation, Characterization, Theoretical Investigation and Cytotoxic Activity of New Mixed Ammine/amine Platinum Complexes with 3-Amino-5-methyl-5-phenylhydantoin, Bulg Chem Commun. 2017;49: 89–95 Special Edition B.
- Nikolova-Mladenova BI, Bakalova AG, *In silico* Drug Likeness and *in vitro* Cytotoxic Activity of Some 3,5-Disubstituted Hydantoins and Spirohydantoins, Bulg Chem Commun 2017;49(spec issue D):159-63.
- Bakalova A, Cherneva E, Konstantinov S. Cytotoxic activity and theoretical investigation of new mixed ammine/amine platinum complexes with 3'-Amino-5-methyl-5-phenylhydantoin, 8th Central Eur Conference Chemistry towards Biology. Brno, Czech Republic, 28 Aug-1 Sep 2016.
- Bakalova A, Cherneva E, Zhelezova I. Design, Drug-likeness and antiproliferative activity of some 3-substituted s-containing spiro-5'-hydantoins, Slovenian Chemical Days 2016, 28–30 Sept, Portorož, Slovenia.
- Bakalova A, Cherneva E, Mihaylova R, et al. New Mixed ammine/amine platinum complexes with 3'-amino-4-thio-1h-tetrahydropyranspiro-5'-hydantoin. Preparation, Spectral Analysis, Theoretical Calculations and Biological Properties, VIth Congress of Pharmacy. Sandanski, Bulgaria. 13-16 Oct 2016.

Contract 52/2016 Physiological characterisation of newly synthesized derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid

Research team: prof. Alexander Borisov Zlatkov, PhD

- Assoc.prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assoc.prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assoc.prof. Maya Georgieva, PhD
- Assist.prof. Boris Kadinov, PhD – BAS.
- Assist.prof Javor Mitkov, PhD
- Kristina Belcheva, student
- Rumiana Grigorova, student
- Viktor Kostov, student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of pharmacy, Dept. of Pharmaceutical chemistry, 2 Dunav str., 1000 Sofia

RESULTS: The tested derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid in concentration 100 μ M, show statistically significant neurotoxic effect, when applied alone on isolated rat synaptosomes, against the control (non-treated synaptosomes). Compounds JTA-1 and JTA-2 are determined to have lowest toxicity, followed by JTA-3, JTA-4 and JTA-5. JTA-2Ox and substances from JTA-6 to JTA-13 are with most prominent neurotoxic effects. On isolated rat synaptosomes, under a model of 6-hydroxydopamine induced oxidative stress (*in vitro* model, resembling some of the symptoms of Parkinson's disease), JTA-1 and JTA-2 express statistically significant neuroprotective and antioxidant effects, comparable to the ones for pure caffeine and caffeine-8-thioglycolic acid. The evaluated derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid (KTG) realize their effects through interaction with adenosine receptors at both vascular smooth muscle and endothelial and autonomic nervous system levels.

Scientific publications and presentations:

- Kadinov B, Mitkov Y, Kostov V, et al. A study of newly synthesized derivatives of caffeine-thioglycolic acid. „Boldness and youth in pharmacology“, Tsigov chark, Oct 7-9, 2016.
- Kadinov B, Kostov V, Grigorova R, et al. Newly synthesized derivatives of Caffeine-thioglycolic acid – *in vitro* study. XIV Int Medical Scientific conference, Pleven, 10-15 Oct 2016, p.188.
- Vasilev M. *In vitro* evaluation of the contractile activity of JTA-3, derivative of caffeine-8-thioglycolic acid on small brain vessels. Spring student's scientific session. Faculty of Pharmacy, Sofia, 22.04.2017, p. 6.
- Vasilev M, Kadinov B. *In vitro* study of newly synthesized derivatives of caffeine-thioglycolic acid – effects on contractile activity of small brain vessels., 16th Int Congress of Medical Sciences for Students and Young Doctors; 11-14 May 2017 MU-Sofia, p. 204.
- Kasabova-Angelova A, Kondeva-Burdina M, Mitkov J et al. Effects of newly synthesized derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid on isolated rat synaptosomes and human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Scientific session „Biomedicine and quality of life – young people in science“, June 26 2017.

- Vasilev M, Kadinov B, Kondeva-Burdina M, et al. *In vitro* study of newly synthesized derivatives of caffeine-thioglycolic acid – effects on contractile activity of small brain vessels. 7th Global Experts Meeting on Neuropharmacology: Major Challenges and Breakthroughs, Milan, Italy, Jul 31-Aug 02, 2017

Contract 53/2016 Flavonoids from the aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* L. – isolation, identification and pharmacological investigation for presence of radical-scavenging/antioxidant activity and neuroprotective effect in models of neurotoxicity *in vitro*

Research team: Assoc. Prof. Paraskev Todorov Nedialkov, PhD

- Assist. Prof. Zlatina Kokanova-Nedialkova, PhD
- Assist. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assist. Denitsa Aluani
- Alexandra Kasabova, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

RESULTS: Nine flavonoids, glycosides of patuletin, spinacetin and 6-methoxykaempferol were isolated and identified from the aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* L. Patuletin glycosides, compounds Chbhnf-1, Chbhnf-2 and Chbhnf-7 showed the highest DPPH activity (85.78 %, 85.59 %, 86.07 %) compared to the classical antioxidant ascorbic acid (86.46 %). All flavonoids possess a high ABTS radical-scavenging activity and administered alone, at concentration 100 µM, they did not revealed toxic effects on isolated rat brain synaptosomes. At 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress, all flavonoids revealed good neuroprotective and antioxidant activity, similar to those of silybin. The effects were most prominent for compound Chbhnf-9, which might be due to the presence of ferulic acid in the sugar part of its structure. Flavonoids Chbhnf-02, Chbhnf-04, Chbhnf-06 and silybin in a concentration range 50÷800 µM, did not reduce the viability of SH-SY5Y cells. No cytotoxic effect was observed in a broad concentration range used in the study, thus demonstrating low toxicity and a good safety profile in neuroblastoma cells. The investigated flavonoids have shown good protective effects in a model of H₂O₂-induced oxidative stress and decreased cell viability, that were compatible with these of silybin.

Scientific publications and presentations:

- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov P. Radical-scavenging activities of nine flavonoids isolated from the aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* L. VIth Congress of Pharmacy. Sandanski, Bulgaria. Oct 13-16, 2016. 75 p.
- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov P. Antioxidant properties of 6-methoxyflavonol glycosides from the aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* L. Bulg Chem Communic. 2017;49(spec. issue D):253-8

Contract 54/2016 Design and characterisation of thermally responsive nanosized drug delivery systems based on poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene oxide) copolymers

Research team: Assist. Prof. Victoria Iskrova Michailova, PhD

- Prof. Denitza Momekova, PhD
- Prof. Stanislav Rangelov, PhD, DSci - BAS
- Assoc. Prof. Ivailo Dimitrov, PhD - BAS
- Assoc. Prof. Evgeni Ivanov, PhD - BAS
- As. Ivanka Petrova-Doicheva - BAS
- Christina Agelova Velichkova, PhD student
- Assoc. Prof. Rumiana Blagoeva, PhD - BAS
- Assoc. Prof. Assen Nedev, PhD - BAS

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: The aim of this project is to design and develop thermo-responsive nanosized drug delivery systems based on PNIPAM-g-PEO double hydrophilic graft copolymers. It was found that these systems showed different mechanism of micellization and drug loading owing to both their specific phase transition in ethanol-water mixed solvents and the presence of Indomethacin, a hydrophobic drug that strongly associates with PNIPAM chains. Thermo-rheological, DLS and TEM analyses were applied to investigate the degree of solvation PNIPAM and its relationship with the structure of the resulting PNIPAM-g-PEO nanoparticles below and above the temperature of phase transition. At $T < LCST$, the process of micellization was mainly controlled by the amount of ethanol in the system. With the increase of ethanol from $\varphi = 5-25\%$ to $\varphi = 30-40\%$, the micellar aggregates transformed from complex hierarchical structures into polymersomes. The incorporation of Indomethacin in the nanoparticles significantly influenced their physicochemical and morphological properties. The effectiveness and drug loading content were highest for systems prepared with 5-10% ethanol and IMC-to-PNIPAM-g-PEO feed weight ratio of 1.5:1.0, which led to morphological transition from globules to polymersomes. The rate of addition of ethanol was found to be the main factor controlling the size and dispersity of the nanoparticles. The *in vitro* process of Indomethacin release was responsive to temperature changes, being fastest at 42°C. The changes in the micellar structure were reversible and able to modulate the kinetics of drug release. Using different model-dependent methods of numerical modelling, it was found that the degree and the rate of Indomethacin release could be closely related to the established dependence among the chain conformation, temperature and ethanol content. Relaxation-erosional and diffusion properties of these systems exerted a less strong effect on the release process. The results obtained define the PNIPAM-g-PEO nanoparticles as a promising carrier for delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Scientific publications and presentations:

- Blagoeva R, A Nedev, V Michailova. An approach to modeling drug release from polymersome nanoparticles based on PNIPAM-g-PEO copolymer. *Int J Bioautomation* 2017;21(2):179-88.

Contract 55/2016 Effect of Vascular endothelial growth factor (VEGF) on collagen production and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells *in vitro*

Research team: Assoc. Prof Pavel Kirilov Stanimirov, DDS, PhD

- Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Zornitsa Mihaylova, DDS
- Rozaliya Tsikandelova
- Assoc. Prof. Natalia Grancharova
- Assist. Prof. Nikolay Ishkitiev, DDS, PhD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental medicine, Dept. of Oral and maxillofacial surgery, G. Sofiyski Str. 1, Sofia1431

RESULTS: The aim of this study is to reveal the effect of VEGF on human PDL stem cells *in vitro*-the significance of the growth factor for stem cell differentiation and markers expression in particular. Cells were cultivated and multiplied in autocrine media. Within the following 2 to 4 weeks a sufficient number of cells were obtained for the purposes of the current study. Routinely, right before each experiment, cells were characterized via stem cell markers expression in order to prove the cell “stemness”. PDL stem cells were cultivated in cell culture media supplemented with VEGF for a period of 48h to 3 weeks, depending on the experimental design. The optimal concentration selected for the present study was 50 ng/ml. Via qualitative (immunofluorescence) and quantitative (flow cytometry) methods the selective ability of VEGF to inhibit stem cell markers expression was revealed. CD71 expression was significantly suppressed, while the additional two markers expression (CD90 and CD271) remain unchanged. RT-PCR and Total Collagen Synthesis functional test reveal that VEGF does not affect the cells synthetic ability. However, the growth factor seems to initiate stem cells osteogenic differentiation, as it was revealed after 3 weeks incubation period followed by alizarin red staining. Results of RNA analysis and real time RT-PCR prove that VEGF is a growth factor capable of neoplastic and inflammatory process suppression. VEGF accelerates angiogenesis, nerve fibers development, supports cell and extracellular matrix integrity in human PDL stem cell culture.

Scientific publications and presentations:

- Mitev V, Mihaylova Z, Stanimirov P, et al. Effects of VEGF on periodontal ligament mesenchymal stem cells. ISSCR annual meeting, Boston MA, USA 14-17 Jun, 2017

Contract 56/2016 Nanocoatings with application in dental medicine

Research team: Assoc.Prof. Elka Nikolaeva Radeva, MD, PhD

- Prof. Peter Petrov, PhD, DSc - BAS
- Desislava Tsanova-Tosheva, PhD student
- Dimitar Dechev - BAS

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Conservative Dentistry, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The experiments dedicated to testing the deposition conditions for multilayer coating show that the technological parameters were optimized successfully. As a result we have upgraded parameters that lead to deposition of high quality gradient TiN/TiO₂ coating. The results of the electrochemical corrosion suggest that the deposited coating contributes to a substantial reduction in the current corrosion potential of the system from $1 \cdot 10^{-7}$ A/cm² to $6 \cdot 10^{-8}$ A/cm² in stationary conditions. The juxtaposition of the anode curves that characterizes the oxidation processes of the alloy indicates that the deposited coating inhibits the anode solution of the substrate components and makes the system more resistant to corrosion. The results of the

study on the hardness and modulus of elasticity of samples of cobalt-chromium alloy with coatings of Titanium Nitride/titanium dioxide indicate that the average hardness is 16,285GPa, and the module of Jung's 230.151 GPa. Availability of the standard deviation indicates the sensitivity of the nanoindenter to the roughness of the test surface. The good results of this study demonstrate the high qualities of the coatings and confirmed the importance of the parameters of the deposition. Scanning electron microscopy of the K-files without coating has been done. After the fifth sterilization no specific changes to the file have been found. There is a small concave defect on the file surface. No changes on the surface structure have been observed. Artefacts can be noticed. After the fifth sterilization, a scanning electron microscopy of the K-files with deposited coating from TiN/TiO₂ has been done. There were observed no defects on the surface of the file. There are some artefacts that can be observed. Scanning electron microscopy of the K-files without coating after the 10th sterilization demonstrates the presence of artefacts and formation of a larger surface defect in comparison with the surface of the K-file without coating after the fifth sterilization. Observed is the surface of an endodontic instrument with deposited TiN/TiO₂ coating after 10th sterilization. Artefacts can be noticed. Coating surface of the coating looks changed- with “grain” pronounced structure. The absence of cracks and defects on the surface of the instrument demonstrates the ability of the coating to protect the substrate from cracking and fracturing. Probably that confirms the facts in the literature, that the multilayer coating protects the alloy from the cracks and fractures.

Scientific publications and presentations:

- Tsanova-Tosheva D, Radeva E, Dechev D, et al. Biocompatible Materials in Dental Medicine, Mechanical Engineering and Science, 2017;27(1):12-17
- Tsanova-Tosheva D, Radeva E, et al. Crystallographic Structure of Biocompatible Nanocoatings Deposited on Co-Cr Substrate, 6th National Crystallographic Symposium - NCS 2016, Bulgarian Academy of Sciences, 5-7 Oct 2016, p.83
- Tsanova-Tosheva D, Radeva E, et al. „Formation and structure of TiN/TiO₂ multilayer coatings deposited on Co-Cr substrate, 18th Int workshop on Nanoscience and Nanotechnology 2016, 18-19 Nov, 2016, p.26

Contract 58/2016 Determination of concentrations of certain markers of inflammation and destruction in saliva and gingival exudate for the diagnosis of periodontal diseases

Research team: Assoc. Prof. Theodora Nikolaeva Bolyarova-Konova, DDM, PhD

- Prof. Hristina Mihailova, DDM, MD, PhD
- Assist. Prof. Tsvetelina Velikova, MD, PhD
- Assist. Prof. Ekaterina Ivanova-Todorova, MD, PhD
- Kalina Tumangelova-Yuzeir, PhD
- Silviya Petkova, DDM
- Dolores Todorova

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of dental medicine, Dept. of Periodontology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: Aim of the study was to seek the significance of IL-1 β and MMP-8 indicators from human saliva and gingival crevicular fluid (GCF) as biomarkers for periodontal diseases. 62 individuals of average age 35-55 (SD \pm 13,782) have been involved in the study, divided into

three groups based on clinical and radiographic criteria – 19 healthy subjects (H), 19 patients with plaque-induced gingivitis (G) and 24 – with chronic periodontitis (CP). GCF from 6 sites and saliva were collected respectively in micropipettes and sterile tubes. The volume was determined. Interleukin-1 β and MMP-8 concentrations was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We found significantly higher concentrations of IL-1 β in GCF and saliva both in patients with severe periodontitis and in patients with plaque-induced gingivitis compared to their concentrations in healthy individuals. We detected a significant difference in mean values of MMP-8 concentrations in saliva in healthy individuals and patients with gingivitis. This gives us a reason to confirm the standpoint that IL-1 β in GCF and saliva and MMP-8 in saliva are sensitized markers for the differentiation of periodontal health status from periodontal disease. A significant difference was determined between IL-1 β concentrations in GCF among patients with mean bone loss <2 mm and patients with bone loss \geq 2 mm. This justifies the correlation of IL-1b levels in GCF with mean bone loss, i.e. with the severity of chronic periodontitis. The results show a significant linear correlation of BOP (bleeding on probing) in patients having periodontitis with MMP-8 levels in saliva, which suggests that MMP-8 is a biomarker that could be associated with the disease activity. The obtained data determines IL-1 β and MMP-8 from saliva and GCF as significant markers for the diagnosis of periodontal diseases and provides a basis for developing and conducting tests for rapid and more accurate chairside diagnosis.

Scientific publications and presentations:

- Bolyarova, T, S Petkova. Determination of concentration levels of some markers of inflammation and destruction in saliva and gingival exudate for diagnosing periodontal diseases. Review. Obshta Med. 2016; XVIII(4): 56-65.
- Petkova S, T Bolyarova, T Velikova, et al. Interleukin-1 β as a biomarker for periodontal diseases. Int Dent J 2017; 67 (Suppl. 1):112.
- Bolyarova T, Petkova S. Interleukin-1 β in relation with bone loss in chronic periodontitis. British Society of Periodontology Conference, London, UK 22-23 June 2017.
- Petkova S, T Bolyarova, T Velikova, et al. Interleukin-1 β as a biomarker for periodontal diseases. FDI World Dental Congress, Madrid, Spain, 29 Aug–1 Sep 2017, p. 201

Contract 63/2016 The role of pharmacogenetics factors in optimization of tacrolimus drug therapy in Bulgarian kidney transplant recipients

Research team: Prof. Emil Dimitrov Paskalev, MD

- Prof. Dobrin Svinarov, MD
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Radoslava Saraeva, PhD
- Reni Tzveova PhD
- Kalina Mihova
- Prof. Vanio Mitev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept of Clinical Center of Nephrology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The present project aimed to study the impact of polymorphic variants in the CYP3A4/5, POR, PPARA, ABCB1 and ABCC2 genes in dosing drug therapy with tacrolimus in

Bulgarian kidney transplant recipients. Thirty fourth patients with kidney transplantation treated with tacrolimus and taking stable doses for several weeks or months were included. Pharmacokinetic parameter C₀ (blood drug concentration immediately before next administration of Tac) was performed by LC-MS/MS method. The polymorphisms in CYP3A4, CYP3A5, POR, PRARA, ABCB1 and ABCC2 genes were analyzed using High Resolution Melting Analysis. The results were analyzed with SPSS program (v 24.0). Statistically significant results were found in the genotypes distribution of CYP3A5*3 (6986A>G) rs776746 (p = 0.007), ABCB1 (2677G>T/A) rs2032582 (p = 0.044) and ABCB1 (3435C> T) rs1045642 (p=0.016). In the other polymorphic variants statistically significant differences between the carrier of a given genotype and the dose-normalized tacrolimus concentrations (C₀/dose) were not established. For the carriers of one active allele CYP3A5 - AG genotype, the C₀/dose values are lower than the homozygous carriers of the polymorphic allele - GG, which means they eliminate tacrolimus faster. Inversely, the homozygous carriers of ABCB1 (2677G>T/A) and/or ABCB1 (3435C>T) variants, have higher C₀/dose values compared to carriers of one or two wild alleles. They eliminate slowly tacrolimus and should use lower doses to achieve a therapeutic effect. In Bulgarian kidney transplant recipients, the presence of one active CYP3A5 allele associate with the requirement of higher doses of tacrolimus and the homozygous carriers of ABCB1 2677G>T/A and/or ABCB1 3435C>T variant - with lower doses. The small number of patients does not allow for the complete exclusion of other polymorphic variants in response to tacrolimus therapy.

Contract 67/2016 Assessment of the correlation of *IL-17* rs2275913 polymorphism and serum *IL-17* levels – factors for development of dermatomyositis in adult population

Research team: Assoc. Prof. Lubomir Asenov Dourmishev, MD, PhD

- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Maria Hristova, MD, PhD
- Radoslava Saraeva, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Dermatology and Venereology, G Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: Altogether 30 patients with DM as well as 30 healthy controls were included in the present study. The mean *IL-17* serum concentration measured by ELISA among the patients with DM was 3.1 pg/ml and 5.2 pg/ml among the healthy controls. The non-parametric Kruskal-Wallis test did not reveal significantly significant associations between the two groups. Despite the increased *IL-17* serum levels among some of the patients, no association was found with the disease features such as photosensitivity (p=0.3), elevated muscle enzymes (p=0.2), skin disease (p=0.9), muscle weakness (p=0.7) and the presence of antibodies (p=0.8). No association was observed between the analyzed polymorphism and the etiology or the development of the disease. No association was found between the polymorphism rs2275913 and the *IL-17* levels.

Contract 68/2016 Molecular-genetic diagnostics in Amyotrophic lateral sclerosis patients

Research team: Prof. Ivaylo Lyudmilov Tournev, MD, DSc

- Andrey Kirov, PhD
- Assoc. Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc
- Assist. Prof. Stayko Sarafov, MD

Organization unit: MU - Sofia, Clinic of Neurology, University Hospital "Alexandrovska"

RESULTS: The scientific project aims to study the molecular characteristics of the disease in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients through molecular-genetic analysis of the *SOD1* gene. Based on the clinical data we selected a group of 10 ALS patients. Nine out of ten (90%) were sporadic and one is with positive family history of ALS. DNA was extracted from all patients and all exons and exon-intron boundaries of the *SOD1* gene were subjected to sequencing. In the patient with positive family history we detected pathogenic variant in exon 4 of the gene: NM_000454.4(SOD1):c.319C>G (p.Leu107Val). The variant is well-known with clearly pathogenic effect that explains the patient's phenotype. The family history of the patient covers at least 4 generations. It is interesting that the survival is lower (4,5 years between the second and fourth generation) and the disease onset (14 years) is earlier in every subsequent generation. This anticipation is usually typical for disorders with nucleotide repeat expansion, but it is not typical for missense mutations, so maybe additional genetic and epigenetic factors influence the disease onset and survival. To clarify this we need larger groups of familial ALS patients, more data for teratogenic factors, nutrition administration, physical activity, etc. Additional genetic tests are required to search for modifier genes, enhancers, genetic polymorphic variants which may influence the disease onset and survival. Large genomic studies and NGS techniques for whole exome and genome sequencing are necessary.

Contract 81/2016 Epigenetic biomarkers in patients with esophageal tumors

Research team: Assoc. Prof. Oleg Georgiev Cholakov

- Prof. Alexander Chervebiakov, MD, PhD - UMHATEM "N. I. Pirogov"
- Martin Mladenov, MD - UMHATEM "N. I. Pirogov"
- Assist. Prof. Nia Sabrianova, MD, PhD - UMHATEM "N. I. Pirogov"
- Gergana Stancheva, PhD
- Daniela Pencheva, PhD
- Kalina Mihova
- Silva Giragosian, PhD student
- Assist. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSi

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Urgent Medicine, UMHATEM "N. I. Pirogov", First Surgical Clinic

RESULTS: In the current study 22 tumor samples from patients with Ca oesophagi and Ca cardiae were analyzed for promoter hypermethylation in *REPRIMO*, CpG region 1 of *APC* by MS-PCR and CpG region 2 of *APC* gene and *CDKN2A* gene by MS-HRM analysis. All of the studied tumor samples showed *REPRIMO* promoter hemimethylation. Thus this biomarker could not be used for discrimination of the two tumor subtypes and probably it not correlate with clinicopathological characteristics. In all without one of the patients with Ca oesophagi and in 5

patients with Ca cardiae we established hemimethylation of region 1 of *APC* gene. Unlike region 1, region 2 of *APC* showed unmethylation in 11 of the patients with Ca oesophagi and in 2 of the patients with Ca cardiae. Most of the patients demonstrated *CDKN2A* promoter unmethylation. For evaluating if analyzed promoter hypermethylation markers could differentiate the two groups of patients, ROC curve analysis was performed. The executed analysis displayed that promoter hypermethylation CpG region 2 of *APC* gene is able to distinguish the two tumor subtypes with high sensitivity and specificity (AUC=0.839, p=0.012). *CDKN2A* and CpG region 1 of *APC* promoter hypermethylation could not reliably discriminate the two tumor subtypes but Spearman correlation analysis showed that statistically significant correlate with clinicopathological characteristics representing tumor aggressiveness like tumor stage, the presence nodal and distance metastasis.

Contract 90/2016 Expression analysis of miRNAs in Bulgarian in plasma of patients with non-small cell lung cancer and other obstructive lung disease

Research team: Prof. Yanina Georgieva Slavova – Marinova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Dimitar Kostadinov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Vanya Yrukova MD, PhD
- Assoc. Prof. Rosen Petkov MD, PhD
- assist. Dora Marinova, MD, PhD
- Evgeni Mekov, MD, PhD
- Aleksandar Lilov, MD
- Denitsa Dimitrova MD
- Miroslav Mihailov MD
- Darina Kachakova, PhD
- Acad. prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- assist. Atanaska Mitkova, PhD,
- Silva Giragosyan

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Center of Pulmonary Diseases, Specialized Hospital for Active Treatment of Pulmonary Diseases Saint Sofia, Dept. of Pathomorphology, 19 Bul. Acad. Ivan Geshov, 1431 Sofia

RESULTS: MicroRNAs are an important regulators of gene expression. They take part in various physiological and cellular processes. Different studies associated distinct expression pattern of miRNAs in lung cancer (LC), COPD and asthma. To date, there is insufficient research on the expression levels of miRNAs in LC, COPD and asthma. In the current study RNA isolated from plasma of 20 NSCLC, 15 COPD and 15 asthma patients were included. Reverse transcription for synthesis of cDNA, RT-qPCR and statistical analysis were performed. The results of current study indicate that there is not any statistically significant differences between the expression of mir-223 in plasma samples of LC, asthma and COPD, between them and compared to plasma of healthy controls. In order to ascertain the role of the studied miRNA as biomarker for discrimination of patients with LC, asthma and COPD, analysis of enlarged sampling is necessary.

Contract 96/2016 Storing tissues for expanding of tissue, plasma and DNA bank of patients with breast cancer

Research team: Assoc. Prof. Teophil Angelov Sedloev, MD, PhD

- Mariela Velichkova, MD, PhD
- Daniela Pencheva
- Assoc Prof. Radka Kaneva, PhD
- Asist. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Darina Kachakova, PhD
- Kalina Mihova
- Romyana Dodova, PhD
- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD
- Tsvetelina Spiridonova, MD
- Yavor Nikolov, MD
- Slavyana Usheva, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of surgery, Clinic of Surgery, Ward of One-day surgery, 8 Byalo more Str. 1527, Sofia

RESULTS: The contemporary molecular genetic studies confirm the large heterogeneity of the breast tumors in which genetic variations could be found in many tumour associated genes such as *PIK3CA*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *CDH1*, *KDM6A*, *GATA3*, *TP53* etc. The Next Generation Sequencing (NGS) technologies allow massive parallel sequencing of gene panels and identification of the somatic mutation spectra associated with different tumour subtypes. The aim of the current project was to expand the existing biobank consisting of tumour and normal breast tissues, plasma and DNA samples of patients with breast cancer in the Molecular Medicine Center (MMC) for the purposes of future molecular genetic studies with NGS. Collection of tumor and normal breast tissue samples from 32 patients by thin needle biopsy, isolation of genomic DNA from the collected tissues, qualitative and quantitative evaluation of isolated genomic DNA, establishment of a clinical database for breast cancer patients in the MMC. A breast cancer biobank consisting of 201 tumour and 197 normal breast tissue samples, plasma and blood/tissue DNA, was collected in MMC for the period 2013–2017. All tissues were preserved in RNAlater (RNA Stabilization Solution for Tissue) and together with the isolated DNA samples were stored at -80° C for future studies. The obtained clinical data were systematised according to patients' age, histological type, differentiation, and receptor status. The collected biobank will be used in future NGS studies on elucidation of the molecular genetic mechanisms of breast carcinomas. This will allow molecular profiling of the different breast tumor subtypes in Bulgarian patients, the determination of their characteristic spectra of driver mutations, the affected signal-transduction pathways and possible therapeutic targets.

Scientific publications and presentations:

- Dodova R. Research on Genes Associated with Predisposition for the Development of Breast and Ovarian Cancer with Next Generation Sequencing, Symposium Chudomir Nachev, "Application of New Technologies in Genetic and Genomic Diagnostics". Bulgarian Academy of Sciences. 29.10.2016.
- Sedloev T, M Koleva, T Pirdopska, et al. Staging distribution and choice of therapeutic management in patients with breast cancer in 2016 at the Breast Unit, University Hospital "Tzaritza Joanna – ISUL", MU-Sofia, Bulgaria. 4th World Congress on Breast Cancer and Women's Health, 8 -10 May, 2017, Singapore

Contract 97/2016 Enlargement the biobank of patients with ovarian cancer and optimizing the terms for storage of biological material

Research team: Assoc. Prof. Roumen Georgiev Dimitrov, MD, PhD

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD
- Assoc Prof. Radka Kaneva, PhD
- Assoc. Prof. Ivanka Dimova, MD, PhD
- Asist. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Darina Kachakova, PhD
- Kalina Mihova
- Daniela Pencheva
- Alan Nachev, MD
- Sashka Rajcheva, MD
- Karela Mainhard, MD
- Prof. Ivo Kremensky, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of obstetrics and gynecology, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: In the past years molecular genetic studies confirm the great heterogeneity of ovarian tumors and impose a new concept in their classification by dividing them into two large groups: type I and type II. Type I includes serous, endometrioid, mucinous and clear cell tumors with a low grade of malignancy (low grade). The most common molecular genetic changes that distinguish serous tumors with low grade are mutations in the MAPK signaling pathway and in particular mutations in the KRAS and BRAF genes. On the other hand, high grade type II ovarian tumors are characterized by mutations in genes involved in DNA repair mechanisms such as TP53, BRCA1, BRCA2, CHEK1, CHEK2, ATM, ATR, and RAD51. The aim of the current project was: To expand the existing biobank of patients with ovarian cancer in the Molecular Medicine Center (MMC) and optimise the conditions for storage of biological materials for future molecular genetic studies. For implementation of the project objectives the following tasks were carried out: collection of biological samples and expansion of the tumor/normal ovarian tissues biobank in MMC, DNA extraction from blood and establishment of clinical database for patients with ovarian carcinomas. A biobank of 44 patients with ovarian carcinomas, including DNA from blood, tumor and normal tissue samples was collected in MMC for the period 2014–2017. All tissues were stored in RNAlater (RNA Stabilization Solution for Tissue), and the obtained clinical data were systematised according to patients' age, histological type, degree of differentiation, TNM classification and stage of the tumours. The collected biobank will be used in NGS studies on elucidation of molecular genetic mechanisms of ovarian carcinomas. This will allow the molecular profiling of different ovarian tumor subtypes in Bulgarian patients, the determination of their characteristic spectra of driver mutations, the affected signal-transduction pathways and therapeutic targets.

Scientific publications and presentations:

- Dodova R, A Mitkova, I Dimova, et al. Genetic Studies in BRCA-Related Breast and Ovarian Cancer, Sofia, XXth National Gynecological Conference, Borovets, 16-18 Mar 2017

MEDICO-BIOLOGICAL AREA “GRANT 2017”

Contract D-55/02.05.2017 Effects of 5HT₂ antagonists on hyperthermia in a serotonin syndrome model

Research team: Assoc. Prof. Rumen Nikolov, PhD

- Assist. Prof. Georgi Bogdanov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology

RESULTS: The aim of the present study was to establish the effects of 5-HT₂ antagonists such as olanzapine and risperidone on the hyperthermic reaction in experimental serotonin syndrome in rats. The animal model of serotonin syndrome used in our experiments was induced by administration of fluoxetine and tranylcypromine. Body temperature experiments were conducted at an ambient temperature of 24 ± 1 °C. The body temperature of the animals was measured with thermistor probes (TX-8) and monitored on a multichannel recorder Iso-Thermex 16. The thermistor probes were lubricated and inserted rectally to a depth of 6 cm. Pretreatment with olanzapine (5 mg and 10 mg/kg, i.p.) or risperidone (1 mg and 2,5 mg/kg, i.p.) diminishes or blocks the development of hyperthermic response in a serotonin syndrome model in rats. The present findings suggest that hyperthermic reaction observed in serotonin syndrome are mediated by activation of the central 5-HT₂ receptors.

Scientific publications and presentations:

- Nikolov R, Bogdanov G. Effect of risperidone on hyperthermia in experimental serotonin syndrome in rats. *Meditsinski pregled*. 2018;54(4)
- Toteva S, Koleva K, Bogdanov G, et al. Effects of olanzapine on hyperthermia in an experimental serotonin syndrome. ICMS, 10-13 May, 2018

Contract D-56/02.05.2017 Survey of toxicity and macrolide resistance in clinical significant pyogen cocci *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*

Research team: Assoc. Prof. Raina Tzvetanova Gergova, PhD

- Cor. Member Prof. Ivan Mitov, MD, PhD
- Adile Muhtarova
- Virna Maria Tsitou, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Medical Microbiology

RESULTS: The aim of this study was to determine the frequency and distribution of genes encoding super-antigens and toxins in Bulgarian *Streptococcus pyogenes* (GAS) and *Staphylococcus aureus* isolates and determine their macrolide resistance. Clinical isolates (GAS n=238, and *S. aureus* n=150) from different samples were screened for the presence of 21 in GAS and for 12 virulence genes in *S. aureus* using multiplex polymerase chain reaction (PCR). Genes for macrolide resistance were detected and also minimal inhibitory concentration (MIC) to erythromycin and clindamycin were determined. All of the tested strains GAS were shown to carry *slo*, *speB*, *sypCEP*, *sdaB*; more than 80%, *mac* and *smeZ*; followed by *speJ*, *speG* and

genes for DNA-ses *sdC*, *sdaD*, *Spd3* (between 50% and 75%). An attempt was made to seek an association between the detected GAS virulence genes, the kind of infection and the source of isolates. The most often of genes of virulence in tested *S. aureus* were *hlg* (85%), *sei* (81%), *seg* (45%), *seb* (44%), *sec* (42%). Their frequency was compared with results from other countries. Near 35% of GAS isolates and more than 40% of *S. aureus* from 2017 were macrolide-resistant. The most often phenotypes and genotypes of macrolide resistance in streptococcal and staphylococcal strain were determined. For the first time was detected the higher pathogenic potential of Bulgarian isolates GAS and *S. aureus* compared with other countries. The genes *speA*, *speF*, *speL*, and *speM* or their combinations were detected more often in invasive isolates than in noninvasive ones. Macrolide resistant isolates from 2017 GAS were 34% and *S. aureus* 42%.

Scientific publications and presentations:

- Muhtarova A, Gergova R, Setchanova L et al. Distribution of super-antigens and toxins in Bulgarian invasive and non-invasive clinical isolates *Streptococcus pyogenes*. Acta Microbiol Bulg. 2017;33(4):151-156.
- Muhtarova A, Gergova R, Setchanova L et al. Distribution of super-antigens and toxins in bulgarian invasive and non-invasive clinical isolates *Streptococcus pyogenes*. 10th Balkan Congress of Microbiology Sofia, Bulgaria 16–18 Nov 2017
- Tsitou V, Gergova R, Muhtarova A, et al. The toxic potential of bulgarian clinical isolates *Staphylococcus aureus* determined by multiplex PCR. 10th Balkan Congress of Microbiology Sofia, Bulgaria Nov 16-18, 2017

Contract D-57/02.05.2017 Microbiological and molecular genetic investigations on the resistance mechanisms to glycopeptide antibiotics in clinical isolates of *Enterococcus* spp.

Research team: Assoc. Prof. Tanya Vasileva Strateva, MD, PhD

- Corr. Member Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DMSci
- Prof. Encho Savov, MD, PhD, DMSci – MDC „Generali Zakrila”
- Assoc. Prof. Svetoslav Dimov – SU „St. Kliment Ohridski”
- Assist. Prof. Ivo Sirakov, VMD, PhD
- Angelina Trifonova - Military Medical Academy

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: A total of 51 nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREFm) isolates, identified by the *sodA* polymerase chain reaction (PCR), was collected during the period 2013-2017 from three large hospitals in Bulgaria. The aims of this study were: to determine the antimicrobial susceptibility (EUCAST-2017); to perform molecular genetic investigations on the resistance mechanisms to glycopeptides and epidemiology of the isolates by Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR and multilocus sequence typing (MLST); as well as to ensure appropriate recommendations for the treatment. The antibiotic resistance rates were: to ampicillin, imipenem, gentamicin (high-level resistance), vancomycin, teicoplanin, ciprofloxacin, and quinupristin-dalfopristin – 100%; linezolid, tigecycline, and daptomycin (interpreted according to the CLSI-2016 criteria) – 0%. All studied VREFm isolates were positive for the *vanA* gene. Only two cluster groups (CGs) with 81% clonal relatedness between

them were found by RAPD-PCR with AP4 primer – CG-I (23 strains, 93% similarity) and CG-II (28 strains, 95%). The use of P2 primer showed: distribution in five CGs – CG-I (22 strains, 93%), CG-II (12 strains, 90.5%), CG-III (5 strains, 90%), CG-IV (2 strains, 96%) and CG-V (2 strains, 96%); 8 strains without belonging to clusters and clonal relatedness (70%) between 42 of the VREFm studied. MLST determined all strains genotyped as sequence type (ST) 203 (allele profiles: 15-1-1-1-1-20-1). Approved treatment options, including linezolid, tigecycline, and daptomycin, are the preferred agents of choice for infections caused by vancomycin-resistant enterococci. In conclusion, this is the first report on genotyping of nosocomial VREFm isolates in Bulgaria. The present study demonstrates the persistence of an epidemic clone of *vanA* multidrug-resistant *E. faecium* ST203 in three Bulgarian hospitals over a period of four years and exposes the necessity of continuous epidemiological surveillance of VRE clones in the hospital wards. The therapy of VRE infections is difficult, but newer agents such as tedizolid, telavancin, dalbavancin, and oritavancin; use of antimicrobial combinations; improved antibiotic dosing and administration strategies are promising for the future treatment of VRE.

Scientific publications and presentations:

- Strateva T, Dimov S, Trifonova A, et al. Epidemiological typing of vancomycin-resistant nosocomial *Enterococcus faecium* isolates from three large hospitals in Bulgaria. *Medical Review*. 2018;54(2):34-41.
- Strateva T. Antimicrobial therapy of infections caused by vancomycin-resistant enterococci. *Medical Review*. 2018;54(3):15-23.
- Strateva T. Gene-geographic characteristics of the vancomycin-resistant *Enterococcus* species and enterococcal clones. *Medical Review*. 2018;54(6):3-10.
- Strateva T, Sirakov I, Dimov S, et al. Clonal spread of *vanA* *Enterococcus faecium* sequence type 203 in Bulgarian hospitals. *Infect Dis*. 2018;50(9):718-21
- Trifonova A, Dimov S, Strateva T. Endemic clone of *Enterococcus faecium* nosocomial isolates with glycopeptides resistance in Bulgarian hospitals – molecular-genetic investigations. First Young Scientists Seminar on Genetics. SU “St. Kliment Ohridski”, Sofia. 24 Nov 2017.
- Strateva T, Sirakov I, Savov E, et al. Clonal spread of *vanA* *Enterococcus faecium* sequence type 203 in Bulgarian hospitals. *Eur Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Madrid, Spain. 21–24 Apr 2018

Contract D-58/02.05.2017 Molecular-genetic diagnostics in patients with indefinite type neuromuscular disorders by next generation sequencing

Research team: Assist. Prof. Bilyana Georgieva Georgieva, PhD

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, PhD, DSci
- Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD, DSci
- Maria Glushkova, PhD student
- Savina Tincheva, PhD student
- Iglia Yordanova, PhD
- Andrey Kirov, PhD
- Tihomir Todorov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of medical chemistry and biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia.

RESULTS: The aim of the current study is to apply the Next Generation Sequencing (NGS) method for diagnostics of different types of neuromuscular disorders in Bulgarian patients. We tested 8 patients from 8 families with the indefinite type of the neuromuscular disorder, because of the great diversity in the clinical symptoms, as well as families with excluded common and/or some rare neuromuscular disorders. The biologic material is genomic DNA extracted from venous blood. The methods we apply were NGS and Sanger sequencing. At 7 patients from 7 families (87.5%), the NGS analysis led to the detection of molecular defects in relevant genes (*LAMA2*, *COL6A1*, *MYH7*, *VAMP1*, *SPAST*), with which we determined the exact molecular genetic diagnosis. Only in one family, the NGS analysis failed to detect mutations and the patient remains with the indefinite diagnosis. We identified totally 8 pathological genetic variants, 4 of which are unpublished (c.5560-2A>C in intron 37 and c.5746C>T, p.Gln1916* in exon 39 of *MYH7* gene; c.66delT, p.Gly23Alafs*6 in exon 2 of *VAMP1* gene; c.1039C>T, p.Gln347* in exon 7 of *SPAST* gene), which enriches the global mutation database and highlights the issue of genotype-phenotype correlations. In addition, 16 relatives from the 7 families with defined molecular defect were genotyped with Sanger sequencing. In 2 of the families with the autosomal dominant type of inheritance of the disorder we detected 3 presymptomatic carriers, which currently are healthy, but later will develop clinical symptoms. The current work led to diagnostics of 7 Bulgarian patients with different types of neuromuscular disorders on the molecular-genetic level. Only if a proper molecular-genetic diagnosis is available, then an adequate consultation, prenatal diagnostics, prophylaxis and treatment of the disorder could be offered to the family aiming to improve their quality of life.

Scientific publications and presentations:

- Todorov T, Georgieva B, Kirov A, et al. NGS approach in cases with congenital neuromuscular disorders. 12th Balkan congress of human genetics; 8th National conference for rare diseases; 8-10 Sep 2017 – Plovdiv, Bulgaria; Rare Diseases & Orphan Drugs, 2017;40(Suppl 1):33-4.

Contract D-59/2.05.2017 Investigation of main mechanisms of resistance to beta-lactams and quinolones among cephalosporin resistant or/and carbapenem- clinically significant isolates *Enterobacter spp* in University hospital “Saint Marina” Varna

Research team: Assoc. Prof. Rumyana Donkova Markovska –Davidkova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Temenuga Stoeva, MD, PhD, MU-Varna
- Petya Stankova
- Dobromira Dimitrova, MD, MU-Varna
- Assoc Prof. Radka Kaneva, PhD
- Kalina Mihova
- Corr. mem. Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Dept. of medical microbiology

RESULTS: The aim is characterization of clinical isolates of *Enterobacter spp* resistant to cephalosporins third generation and/or carbapenems in UB - Varna - mechanism of resistance to beta-lactam plasmid quinolone resistance, clonal relatedness, species of *Enterobacter cloacae*

complex. The research methods used included – Disk- diffusion method and MIC for susceptibility determination, isoelectric focusing and bioassay, PCR for characterization of beta-lactamases types and AmpC enzymes, sequencing, PCR for determining the basic mechanisms of plasmid quinolone resistance, conjugative transfer and plasmid typing , epidemiological typing by ERIC PCR, determination of the *Enterobacter cloacae* complex species composition by HSP sequence analysis. 433 *Enterobacter* spp were isolated, with 57% of them being the cephalosporin-resistant third generation. They showed resistance to cefepime - 87%, gentamicin - 86%, ciprofloxacin - 85%, 60% resistance to cotrimoxazole and 65% to piperacillin / tazobactam. Isolates were highly susceptible to amikacin - 96%, imipenem - 100%. Isoelectric focusing and molecular-genetic methods proved a high percentage of CTX-M enzymes in 83% of the strains, the six isolates (3.4%) were positive for blaSHV, with 13.6% showing hyperproduction of AmpC enzymes. All isolates were negative for CMY and FOX beta-lactamases. Nucleotide sequencing showed the presence of CTX-M-3 (in 10%), CTX-M-15 (in 72%), two strains had both beta-lactamases and SHV-12 ESBL at 3.4%. All 176 *Enterobacter* spp isolates. were subjected to PCR detection of genes associated with plasmid quinolone resistance: qnrB genes prevailed with 57%. Epidemiological typing demonstrated the presence of one major clone A - (in 56%) in all hospital wards and throughout the whole study period. In the *E. cloacae* complex group, *E. hormaechei* subsp. *steigerwallti* was dominant - in 59%, followed by *Enterobacter cloacae* cluster III - 23% and *E. hormaechei* subsp. *oharae* (cluster VI) - 13%, we detected as well as 1 isolate *Enterobacter ludwigii*.

Scientific publications and presentations:

- Dimitrova D, T Stoeva, R Markovska, et al. Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Enterobacter* spp., obtained from patients, hospitalized in Varna University Hospital during the period 2014-2016. J of IMAB 2017;23(4):1828-33
- Markovska R, Stoeva T, Dimitrova D, et al. Quinolone resistance mechanisms among third-generation cephalosporin-resistant isolates of *Enterobacter* spp. in a Bulgarian University Hospital. Infect Drug Resist. 2019; 28;12:1445-55.
- Dimitrova D, Stoeva T, Markovska R, et al. Molecular epidemiology of multidrug resistant *Enterobacter cloacae* blood isolates from a University Hospital. J of IMAB, 2019;25(2): 2457-64.
- Markovska R, Stoeva T, Stankova P, et al. Mechanisms of beta-lactam resistance among third-generation cephalosporin-resistant isolates from family *Enterobacteriaceae* different from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia, Bulgaria, Nov16-18, 2017

Contract D-61/02.05.2017 Genetic studies for congenital cardiac anomalies, DiGeorge syndrome and Hypoplastic left heart syndrome established by ultrasound examination

Research team: Prof. Albena Parvanova Todorova – Georgieva, DSci

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSc
- Slavena Tsaneva, PhD student
- Igljka Yordanova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of medical chemistry and biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia.

RESULTS: The aim of the present study was to establish a genetic reason for congenital heart defects established during an ultrasound examination of the fetuses. Within the frame of the present scientific study, our team introduced and optimized successfully pre-selected molecular genetic techniques for the diagnostics of the congenital heart malformations. The selected techniques are as follows: MLPA analysis for detection of large deletions in DiGeorge critical regions, MLPA analysis for large deletions/duplications along the length of genes associated with congenital heart defects and sequencing analysis for molecular defects in the *GJA1* and *NKX2-5* genes. All tested DNA samples (20 in number) were found negative for the most common chromosomal anomalies. Based on the molecular-genetic analyzes in the present study we established the reason for the observed cardiac malformation in 8 of the 20 tested DNA samples (40%). In 5 of 11 tested DNA samples for DiGeorge syndrome using ultrasound data, we established deletion within the gene loci 22q11.21, which confirmed the diagnose. In one of the tested DNA samples, we established additional genetic material including the 22q11-q13 region. In one of the cases, we established a microduplication in the 22q11.21 region (exon 5 of *SNAP29* gene). In one familial case, we established a microdeletion in the 22q11.21 region in the DNA sample from the father, which explains the heart malformation in the generations. In the tested DNA samples with ultrasound data for the hypoplastic left heart, the sequencing analysis did not show any molecular defects in the *GJA1* and *NKX2-5* genes. The recent advancement in ultrasound technology along with molecular-genetic diagnostics allowed the possibility to identify the genetic reasons for heart malformations established prenatally. This allows adequate genetic counseling in the affected families, adequate therapy and post-natal management of the patient with a congenital heart defect.

Scientific publications and presentations:

- Tsaneva S, Todorov T, Genova J, et al. The role of molecular genetic analysis in the diagnostics of congenital heart diseases. 12th Balkan congress of human genetics; 8th national conference for rare diseases, 8-10 Sep 2017, Plovdiv, Bulgaria, Rare Disease and Orphan Drugs, 2017

Contract D-62/02.05.2017 Next generation sequencing of patients with hereditary neurosensory hearing loss to clarify the genetic cause of hearing impairment

Research team: Diana Petrova Popova

- Radka Kaneva
- Darina Kachakova
- Kalina Mihova
- Reni Tsveova
- Venera Dobriyanova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Faculty of ENT, Dept. of ENT

RESULTS: The purpose of the study is a clinical and genetical diagnostics of families with family history of neurosensory hearing loss (NSHL), defining clinical and genetical characteristics of the hearing damage by conducting a targetted new generation sequencing. There were examined patients with NSHL who rejected frequent genetical mutation such as mutations in connexin genes - Cx26, Cx30, Cx31 and carrying mitochondrial mutations. There were selected five patients and their families. A genetic cause for hearing loss was found out in

two of them. When examining DF210 the variant c.853G>A(p.Gly285Ser) in exon 6 of the KCNQ4 gene was found. The mutations in it are connected with the development of an autosomal dominant hearing loss. A genetic cause for a formation of NSHL is assumed and in patient DF139, in whom, with the help of CNV analysis made by VarSeq, was found a duplication of 51 basic pairs in OTOA gene (16:21679026-21679076), affecting exon 3 and partly intron 1-2 and intron 2-3. This is associated with a clinical phenotype in the autosomal recessive hearing loss. Another method for support of the result obtained in the CNV analysis is also needed, which should be applied first to the proband, and then to all the other family members. As regards to the patients DF60 and DF182, the found variants are insufficient to be associated with the particular clinical picture. There are not found pathological variants in DF84, and AD inheritance is assumed. Reasons for the inability to register genetic causes for the development of hearing loss in families 1, 2 and 4 are unclear. There have not been found all the genes causing a hearing loss up to the moment. Structural, mutational and epigenetic modifications related to the development of hearing loss have not been fully explained.

Contract D-63/02.05.2017 Expression profiling of angiogenic factors in spontaneous abortions

Research team: Assoc. Prof. Ivanka Istalianova Dimova, MD, PhD

- Ekaterina Nikolova, PhD
- Mariela Hristova-Savova
- Natalia Trpchevska, PhD student, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
- Magdalena Dimitrova - SAGBAL “Dr Shterev”, Sofia
- Momchil Rizov - MC “Reprobiomed”, Sofia

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical genetics

RESULTS: With the present study, for the first time in Bulgaria an expression analysis of angiogenesis factors in decidual tissues from spontaneous abortions without a clear reason was performed compared to abortion controls as elected abortions, by using real time PCR method. Mean levels of VEGFA expression in spontaneous abortions were 2.97 times higher compared to the control tissues and those of VEGFR2 - 9.8 times higher. With regard to SDF-1 expression levels, we found an average of 22.2 fold increase over controls, and for its receptor CXCR4 - 2.3 times the mean increase. Given that VEGFR2 and SDF-1 are molecules that are expressed in endothelial cells, we can conclude that there is increased angiogenesis, i. e. density of the vascular network in spontaneous abortions compared to control tissues. This could be a response to increased expression of VEGFA by extracellular tissues or an increased number of specific subpopulation of uNK cells expressing CXCR4. Conversely, the latter could accumulate as a result of the chemotaxis caused by SDF-1 over-expression in the endothelium. Increased expression of essential factors for angiogenesis has been identified, suggesting excessive angiogenesis in the pathogenesis of spontaneous abortions with an unclear cause. Contemporary studies underline the importance of angiogenic factors in both diagnosis and therapy of spontaneous abortions.

Scientific publications and presentations:

- Rizov M, Kachakova D, Belemezova K, et al. Expression of angiogenic factors VEGFA/VEGFR2 and chemokines SDF-1/CXCR4 in spontaneous abortions. Eur Human Genetics Conference 2018, Milan, Italy

Contract D-64/02.05.2017 Cloning of genes responsible for toxigenicity of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates and study of their interaction with the cellular receptor CD77

Research team: Correspond. Prof. Ivan Gergov Mitov, MD, PhD, DSci

- Assist. prof. Irina Alexandrova, PhD – BAS
- Assist. prof. Ivo Sirakov, DVM, PhD
- Ralitzia Popova-Ilinkina, DVM, PhD – BFSA
- Gergana Mizgova - Lozenetz Hospital

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave str., Sofia 1431

RESULTS: Infections with EPEC and STEC (EHEC) are essential for the human population because the most common source is food, which is a requirement for endemic outbreaks. In regard with this, the project aims to analyze Bulgarian *Escherichia coli stx* and *eae* isolates by PCR - to determine the type of intimin toxin, by RAPD, MLST and on the basis of this to clone the genes of toxicity and their insertion in a yeast two-hybrid system to study their interaction with the cellular receptor CD77. We developed primers and protocols to differentiate the *eae* gene. We first identified in Bulgaria the RAPD and MLST profiles of *stx* and *eae* isolates, establishing a phylogenetic relationship between some of them. Subunits A and B of the *stxI* gene were successfully cloned, but we did not get a satisfactory result using them in a yeast two-hybrid system. One of the possible causes may be the genetic profile of the isolates used, but additional experiments with isolates carrying another genetic profile are required to confirm this.

Scientific publications and presentations:

- Borisova B, Alexandar I, Strateva T, et al. Algorithm for determination of an intimin toxin type encoded by the *Escherichia coli's eae* gene, SGIP 2018, Sofia, 3-5 Oct 2018
- Sirakov I, Strateva T, Popova R, et al. Protocols for intimin toxin encoding genes differentiation and characterization in *Escherichia coli*. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria, Hisarya, 10-13 Oct 2018;
- Alexandar I, Popova R, Mizgova G, et al. Analysis of protein-protein interactions of shiga toxins and their host cell receptor CD77 by yeast two-hybrid system. Int Scientific Conference Kliment's Days, Sofia, 8-9 Nov 2018;

Contract no D-65/02.05.2017 Study on the treatment effect of agomelatine in epileptic status induced with kainic acid upon the mechanisms regulating cerebral reactivity in temporal lobe epilepsy model

Research team: Prof. Nikolai Elenkov Lazarov

- Assoc. Prof. Jana Tchekalarova, PhD – BAS

- Assist. Prof. Angel Dandov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Dimitrinka Atanasova-Dimitrova, PhD – BAS
- Assist. Prof. Lidia Kortenska – BAS
- Assist. Prof. Todor Kirov
- Polina Dimitrova, student
- Albert Gradev, student
- Maria Dinkova, student
- Sabina Mitova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Anatomy, Histology and Embryology, Medical University of Sofia, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: Recently much data appeared in literature on the anticonvulsant effects of the antidepressant agomelatine (Ago) in acute seizure tests on intact animals. The *goal* of the project was to study the effect of Ago, when applied in kainic acid (KA)-induced epileptic status (ES), on the epileptiform activity during the acute and chronic stage of epilepsy, the neuronal loss and the accompanying inflammatory response (activated microglia and astrocytes) in Wistar rats. To perform the goals of the study we employed these methods: electrode implantation for EEG recording, KA-induced ES, pharmacological approach, 24-hour video-surveillance and EEG recording, morphological and immunohistochemical methods. In *Experiment no.1*, Ago (40 mg/kg i.p.), applied at certain intervals during ES (15 min., 6, 24 and 48 hrs), did not seem to be effective for the number of the EEG registered paroxysms or their duration when compared with lacosamide (50 mg/kg i.p.), the latter used as a positive control in the same regimen. We did not register either any efficiency of the drug against spontaneous epileptiform activity in comparison with lacosamide in video- and EEG recording four months after ES. In *Experiment no.2*, Ago and lacosamide were injected once during the chronic stage of epilepsy to study their anticonvulsant effect from a single dose. The EEG-recorded paroxysms and their duration were not altered by Ago, whilst lacosamide decreased them when compared with the group injected only with the solvent. The spectral analysis of the EEG-recorded activity showed that Ago and lacosamide decrease the relative values of the γ -waves in the frontal and parietal cortex when compared to the KA-treated with a solvent group. The multiple administration of Ago has a powerful neuroprotective and anti-inflammatory effect, as it suppresses the KA-induced microgliosis and astrogliosis in CA1 and CA3c fields of the dorsal hippocampus. In conclusion, Ago does not affect the epileptiform activity in KA-induced post-ES model of temporal epilepsy, though it provides neuroprotection and selectively suppresses activated glia and astrocytes in CA1 and CA3c fields of the dorsal hippocampus. Future studies are needed to find out the specific mechanisms involved in the effects of the tested drug agent.

Scientific publications:

- Atanasova D, Tchekalarova J, Ivanova N, et al. Losartan suppresses the kainate-induced changes of angiotensin AT₁ receptor expression in a model of comorbid hypertension and epilepsy. *Life Sci* 2018;193:40-46.
- Tchekalarova J, Atanasova D, Atanasova M, et al. Chronic agomelatine treatment prevents comorbid depression in kainate model of epilepsy through suppression of inflammatory signaling. *Neurobiol. Dis.* 115 (2018) 127-144.
- Stoyanova T, Ivanova N, Tchekalarova J, et al. Effects of Agomelatine and Lacosamide on kainate-induced status epilepticus, epileptogenesis and EEG seizure activity in Wistar rat. *Acta Morphol Anthropol.* 2018, in press.

- Lazarov N, Tchekalarova J, Atanasova D. Chronic agomelatine treatment suppresses the kainate-induced glial reaction during epileptogenesis in rats. XXIII Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Oct 5-7, 2017, Varna, Bulgaria.
- Dandov A, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Kainate-induced changes and the effect of losartan on angiotensin AT₁ receptor expression in limbic structures in a rat model of comorbid hypertension and epilepsy. XXIII Congress of the Bulgarian Anatomical Society, Oct 5-7, 2017, Varna, Bulgaria
- Tchekalarova J, Atanasova D, Atanasova M, et al. Antidepressant effect of chronic agomelatine treatment in kainate model of epilepsy-associated depression involves suppression of inflammatory signaling. Symposium Neurogenesis in the Developing and Adult Primate Brain - Challenges for Therapeutic Applications, May 19-20, Varna, Bulgaria.
- Tchekalarova J, Atanasova D, Kortenska L, et al. Agomelatine exerts neuroprotection against kainate-induced epileptogenesis without preventing the development of status epilepticus and spontaneous seizure activity in Wistar rats. Scientific Conference - 70th Anniversary of the Inst Neurobiol Bulg Acad Sci 30.X.-01.XI.2017 Sofia
- Goranova P, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Effects of chronic treatment with agomelatine on seizure activity, comorbid behavioral changes and neuronal damage in the kainate model of temporal lobe epilepsy. XVI Int Congress of Medical Sciences, May 11-14, 2017, Sofia, Bulgaria, Breaking the barriers of Science, transforming Medicine. Abstract, p. 112.
- Dinkova M, Atanasova D, Tchekalarova J, et al. Antidepressant effect of chronic agomelatine treatment in kainate model of epilepsy in rats involve suppression of inflammatory signaling. II Int Biomedical Congress of Sofia, 17-19 Nov 2017

Contract D-66/02.05. 2017 Image-Based high content screening analysis of the involvement of protein kinase CK2 in TGFβ₂-induced epithelial–mesenchymal transition of LENSs, isolated from Bulgarian cataractous patients

Research team: Academic, Prof. Vanyo Ivanov Mitev, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Antonia Isaeva, PhD
- Assist. Prof. Violeta Dimitrova, PhD student
- Assist. Prof. Olga Belcheva, PhD
- Prof. Iva Penkova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Ivan Tanev, MD, PhD
- Vasil Haykin, MD, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: In current study the primary LENSs cultures from anterior capsules, collected from the capsulorhexis procedure during cataract surgery of 5 ARC (age-related cataract) patients and 5 type 2 diabetic cataract patients (all between 55 and 75-year old), were established for the first time. The difference in cell population doubling time of the primary LENSs cultures, isolated from the two type cataractous patients, has been found – the primary LENSs, isolated from type 2 diabetic cataract patients were reaching 70% cell confluence for a week longer culturing period

compared to LENSs, isolated from ARC patients. The specific cell population doubling time of the type 2 diabetic cataract-isolated primary LENSs cultures gives entirely new information, evidencing for lower migration and proliferative rate of these LENSs comparing to ARC-isolated primary LENSs. Simultaneously, spontaneously differentiating cells, characterized with fibroblast-like morphology were found in type 2 diabetic cataract-isolated primary LENSs cultures, no changed cell morphology was observed in the ARC-isolated primary LENSs cultures. In heterogenic (composed of LENSs with cuboidal morphology and fibroblast-like cells) cultures of type 2 diabetic cataract-isolated LENSs a formation of Elschnig's pearls was observed. The homogenic LENSs cultures were treated with human recombinant TGF β 2 for 24 h. and the effects on ERK1/2 activity, cytoskeleton's protein vimentin expression and expression of transdifferentiated-specific protein α SMA were investigated by immunofluorescence microscopy-based high content screening analysis. The immunofluorescence analyzed here showed that TGF β 2 significantly stimulates ERK1/2 activity and α SMA expression. The role played by catalytic subunit (α) of protein kinase CK2 in TGF β 2-induced regulation of ERK1/2 activity, vimentin expression and expression of α SMA was studied by immunofluorescence microscopy-based high content screening analysis of siRNA-mediated CK2 α silenced LENSs cultures. The endogenous CK2 α was effectively suppressed by siRNA-mediated silencing, resulting in significant down-regulation of TGF β 2-activated activity of ERK1/2 and α SMA expression. Summarized, our original results are evidencing for CK2 α -dependable regulation of ERK1/2-dependable transduction of TGF β 2 in LENSs, isolated from Bulgarian cataractous patients.

Contract D-67/02.05.2017 Role of the cannabinoid and the serotonergic neurotransmitter systems on cold stress-induced nociception triggered in rats

Research team: Assist. Prof. Hristina Hristova Nocheva-Dimitrova, MD, PhD

- Prof. Alexandar Stojnev, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Roman Tashev, MD, PhD
- Assist. Prof. Radka Tafradjiska, MD, PhD
- Assist. Prof. Mimoza Tzvetkova, MD, PhD
- Assist. Zafer Sabit
- Dimitar Kochev, PhD student
- Alexa Andonov, student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pathophysiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: Functional and structural changes in the body caused by stress due to complex interactions between the endocrine, the immune and the central nervous systems can trigger pathological conditions known as stress-induced disorders: coronary heart disease, arterial hypertension, diabetes mellitus, peptic ulcer disease, Graves disease, tumors, depression, sleep, appetite, and reproductive disorders – all of them with social relevance. Discovery of stress development mechanisms could give some practical clues for decreasing its negative impact on the organism. The aim of the project was elucidation of the role of the cannabinoid and the serotonergic systems on pain perception after stress in rats. Cold stress was induced and pain perception was evaluated through mechanical (*Paw pressure test*) and thermal (*Hot plate test*)

stimulation. The results obtained confirmed the hypothesis: the endogenous cannabinoid and the serotonergic neurotransmitter systems interact with each other and modulate pain perception after stress. Injection of both anandamide (AEA) and DPAT after 1 hour of cold stress (1h CS) increased pain threshold in experimental animals compared to animals after 1h CS. Antagonizing CB1-receptors (with AM251), as well as the serotonergic 5HT_{1A} – receptors (with DPAT) changed the interaction between the agonists (AEA and DPAT) decreasing pain thresholds in experimental animals compared to animals after 1h CS. The results also suggest that other systems as well (for example: the opioid system, the nitric oxide system, the adrenergic system) participate and accomplish for the interaction between the cannabinoid and the serotonergic systems. Such interactions could be an interesting target for additional projects. It would also be interesting to find out how the cannabinoid and the serotonergic systems would modulate cold stress-induced analgesia when applied before and NOT AFTER cold stress as it was in this case.

Scientific publications and presentations:

- Tzvetkova M, Sabit Z, Vidinova C, et al. Cannabinoid and serotonergic systems in modulation of stress-induced analgesia. CR Acad Bulg Sci 2019

Contract Д-68/02.05.2017 Modulation of the memory processes after infusion of angiotensin II and losartan into the amygdala of rats with a depression model

Research team: Assoc. prof. Roman Emilov Tashev, MD, PhD

- Prof. Alexander Stoynev, MD, PhD, DSci
- Assist. prof. Radka Tafradjiiska, MD, PhD
- Assist. prof. Hristina Nocheva, MD, PhD,
- Assist. prof. Mimoza Tzvetkova, MD
- Assist. prof. Zafer Sabit, DVM,
- Dimitar Kochev, MD, PhD student
- Ludmila Yankova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pathophysiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: Angiotensin II (Ang II) is the most important angiotensin peptide, which binds selectively AT1 and AT2 receptors. A major depressive disorder is one of the world's major causes of disability. Bilateral olfactory bulbectomy (OBX) is a widely used animal model of depression. The effects of Ang II (0.5 µg) and losartan (100 µg) specific antagonist of AT1 receptors, infused uni- or bilaterally into the central nucleus of the amygdala (CeA) on the avoidance performance in OBX rats using active avoidance (shuttle box) test and passive avoidance (step-through) test were investigated. In non-OBX group (sham-operated), it was found that Ang II microinjected bilaterally or into the left CeA impaired the learning and memory (shuttle box and step through) as compared to the saline-treated controls. Right-side Ang II infusions did not affect learning criteria. Losartan microinjected bilaterally or into the left CeA improved the learning and memory, while right-side losartan administration did not affect as compared to the respective controls (shuttle box and step through). The bilateral or left CeA infusions of Ang II on the developed depression background impaired the learning and memory, while losartan applied bilateral or left-side improved the memory of OBX rats compared to the respective OBX controls (shuttle box and step through). The memory was improved after

inhibition of the AT1 receptors in the left amygdala as compared to the right amygdala. It was found that losartan reverses memory deficits induced by bulbectomy, unlike Ang II which deepens it. In conclusion, this study for the first time provides information about a lateralized modulatory effect of losartan infused into the CeA on the memory deficits in OBX rats. The left CeA was predominantly involved in the positive effect of losartan on learning and memory. A possible role of the AT1 receptors in depression was suggested.

Scientific publications and presentations:

- Sabit Z, Tashev R. Effects of angiotensin II and losartan infused into amygdala on learning and memory in rats with a model of depression. 70 years Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, 30 Nov–1 Dec 2017, Sofia
- Sabit Z, Tzvetkova M, Nocheva H, et al. Role of angiotensin II and losartan infused into amygdala on learning and memory in rats with a model of depression. VIIIth Bulgarian Peptide Symposium, 8 -10 Jun 2018, Stara Zagora, Bulgaria.

Contract D-69/02.05.2017 Post-vaccine effect of 10-valent pneumococcal conjugated vaccine (PHiD-PCV10) on the etiology of acute otitis media (AOM) and nasopharyngeal carriage of otopathogenic bacteria among children with AOM during 2015-2017

Research team: Prof. Lena Petrova Setchanova, MD, PhD

- Assist. Prof. Ivo Sirakov, PhD
- Assist. Prof. Virna-Maria Tsitto
- Kalina Mihova

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, Zdrave Str. 2, 1431 Sofia

RESULTS: The aim of this study was to determine etiology and antimicrobial resistance of causative agents of acute otitis media (AOM) in children and nasopharyngeal carriage of otopathogenic bacteria among children with AOM after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) in Bulgaria. Serotypes and clonal linkages among multidrug-resistant (MDR) *S. pneumoniae* isolated from children during the implementation of PCV10 were analyzed. Middle ear fluid (MEF) obtained after spontaneous membrane rupture or taken by tympanocentesis from 240 children with severe AOM was investigated from 2012 to 2016. The most frequently isolated AOM pathogens were *S. pyogenes* (31%), *S. aureus* (21%), *S. pneumoniae* (20%) and *H. influenzae* (12%). Nasopharyngeal samples were obtained from 185 children with uncomplicated AOM episode in 2015-2017. Among isolated from nasopharynx the most common otopathogens were *S. pneumoniae* (42%), *H. influenzae* (26%), *M. catarrhalis* (23.0%) и *S. pyogenes* (14%). Problematic was antimicrobial resistance of *S. pneumoniae* isolates and macrolide resistance in *S. pyogenes* (32%). Out of 79 pneumococci isolated from children with AOM, 52% were nonsusceptible to penicillin, macrolides and MDR isolates. Marked reduction of PCV10 vaccine serotypes to 11% was found in the nasopharynx of children with AOM during the last two years. The proportion of non-vaccine types (NVTs) pneumococci has increased remarkably. The most common MDR serotypes *S. pneumoniae* were NVTs as 19A, newly emerged serotype 6C, 6A, 15A, and 23A. Clonal composition based on MLST genotyping of 79 multidrug-resistant *S. pneumoniae* isolates found that 75% of them belonged to internationally known eBURST clonal complexes (CCs), of which the most common MLST sequence types (STs) were

ST320 (19A and 19F), ST386 (6C), ST8029 (23A), and ST180 (serotype 3). A wide distribution of highly multi-resistant and virulent clone CC320 (Taiwan^{19F}-14) associated with serotype 19A was observed as a common pathogen in children. In the postvaccine period, a shift in the genetic structure of serotype 19A was found, when a significant increase of PMEN-14 (CC320) was occurred with a concurrent decrease of the major clone Denmark¹⁴-32 (CC230) observed prior to the introduction of PCV10 in Bulgaria. Clonality was found behind the wide distribution of MDR capsular types as a reason for high antimicrobial resistance at present time among *S. pneumoniae* isolates.

Scientific publications and presentations:

- Комитова Р, Сечанова Л, Боев И. За серотиповото заместване и конюгираните пневмококови васкини. Педиатрия. 2017; LVII (2): 49-52.
- Alexandrova A, Setchanova L, Mitov I, et al. Emerging serotype 6C *Streptococcus pneumoniae* isolates after the implementation of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. CR Acad Bulg Sci. 2018
- Setchanova L, A. Alexandrova, D. Pencheva, et al. Rise of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones expressing nonvaccine serotypes among children after introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Dec;15:6-11
- Сечанова Л. Пневмококови конюгираны ваксини - ефективен инструмент на общественото здраве и перспективи. Симпозиуми „Акад. Чудомир Начев”, 5, 27 май, 2017
- Setchanova L, Alexandrova A, Sirakov I, et al. Rise of multidrug resistant non-vaccine *Streptococcus pneumoniae* clones after implementation of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Bulgaria. X Balkan Congress of Microbiology (Microbiologia Balkanica' 2017), 16-18 Nov 2017

Contract D-70/02.05.2017 Effect of the rs266729 polymorphism on transcription regulation of the adiponectin gene (*ADIPOQ*) during normal and gestational diabetes pregnancy

Research team: Assist. Prof. Olga Jivanova Beltcheva, PhD

- Assist. Prof. Mariya Boyadzhieva-Vladimirova, MD
- Yana Hristova, MD
- Reni Tzveova, PhD – AgroBioInstitute
- Maria Atanasova – Elenkova - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Assoc. Prof. Violeta Dimitrova, PhD, MD
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, SBALAG “Maichin Dom” Zdrave 2 str. Fl. 14, Sofia 1431

RESULTS: Adiponectin is an adipose cell-specific secretory protein with a role in the regulation of metabolism. Changes in adiponectin secretion or signaling are amongst the factors contributing to insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. Previous research carried out by our team lead to the identification of an association between rs266729, a polymorphism located 5' upstream of the adiponectin gene, *ADIPOQ* and the individual risk for

insulin resistance during pregnancy. The single nucleotide variant in position -11 377 falls within a sequence suspected to contain enhancer or silencer elements with a role in ADIPOQ expression regulation. The aim of the present study was to determine whether nuclear extracts from adipose tissue contain protein factors capable of specifically recognizing and binding sequences in close proximity to rs266729. We prepared nuclear extracts from adipose tissue of pregnant women (both normal and gestational diabetes, GDM, pregnancies) harvested during routine cesarean sections. The protein extracts were then used to perform electromobility shift assay, EMSA, using biotin-labeled DNA probes complementary to the sequence encompassing the rs266729 variant. The results from our experiments confirm the suspected presence of binding sites for protein factors contained in adipose tissue nuclear extracts in close proximity to rs266729. Furthermore, the interaction is specific and involves a stretch of 35 base pairs. This is in agreement with the hypothesis that enhancers/silencers involved in ADIPOQ gene regulation are located in the 5' upstream region. Till now the only indications for such interactions came from cell culture studies, not with protein extract from cells, naturally expressing adiponectin. The present study helps to reveal yet another component of the complex mechanism for regulation of the expression of adiponectin, an adipocytokine with key role for the pathogenesis of GDM.

Scientific publications and presentations:

- Beltcheva O. Variations in the regulation of adiponectin gene and the individual risk for diabetes. "Acad. Chudomir Natchev" Symposium: Genetics and epigenetics of human diseases. Sofia. 24.10.2018

Contract D-71/02.05.2017 Effects of mesembrine alkaloids mediated by serotonin and cAMP on the behavior of rats with experimental diabetes mellitus type 1

Research team: Prof. Alexander Gueorguiev Stoynev, MD, PhD, DSci

- Prof. Strahil Berkov, PhD
- Assoc. Prof. Daniela Pechlivanova, PhD
- Assoc. Prof. Jana Tchekalarova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pathophysiology, 1 Bd G. Sofiisky, Sofia 1431

RESULTS: Experimental and clinical studies showed that diabetes mellitus significantly increases the risk of developing a comorbid depressive disorder. Our previous study has shown the development of depressive-like behavior in female rats with untreated type 1 diabetes mellitus. Mesembrine type alkaloids (MZM) established in high content in some plant sources, has a potential antidepressant and stimulant effect. This project aims to clarify the consequences of chronic treatment with MZM extracted from *Narcissus cv. "Hawera"* on diabetes mellitus-induced depressive type of behavior in female Wistar rats. The experiments were carried out on female Wistar rats and ICR mice of both sexes. Behavioral methods: Forced swimming; "Sucrose preference; "Open field; "Elevated plus-maze"; "Tail suspension"; SMART PanLab software. Biochemical Methods: Gas Chromatography, GC-MS; SOD Assay Kit-WST; Carbonylated proteins; COP; DPPH, HPLC for serotonin and cAMP levels in brain structures. The alkaloid fraction extracted from *Narcissus cv. "Hawera"* has a unique ratio of mesembrine alkaloids which administered at single doses of 25 and 50 mg/kg exerted a stimulatory effect on the locomotor activity and inhibitory on the depressive-like behavior in control mice of both

sexes. Chronic treatment with MZM of female control rats induces antidepressant and anxiolytic behavior, improved habituation to the unknown environment without substantially altering total motor activity. Chronic treatment with MZM lowers diabetes-induced polydipsia and polyuria, improves the habituation to an unfamiliar environment without significant effect on diabetes-induced depression and decreased motor activity. These results supply ground to suppose that the MZM has a beneficial effect on emotional forms of behavior in healthy individuals, but there is probably a mechanism of action different from that of diabetes-induced complications associated with hypoactivity and depressive-like behavior. These initial studies provide useful guidance for future studies and the potential use of this type of alkaloids as stimulants and antidepressants.

Scientific publications and presentations:

- Pechlivanova D, Nikolova M, Berkov S. Effects of mesembrine fraction from *Narcissus cv. "Hawera"* on anxiety and depression-like behavior in mice. Scientific Meeting of Bulgarian Society of Physiological Sciences, Sofia, Bulgaria, 03 Nov 2017.
- Kapanuk R, Pechlivanova D, Berkov S, et al. Effects of mesembrine alkaloids isolated from *Narcissus cv. "Hawera"* on depressive-like behavior in healthy and diabetic female rats. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 10–13 May 2018.

Contract D-72/02.05.2017 Pharmacological study of effects of pioglitazone in an experimental model of autism

Research team: Assos. Prof. Miroslava Georgieva Varadinova, MD, PhD,

- Prof. Nadka Boyadjieva, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Georgi Bogdanov, MD, PhD
- Kalina Kamenova
- Rositsa Metodieva
- Zhenya Stefanova, student
- Tanya Stefanova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology

RESULTS: An experimental model of autism has been developed in the offspring of female rats treated with valproic acid (600 mg/kg, i.p.) during pregnancy. The effects of 21-day administration of pioglitazone (2 mg/kg p.o.), risperidone (1 mg/kg po) and probiotic (1% po) alone and in combination on metabolic parameters (body weight, fasting blood glucose), nociception parameters (tail-flick test), learning and memory (latency time and number of errors in a shuttle-box test), proinflammatory cytokine values (serum levels of IL-1beta and IL-6) and concentration of neurotrophic factors BDNF and GDNF in the sera of the test animals. Prior to treatment with the substances, a significantly lower weight was observed in the experimental autistic groups compared to the control animals. In addition, after rats with experimental autism were treated with a combination of risperidone and probiotic or pioglitazone and probiotic, an increase in the mean bodyweight of the rats was recorded comparable to that of the control groups. The experimental model of autism showed a reduced pain threshold, and a beneficial effect on this parameter was observed after administration of the test substances. The most significant prolongation of pain response time was observed in the risperidone + pioglitazone and risperidone + probiotic combination groups. When conducting a shuttle-box test, the most significant shortening of latency time was recorded in the control rats treated with pioglitazone

followed by autistic groups treated with a combination of pioglitazone and risperidone or risperidone and probiotic. The most significant decrease in IL-6 levels compared to the control group was found in the autistic group receiving a combination of pioglitazone and probiotic, and of IL-1 beta in the experimental autistic groups receiving a combination of pioglitazone and probiotic or pioglitazone and risperidone. The highest values of BDNF and GDNF were recorded in the experimental model of autism treated with a combination of pioglitazone and risperidone. Taken together, our results suggest an important role of the combined administration of pioglitazone, risperidone and/or probiotics to improve neuroplasticity in patients with autistic spectrum disorders. In addition, our data show the significance of neuroinflammation, microbiome, GIT-CNS axis function, and the potential beneficial effects of the used substances in the therapy of autism symptoms and other neurodevelopmental disorders.

Scientific publications and presentations:

- Stefanova T, Stefanova Z, Bogdanov G, et al. Experimental treatment of autistic rats: effects on learning and memory. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, May 2018.
- Stefanova Z, Stefanova T, Bogdanov G, et al. Metabolic parameters after combined treatment in an experimental model of autism. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, May 2018.

Contract D-73/2017 Comparative investigation of antidepressant and immunomodulating effects of escitalopram in enriched and isolated housing conditions

Research team: Evgeni Yuriev Haritov, MD, PhD

- Assoc. prof. Vesela Raykova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology, Zdrave 2 str., 1431, Sofia

RESULTS: The aim of the current study is to assess the antidepressant and anti-inflammatory effects of antidepressant escitalopram in single and combined application with “environmental enrichment” in LPS-induced model of depression in neonatal Wistar rats. The experiments on the rats were performed in behavioral tests for depression (forced swim test-FST and sucrose preference test-SPT), followed by ELISA-assay for IL-1beta levels in brain homogenate. The results of the study showed that single application of “environmental enrichment” or escitalopram respectively, reduced the immobility time in FST, when compared with the group of rats treated only with LPS. These data clearly demonstrated the antidepressant effects of both approaches. Importantly, it was shown that the combined administration of the antidepressant and “environmental enrichment” produce the highest level of reduction of immobility time in FST. In the SPT-test for anhedonic-like behavior, the same tendencies as in FST were demonstrated. On the other hand, ELISA-assay of brain homogenate, performed after the behavioral tests, showed also the highest level of reduction of the levels of IL-1beta in the group of rats treated with a combination of escitalopram and “environmental enrichment”. Taken together, the results of our behavioral tests and ELISA-assay indicate that the response to anti-depressive treatment depends on the diverse housing conditions and the background of this is the augmentation of anti-inflammatory properties of some antidepressants by the so-called “enriched environment”. In conclusion, this data provides a rationale for the manipulation of rearing

conditions as an attractive and new strategy for the management of pharmacoresistant depression.

Scientific publications and presentations:

- Haritov E, Kirkov V, Kirkova M et al. Mechanisms and effects of housing conditions on CNS and psychiatric disorders. *Topmedica*, 2, 2018
- Haritov E, Angelov T, Kirkov V et al. Synergic effects of combined administration of escitalopram and environmental enrichment in LPS-induced neonatal model of depression in rats. *Neurology and psychiatry*, 2, 2018
- Haritov E, Angelov T, Angeleska E et al. Environmental enrichment and active lifestyle: morphological and functional effects on CNS. *Neurology and psychiatry*, 2, 2018.

Contract D-74/02.05.2017 Comparative evaluation of the effects of 2H-chromen and coumarine substituted hydrazide-hydrazones on the levels of the expression of inflammatory cytokines in maximal electroshock (MES) test for antiseizure activity and in formalin test for nociception in mice

Research team: Prof. Slavina Kirilova Surcheva, MD, PhD

- Assoc. Prof. Pavlina Gateva, MD, PhD
- Assoc. Prof. Violina Stoyanova, PhD
- Assist. Prof. Julian Voynikov, PhD
- Assoc. Prof. Jana Tchekalarova, PhD - BAS
- Prof. Rumiana Tzoneva, PhD -BAS
- Valentin Karabeliov, student
- Borian Spassov, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine

RESULTS: A set of five recently synthesized 2H-chromen and coumarine substituted hydrazide-hydrazones with proved anti-seizure activity and determined ED50 were selected. Testing for analgesic activity with hot-plate test and formalin test was performed in doses equivalent to the ED50 for the MES test. Mouse Cytokine Array Pannel A kit (R & D systems, a biotechnie brand) was used for semiquantitatively evaluation of up to 40 different cytokines in pooled brain homogenates from mice after application of the MES test, and the formalin test with and without pretreatment with the tested substances respectively. Looking at the possible underlying mechanism of the anti-seizure and analgesic activities, in silico analysis was performed with PASS Way2Drugs software. As a common mechanism for the 5 studied substances, activation of the mitochondrial HMCS2 (the key enzyme in the ketogenesis) was predicted. Taking into account that the ketogenic diet is one of the successful treatment methods for epilepsy at least in some cases, we accept that probably in the tested by us substances one of the possible mechanisms implicated in their antiseizure activity could be increased ketogenesis. This is a mechanism warrant further investigations especially in relation to the production of cytokines.

Scientific publications and presentations:

- Karabelyov V, Andreeva-Gateva P, Kamenova K, et al. In silico evaluation and in vivo testing of hydrazide-hydrazones bearing 2H-chromene and coumarin scaffold for

analgesic activity. Национална студентска конференция по фармацевтични и химични науки 19-20 април 2018, София, България

- Marchev S, Andreeva-Gateva P, Tzonev A, et al. Experimental study on the analgesic and antiseizure activity of newly synthesized hydrazide-hydrazones derivatives bearing 2H-chromene and coumarin scaffolds. XVIII World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 1-6 Jul 2018, Kyoto, Japan
- Tsonev A, Marchev S, Andreeva-Gateva P, et al. An evaluation of the antinociceptive properties of newly synthesized hydrazide-hydrazone derivatives. ICMS 2018

Contract D-75/02.05.2017 The role of certain polymorphic variants in genes, associated with blood pressure values, with reference to the risk of development of coronary heart disease

Research team: assoc. prof. Radka Petrova Kaneva, PhD, DSc

- Assoc. prof. Dobrin Vassilev, PhD
- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Liliya Vladimirova, MD
- Teodora Yaneva-Sirakova, MD, PhD
- Reni Tzveova, PhD
- Monika Shumkova, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry. Molecular Medical Center, Sofia 1431, 2 Zdrave Str.

RESULTS: The aim was to analyze the effect of polymorphic variants associated with the blood pressure values in genome-wide association studies in/next to genes and locuses CYP7A1 and PLEKHA7 for the development of ischemic coronary heart disease in Bulgarian patients. 100 consecutive patients with angiographically proven coronary heart disease were studied according to the inclusion criteria. All underwent a medical history, physical examination, blood sampling, ECG, echocardiography and carotid ultrasound, ankle-brachial index. The genotyping was with 7900 HT Fast Real-Time PSR (Applied Biosystems) with TaqMan® метод. The control group consisted of healthy controls from the database of the Molecular Medicine Center. SPSS and PRINKE were used for the statistical analysis with a level of significance < 0.05 and confidence interval 95%. The mean age was 63.71±9.35 years; 35(35%) females. Previous myocardial infarction 38(38%); one-vessel – 39(39%); two-vessel - 28(28%); three-vessel disease - 34(34%); 43(43%) with diabetes mellitus; 92(92%) with arterial hypertension; 77(77%) with dyslipidemia; 42(42%) smokers; 25(25%) smokers. The analysis of the genotype and allele frequencies of the studied polymorphisms rs11191548 next to CYP17A1 gene and rs381815 in PLEKH7 gene did not show any significant difference between patients with coronary heart disease and the healthy controls (p>0.05). We studied the link between genes associated with arterial hypertension and multiple metabolic pathways of the steroids and particularly sex hormones (CYP17A1); calcium membrane exchange and intercellular junctions (PLEKHA7). We did not find any significant association between polymorphisms rs11191548 CYP17A1 and rs381815 PLEKHA7 and angiographically proven ischemic coronary heart disease in patients with family history and/or early manifestation. The result is of practical importance both for

studying the genetic aspects of coronary heart disease; for the future direction of studies and for enlargement of the current database.

Scientific publications and presentations:

- Yaneva-Sirakova T, Tzveova R, Kaneva R, et al. The clinical point of view on whether polymorphic variants of CYP17A1 and PLEKHA7 genes can have a role in the development of coronary heart disease. *Cardiovascular diseases*. 2018; 1: 3-7.
- Tzveova R, Yaneva-Sirakova T, Kaneva R, et al. Population study of the frequencies of CYP17A1 rs 11191548 and PLEKHA7 rs 381815 in Bulgarians (Eastern European Population). Eur meeting on Hypertension and Cardio-vascular Protection. Jun 2018. Barcelona, Spain.

Contract D-77/02.05.2017 Evaluation of copy number variations in Bulgarian patients with Parkinson disease

Research team: Assoc. prof. Albena Kirilova Jordanova

- Corr. Member Prof. Latchezar Traykov, MD, PhD, DSc
- Assoc. prof. Shima Mehrabian-Spasova, MD, PhD
- Assist. Maria Petrova, MD, PhD
- Assoc. prof. Margarita Raycheva, MD, PhD
- Kalina Mihova, MSc
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad. Prof Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

RESULTS: The main goal of the current study is to evaluate the frequency of copy number variations in genes associated with Parkinson disease in Bulgarian patients. Altogether 80 patients and 100 healthy controls, matched by age, gender and ethnicity (NC) were recruited, 69 of selected patients were analyzed with MLPA kits P051-D1, P052-D1 Parkinson, P275-C3 MAPT-GRN and P471-A1 EOFAD, and all of them for 6 nucleotide repeat expansion GGGGCC in *C9orf72* gene. In 9 patients (11.6%) were found aberrations by MLPA analyses and one patient has *C9orf72* expansion. In previous studies, small insertions and deletions and point mutations were found in 52% of all patients by next-generation sequencing in genes *LRRK2*, *PINK1*, *PARK7*, *ATP13A2*, *FBXO7*, *PSEN1*, *PSEN2*, *CHMP2B*, *GRN*, *MAPT*, *EIF4G1*, *PARK2*, and *PARK7*. Analysis of big aberrations contribute to a better understanding of the genetic diagnosis in 3 patients and identifying different heterozygous variants in combination in one patient with autosomal recessive inheritance. So the combination of our studies elevates the percentage of patients with clarified genetic diagnosis to 65%. Six nucleotide expansions in *C9orf72* are rarely found in the Bulgarian population. Copy number variations are found in genes *UCHL1*, *PSEN2*, *APP*, and *PARK2*. Our findings contribute to a better understanding of the molecular basis of Parkinson disease and have implications for diagnostic testing and genetic counseling and show distribution of variants associated with PD in the Bulgarian population. Summarizing the results obtained with the data from previous projects allowed us to make a systematic move in the study of PD patients and their genetic counseling and diagnosis.

Scientific publications and presentations:

- Mihova K, Verstraeten A, Theuns J, et al. Targeted genetic analysis of Parkinson disease in Bulgarian patients, Eur Human Genetics Conference, 16-19 Jun 2018, Milan, Italy

Contract D-78/02.05.2017 *In vivo* and *in vitro* studies on novel galantamine derivative with potent anti-acetylcholinesterase activity

Research team: Prof. Irini Atanas Doytchinova - Tsekova, DSci.

- Prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assoc. Prof. Georgi Stavrakov, PhD
- Assoc. Prof. Vessela Vitcheva, PhD
- Assoc. Prof. Rumiana Simeonova, PhD
- Assist. Prof. Iva Valkova, PhD
- Assist. Prof. Denitsa Aluani, PhD
- Assist. Prof. Ivanka Kostadinova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

RESULTS: Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors with dual-site binding are designed to inhibit both catalytic and peripheral anionic sites of the enzyme in order to act as multi-target ligands. Here, we apply a series of *in vivo* and *in vitro* tests on a novel AChE inhibitor with dual-site binding to evaluate the toxicity, anti-AChE activity, antioxidant properties and effects on cognitive functions like training and memory. The novel inhibitor is less toxic than galantamine (GAL) and both have similar antioxidant properties. The anti-AChE tests showed that the novel inhibitor is a better binder to AChE *in vitro* than GAL but *in vivo* performs worse. It crosses the blood-brain barrier easily by passive diffusion but might be too bulky to enter any of the active transport systems and this is a reason for low brain bioavailability. This obstacle should be considered in the design of novel bulky AChE inhibitors with dual-site binding and/or multi-target ligands.

Scientific publications and presentations:

- Simeonova R, Vitcheva V, Kostadinova I, et al. *In vivo* and *in vitro* studies on novel potent acetylcholinesterase inhibitor with dual-site binding for treatment of Alzheimer's disease. Mol. Pharm.

Contract D -79/02.05.2017 Eliciting the production of aryltralin lignans in cell systems *in vitro*

Research team: prof. Iliana Ilieva Ionkova, DSci

- Jancho Zarev, PhD student
- Pavlinka Popova
- Vilma Posheva

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: The aim of this project is to determine the influence of 50, 100 and 150 μ M Methyl jasmonate on the accumulation of biomass and on the production of aryltralin lignans in suspension cultures of *Linum thracicum ssp. multiflorum*. The quantity of podophyllotoxin

(PTOX), 6-methoxy podophyllotoxin (6-MPTOX) and acetyl podophyllotoxin (acetyl PTOX) were examined by LC-MS analysis. Our results showed that the highest amount of biomass (GI 2,53) of the plant cells of *Linum thracicum* ssp. *multiflorum* was observed on 136th h of cultivation in the sample untreated with Methyl jasmonate, while the lowest amount (GI=0.28) was detected on 72th h in the sample treated with 50 μ M Methyl jasmonate. The production of PTOX is increased 5 times by elicitation with 100 μ M Methyl Jasmonate on 48th h from the cultivation of the plant cells, compared to the untreated cultures. The highest concentration of 6-MPTOX (8.5×10^{-5} g/gDW) was observed in 48th h from the development of suspension cultures of *Linum thracicum* ssp. *multiflorum* treated with 50 μ M Methyl Jasmonate. The production of acetyl podophyllotoxin was increased 1.2 times by elicitation with 50 μ M Methyl Jasmonate on 48th h from cultivation of the plant cells, compared to the untreated plant cells. The results of the study indicate *Linum thracicum* ssp. *multiflorum* can serve as an alternative source of production of lignans.

Scientific publications and presentations:

- Ionkova I, Sasheva P, Popova P, et al. Cytotoxic activity of podophyllotoxin and its analogues, produced by plant tissue cultures of *Linum thracicum* ssp. *multiflorum* Degen, elicited with methyl jasmonate, III Int Conference on Natural products utilization: from plants to the pharmacy shelf, 18-21 Oct 2017, Bansko-Bulgaria

Contract D-80/02.05.2017 Possibilities for production of flavonoids from *in vitro* cultures of *Astragalus monspessulanus* L. and determination of their biological activity

Research team: Assist. Prof. Petranka Krumova Zdraveva, PhD

- Prof. Iliana Ionkova, PhD, DSci
- Prof. Iliana Manova, PhD
- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Aleksandar Shkondrov, PhD
- Pavlinka Popova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav St., 1000 Sofia

RESULTS: *In vitro* cultures of *Astragalus monspessulanus* subsp. *monspessulanus*, native to Bulgaria, was established, i.e., shoots, callus, and suspension. Analysis of the flavonoid content of the cultures was made via the HPLC method in comparison with wild grown aerial parts of the same species. Significant differences in the flavonoid composition amongst the *in vitro* cultures were observed. These findings could be used as a basis for further optimization of the culturing conditions, and in particular growth media, in order to obtain high-productivity lines in respect of pharmaceutically significant flavonoids. In our study, we found that in isolated rat liver microsomes, the extract from cultivated *A. monspessulanus* revealed stronger statistically significant antioxidant effect in a model of non-enzyme lipid peroxidation, compared to the effect of wild *A. monspessulanus*. We compared the effects of the cultivated upper part, callus and suspension from *A. monspessulanus* and found that only the aerial part revealed good statistically significant antioxidant effect in a model of non-enzyme lipid peroxidation, similar to those of silymarin, compared to toxic Fe/AA.

Scientific publications and presentations:

- Zdraveva P, Popova P, Shkondrov A, et al. Investigation of *in vitro* cultures of *Astragalus monspessulanus* L. CR Acad Bulg Sci. 2017;70(8):1131-1136.

Contract D-81/02.05.2017 Investigations of closely related and rare for Bulgarian flora species from genus *Astragalus* L.

Research team: Prof. Ilina Nikolaeva Manova, PhD

- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Petranka Zdraveva, PhD
- Assist. Prof. Aleksandar Shkondrov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy and Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2 Dunav St., 1000 Sofia

RESULTS: The flavonoid composition of *Astragalus glycyphylloides* DC. was evaluated. From the methanol extract, obtained from the overground parts of the species a novel natural compound (a flavonol tetraglycoside) was isolated, using column chromatography and HPLC. The results from this study could help in order to elucidate the chemotaxonomic place of *Astragalus glycyphylloides* DC. and to distinguish the evolutionary connection between the investigated species and the closely-related and morphologically similar *Astragalus glycyphyllos* L. The compounds isolated from *A. spruneri* administered alone in an *in vitro* model did not reveal any significant hepatotoxic effects. Using a model with metabolic bioactivation-induced hepatotoxicity, the flavonoids exhibited statistically significant antioxidant and cytoprotective effects. This is a reason to identify the compounds as potential antioxidants and hepatoprotectors.

Scientific publications and presentations:

- Kondeva-Burdina M, Shkondrov A, Simeonova R, et al. *In vitro/ in vivo* antioxidant and hepatoprotective potential of defatted extract and flavonoids isolated from *Astragalus spruneri* Boiss. (Fabaceae). Food Chem Toxicol. 2018;111(3):631-40.
- Shkondrov A, Krasteva I, Pavlova D, et al. Flavonoids in populations of *Astragalus monspessulanus* subsp. *illyricus* in Bulgaria. III Int Conference on Natural Products Utilization. Bansko, Bulgaria. 18-21 Oct 2017
- Kondeva-Burdina M, Simeonova R, Vitcheva V, et al. Pharmacological investigation of *Astragalus spruneri* Boiss. (Fabaceae). III Int Conference on Natural Products Utilization. Bansko, Bulgaria. 18-21 Oct 2017

Contract D-83/02.05.2017 Analytical characterization of some Omega unsaturated fatty acids in food supplements by application of gas chromatographic method

Research team: Prof. Danka Petrova Obreshkova, PhD, DSci

- Assist. Prof. Dobrina Tsvetkova, PhD
- Assist. Prof. Stefka Ivanova, PhD
- Bozhidarka Hadjieva – MU-Plovdiv

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Chemistry, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: The aim of the study is the application of a gas chromatographic method for the separation of fatty acids methyl esters in food supplements. Hydrolysis and methylation of the bound and free forms of the fatty acids are accomplished by transesterification with 14 % methanolic boron trifluoride solution (incubation at 65 °C), extraction with hexane and gas chromatographic analysis at temperature program: 5 min. (140 °C), 4 °C/min. to 240 °C, 20 min. (240 °C), 6 °C/min. to 280°C, 10 min. (280 °C). A gas chromatographic method for the determination of Docosahexaenoic acid is validated and are examined the analytical parameters: linearity, sensitivity, repeatability: $RSD_{\text{internal standard}} = 0.851 \%$, $RSD_{\text{external standard}} = 0.318 \%$. System suitability is confirmed by the absence of a statistically significant difference between data for chromatographic parameter retention time (t_R): $RSD = 0.05 \%$. Data for t_R , areas and content of fatty acids methyl esters in food supplements: Doppelherz aktiv Omega-3 + Vit. E caps., Omega-3, 6, 9 caps., Omega-3 + Vit. E solution, Norwegian Fish Oil 18/12 1000 mg caps. and Omega 3 Forte 1000 mg caps. are determined by the percentage method. The maximum content is for: Methylheptacosapentaenoate (20.58 %), Methylpalmitate (20.35 %), Methyloleate (16.43 %). Methylnonadecanoate (0.3 %), Methylheptadecanoate (0.66 %), Methylpentadecanoate (0.69 %) are at minimum quantity. Methylinoleate is: 58.12 % (Vitaflax oil); 52.68 % (Organic Flax). Methylinoleate is 44.02 % (Linseed oil). System suitability is confirmed by the lack of difference between t_R for Methylheptacosahexanoate ($RSD = 0.05 \%$), Methylheptacosapentaenoate ($RSD = 0.04 \%$); Methylpalmitoleate ($RSD = 0.94 \%$), Methylpalmitate ($RSD = 0.34 \%$), Methyloleate ($RSD = 0.36 \%$), Methylinoleate ($RSD = 0.36 \%$), Methylstearate ($RSD = 2.0 \%$), Methylinoleate ($RSD = 0.39 \%$). The development and validation of the gas chromatographic method has practical application for routine control of the content and quality of Omega unsaturated fatty acids.

Scientific publications and presentations:

- Ivanova SA, Tsvetkova DD, Hadzhieva BR, et al. GC determination of Palmitoleic, Palmitic, Oleic, Linoleic, Stearic and α -Linolenic acids in flaxseed food supplements. Asian Acad Res J Multidiscipl 2018;5(4):51-64.

Contract D-84/02.05.2017 LC-HRMS analytical profile of biologically active secondary metabolites in leaves extract of *Solanum schimperianum* Hochst

Research team: Assist. prof. Yulian Voynikov, PhD

- Assist. prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assoc. Prof. Reneta Gevurenova, PhD
- Assist. Prof. Vesela Balabanova-Bozushka, PhD
- Assoc. Prof. Paraskev Nedyalkov, PhD
- Rajana Dinkova, student
- Stanislav Sotirov, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Sofia, 2 Dunav Str., Sofia 1000

RESULTS: The following three groups of substances were identified in the phytochemical analysis of *Solanum schimperianum*, Hochst, by high-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-HRMS): steroid glycoalkaloids (GA), phenolic acids, and hydroxycinnamic acid amides (HCAAs). Among the GA, solamargine and solanine were identified, as well as the aglycons solanidine, solanopubamine and soladunallinidine. Mass

fragments specific for the spirosolane skeleton were found which allowed for the differentiation of the isobars soladunallinidine and solanopubamine, characterized by a spirosolane and solanidane skeletons, respectively. The major component in the GA fraction - solanopubamine was isolated. 21 phenolic acids and 12 HCAAs were identified. The DPPH and ABTS radical scavenging activities of the *S. schimperianum* leaf extract ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ for DPPH and $IC_{50} = 3.5 \pm 0.3$ for ABTS tests) showed that the glycoalkaloid extract had a 45 and 140-fold higher activity compared to the total methanolic extract, in the DPPH and ABTS antioxidant activity tests, respectively. The total polyphenols content was determined to be $0.40 \pm 0.04 \text{ mg GAE} / 100 \text{ g}$. The extract has moderate acetylcholinesterase inhibitory activity ($36.43\% \pm 7.08\%$) lower than that of the control galantamine.

Scientific publications and presentations:

- Voynikov Y, Fadlelmula N, Yagi S, et al. LC-HRMS profiling of hydroxycinnamic acid amides and steroid alkaloids from leaves extract of *Solanum schimperianum*, Hochst. 3rd Int Conference on Natural Products Utilization; 18-21 Oct 2017; Bansko, Bulgaria.
- Voynikov Y, Nedialkov P, Zheleva-Dimitrova D, et al. LC-HRMS profiling of some steroid alkaloids from leaves extract of *Solanum schimperianum*, Hochst. 10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast Eur Countries; 20-24 May 2018; Split, Croatia.

Contract D-85/02.05.2017 Synthesis, spectral characterization and pharmacological activity of new methoxy-derived aroylhydrazones

Research team: Prof. Georgi Tsvetanov Momekov, PhD

- Assist. Prof. Boryana Nikolova-Mladenova, PhD
- Assoc. Prof. Maya Georgieva, PhD
- Assoc. Prof. Lili Peikova, PhD
- Gabriela Mitev, student
- Elina Petrova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

RESULTS: 9 new methoxy-derived hydrazones were synthesized by condensation in ethanol of 3-methoxysalicylaldehyde, 4-methoxysalicylaldehyde and 5-methoxysalicylaldehyde with the hydrazides 2-methoxybenzhydrazide, 3-methoxybenzhydrazide and 5-methoxybenzhydrazide. The structures of the new hydrazones were confirmed by elemental and thermogravimetric analysis, HR ESI-MS mass, IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy. The molecular properties of the compounds, important for drug pharmacokinetics and biodisposition in the human body, were assessed by the Lipinski's rule of five. In silico evaluation of the Log P value and the remaining parameters of drug similarity, as well as the topological polar surface area reveal that all new hydrazones have balanced lipophilicity and good permeability through the cell plasma membrane. The investigated dimethoxy derivative hydrazones were further tested for in vitro cytotoxicity on a spectrum of human tumor cell lines with different origin and cell type using the MTT-dye reduction assay. The bioassay demonstrated that the introduction of a methoxy group into both the aldehyde and the hydrazide core results in compounds with pronounced cytotoxic activity. The compounds exhibited concentration-dependent antiproliferative activity at low micromolar concentrations against the used human cell lines. The different position of the

methoxy groups changes the activity of the dimethoxy-hydrazones. Compounds 44m, 33m and 43m may be considered as suitable candidates for in-depth studies as well as suitable baseline structures for generating a library of biologically active analogs with antitumor activity.

Scientific publications and presentations:

- Nikolova-Mladenova B, Momekov G. Design, drug-like properties and cytotoxic activity of methoxysalicylaldehyde-based hydrazones. 46 Eur Congress on Drug Synthesis and Analysis. Bratislava, Slovak Republic. Sep 5–8, 2017
- Mitev G, Nikolova-Mladenova B. Synthesis and Characterization of dimethoxy derived hydrazones. Student scientific meeting of pharmacy 2017. Faculty of Pharmacy, MU-Sofia, Sofia, Bulgaria. 4 Nov 2017
- Mitev G, Cytotoxic activity of methoxy-derived hydrazones. II Int Biomedical Congress, Sofia, Bulgaria, 17-19 Nov 2017

Contract 86/02.05.2017 *In vitro* and *in vivo* effects of alcesefolizide (quercetine-3-O- α -L-rhamnopyranozile-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranozile-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranozide) on different models of intoxication

Research team: Prof. Nikolai Damianov Danchev, PhD

- Prof. Iliana Ionkova, DSci
- Prof. Iliana Manova, PhD
- Assoc. Prof. Romyana Simeonova, PhD,
- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Alexander Shkondrov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Dunav Str. 2, Sofia 1000

RESULTS: The hepatoprotective and antioxidant potential of alcesefoliside (AF), isolated from *A. monspessulanus ssp. monspessulanus*, was investigated. Carbon tetrachloride intoxication was induced in rat hepatocytes and pre-incubated with AF and silymarin. *In vivo* experiments were carried out on male Wistar rats, challenged orally with CCl₄ alone and after pre-treatment and followed by curative treatment with AF. The activity of the antioxidant enzymes, together with reduced glutathione (GSH) levels and malonedialdehyde (MDA) quantity were measured. Incubation of the hepatocytes with carbon tetrachloride lead to decreased cell viability and GSH level and increased LDH leakage and MDA production. The pre-incubation of the hepatocytes with AF preserved statistically significantly the cell viability and GSH level and decreased the LDH leakage and MDA production. These findings were supported by the *in vivo* study where CCl₄-induced liver damage was discerned by a significant increase in MDA production as well as by GSH depletion and reduced antioxidant enzymes activity (measured in tissue homogenate). The AF pre-treatment and consecutive curative treatment normalize the activity of the antioxidant enzymes alike, as well as the levels of GSH and MDA. The observed effects were comparable to those of silymarin. In our study, AF showed antioxidant activity both *in vitro* and *in vivo*.

Contract D-87/02.05.2017 Analysis of sesquiterpene lactones in *Arnica* of different origins by gas chromatography-high resolution mass spectrometry

Research team: Assist. Prof. Dimitrina Zhivkova Zheleva-Dimitrova, PhD

- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Assoc. Prof. Niko Benbassat, PhD
- Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD
- Assist. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Liussi Stefanova, student
- Yanitsa Rusenova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, Medical University-Sofia, 2 Dunav str. 1000 Sofia

RESULTS: In this study, we aim at the developing of Gas Chromatography-Orbitrap-High Resolution Mass Spectrometry (GC-Orbitrap-HRMS) strategy for the analyzing of sesquiterpene lactones (STLs) in *Arnica montana* flower heads with a different provenance. Esters of the STLs helenalin (H) and 11 α , 13-dihydrohelenalin (DH) with short-chain fatty acids are considered to be the main active principles of the officinal flower drug. The samples originate from Bulgarian, Polish, Finnish and German cultivated collections and one is purchased in a pharmacy drug store. First, the sample preparation was done according to the European Pharmacopoeia 7.0 (2011). The subsequent solid-phase extraction procedure was performed on Strata C18-E cartridges (Phenomenex, USA). The followed chromatographic determination was carried out by Trace 1310 GC, Exactive Orbitrap GC-MS system (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). The data were processed with Excalibur Software (Thermo Fischer Sci.). Based on the accurate masses and theoretical fragmentations generated with Mass Frontier 7.0 software (ThermoScientific), at least 13 STLs were assessed and quantified, and the fragmentation patterns of both H and DH derivatives were proposed. The highest total amount of STLs was found in the sample from Poland (4.892 mg/g dw), followed by the cultivated on Vitosha Mountain, Bulgaria arnica (4.877 mg/g dw). H was the dominant STL in drugstore arnica (0.110 mg/g dw) and in the sample from Botanical Garden at Joensuu University, Finland (0.549 mg/g dw), while DH-isobutyrate was the major STL in arnica from Poland (0.660 mg/g dw), Botanical Garden at Turku University, Finland (0.245 mg/g dw) and ARBO, Germany (0.405 mg/g dw). The samples from Bulgaria were characterized by a high level of H-isovalerate (0.703 mg/g dw; Vitosha Mountain) and H-tiglate (0.314 mg/g dw; Beglika). In conclusion, the reliable GC-Orbitrap-HRMS method would be important for the quantity and quality monitoring of cultivated and native arnica herbal drugs.

Scientific publications and presentations:

- Toteva V, Russenova Y, Balabanova V, et al. Evaluation of herbal drug quality of *Arnicae* flos based on the analysis of sesquiterpene lactones content by gas chromatography- high resolution mass spectrometric method (GC-HRMS). II Int Biomedical Congress. Sofia, Bulgaria, 17-19 Nov, 2017.
- Rusenova Y, Balabanova V, Benbassat N, et al. GC-HRMS determination of sesquiterpene lactones in *Arnica montana* L. 41st EPSA Annual Congress. 23–29 Apr 2018, Baarlo, Netherlands
- Balabanova V, Benbassat N, Voynikov Y, et al. State of the art method on the base of GC-Orbitrap-HRMS for sesquiterpene lactones in *Arnica montana* L. 10th Conference on

Contract 88/02.05.2017 Study on the neuroprotective effect of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid, isolated from *Geigeria alata* (Asteraceae) against ethanol-induced oxidative stress in rats

Research team: Assoc. Prof. Vessela Biserova Vitcheva, PhD

- Assoc. Prof. Romyana Simeonova, PhD
- Assoc. Prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD
- Assist. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Petar Arnaudov, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2, Dunav Str., 1000 - Sofia

RESULTS: The aim of the current study was to isolate and identify one of the secondary metabolites 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (TCQA) from roots of the Sudanese plant *Geigeria alata*, Asteraceae and to investigate its antioxidant and neuroprotective activity against ethanol-induced brain injury in rats. The experiments are carried out in male Wistar rats. The brain injury was induced by 5-day oral administration of 50 % ethanol (1 mL/100 g, p.o.). The tested compound 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (TCQA), as well as chlorogenic acid (CGA), used as a positive control, has been administered for 14 days alone and in combination with ethanol. The animals in the combination groups have been pre-treated for 9 days with TCQA and CGA and then up to the day 14, ethanol was added to the treatment. Mean body weight and body weight changes have been evaluated before treatment, at day 7 of treatment and at the end of the study (day 14). At the end of the experiment, some urine parameters have been measured, the animals were decapitated and the brains were taken for biochemical assessment. The activity of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), the levels of reduced glutathione (GSH), the quantity of malonedialdehyde (MDA) as well as the activity of the antioxidant enzymes: glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) have been measured spectrophotometrically in the brain tissue. The 5-day oral ethanol administration (50 %) resulted in statistically significantly ($p < 0.05$) increased nNOS activity by 72 %, accompanied by increased MDA production by 48 % and depletion of GSH by 81 %, as well as in decreased antioxidant defense, discerned by reduced activity of GPx, SOD and CAT. These results confirmed that an adequate model of ethanol-induced brain injury has been developed. The TCQA, administered alone did not influence any of the measured parameters. It has to be noted, however, that in the combination group (TCQA + EtOH), the 9-day pre-treatment of the animals with TCQA and its following combined administration with ethanol, prevented the development of ethanol injury. This has been discerned by the restoration to the control levels of all measurement parameters. The effect of TCQA was commensurable with those of the positive control CGA, which antioxidant and neuroprotective effects have been proved. On the basis of our results and under the conditions of this study, a neuroprotective activity of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (TCQA) against ethanol-induced brain injury has been proved. This effect

is most probably due to its antioxidant potential. The effect of TCQA was commensurable with the effect of CGA which neuroprotective activity has been explained with its free-radical scavenging potential as well as with its ability to inhibit the high intracellular calcium levels, generated by the activated glutamate NMDA/NO cascade in the postsynaptic membrane. Our results suggest a similar neuroprotective mechanism for TCQA.

Contract D-89/02.05.2017 Toxicological characterization of extract from *Clinopodium vulgare* (Lamiaceae)

Research team: Assoc. Prof. Romyana Lyubomirova Simeonova

- Assoc. Prof. Vessela Vitcheva, PhD
- Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD
- Assist. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD,
- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Violina Toteva, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology

RESULTS: Water extract from *Clinopodium vulgare* was analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). Based on the MS and MS/MS spectra, comparison with reference standards and literature data, luteolin-7-glucoside, luteolin-*O*-neohesperidoside, luteolin-8*C*-glucoside, apigenin-7-glucoside, naringenin-*O*-hexuronide, isosacuranetin-7-neohesperidoside, together with neochlorogenic, 4-caffeoylquinic, 1,3- and 3,4-dicaffeoylquinic acids were reported in the species for the first time. Clinopodic acids A, B, and C were evidenced; rosmarinic acid was the major compound. The acute and sub-acute toxicity of the extract was determined in two rodent species - mice and rats and two routes of administration - oral and intraperitoneal. The LD₅₀ for intraperitoneal administration of mice is 675 mg/ kg body weight. For rats LD₅₀ = 500 mg/kg body weight. Acute intraperitoneal administration (identical to intravenous application) results in CNS toxic effects. In acute oral administration, LD₅₀ is greater than 2000 mg/kg body weight for both species. All animals remain alive up to 14 days of observation, with no change in behavior and diet. In the 14-day oral administration of the extract at a dose of 100 mg/ kg, no toxic effects were observed under the experimental conditions. There are no histomorphological data for organ damage. No changes in complete blood count, biochemistry, and in urine from experimental animals were observed.

Contract D-90/02.05.2017 Synthesis of 1-substituted methylxanthine derivatives, molecular docking, and evaluation of possible acetylcholinesterase activity

Research team: Prof. Alexander Borisov Zlatkov, PhD

- Prof. Irini Doytchinova, PhD
- Assoc. prof. Мая Георгиева, PhD
- Assoc. prof. Virginia Tzankova, PhD

- Assoc. prof. Rumiana Simeonova, PhD
- Assoc. prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assoc. prof. Vesela Vicheva, PhD
- Assist. prof. Lilia Dimitrova, PhD
- Assist. prof. Iva Valkova, PhD
- Assist. prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical chemistry

RESULTS: Series methylxanthine derivatives were synthesized in our laboratory. The structures of the obtained molecules were proven by corresponding spectral data from appropriate IR and ¹H NMR methods. The purity of the compounds was elucidated by their melting points and TLC characteristics. For the purpose of the investigation, the obtained structures were evaluated for possible acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity through *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods. As a model compound for the preliminary docking evaluations was applied the methylxanthine derivative 1-(3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)-3,7-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione (LA₁). The performed docking identified, that the binding mode of the evaluated LA₁ to rhAChE depends on the protonation of the molecule where when protonated the xanthine moiety of the structure goes deep into the catalytic center of the enzyme, and the piperazine fragment stays in PAS, while for the non-protonated form the superposition is reversed. In addition, the corresponding *in vitro* AChE inhibitory activity was evaluated, applying two methods – the colorimetric Ellman method and the isothermal titration calorimetry (ITC). From the experiments based on the Ellman's method was determined that compounds LA₁ and LA₇ express the highest affinity towards AChE, with IC₅₀ (mM) values of 0,708 and 0,299, respectively, comparable to the one for galantamine used as control. From the performed ITC analysis was determined that compound LA₁ shows highest AChE effect, binding with the enzyme in relation 1:1, which confirms the results from the preliminary molecular docking. In addition the corresponding *in vitro* hepatotoxicity for all synthesized molecules and *in vivo* acute toxicity (expressed as LD₅₀) for the most active derivatives, as well as the corresponding AChE and BChE activity. The evaluation of the parameters included in the models for assessment of hepatotoxicity of newly synthesized molecules was determined that from the tested methylxanthine derivatives compounds LA₆ and LA₁₂ express the highest hepatotoxicity on isolated rat hepatocytes, while compounds LA₃ and LA₉ – lowest hepatotoxic effect on all followed parameters. The performed *in vitro* experiments demonstrated that compound LA₇ is with high acute toxicity, but on the other hand gives comparable inhibitory activity on AChE with the reference scopolamine, while in the evaluation of the effect on BChE was determined that LA₇ expresses low affinity. The obtained results point that compounds LA₁ and LA₇ are prospective leaders for future optimizations in the design of structures with possible acetylcholinesterase activity containing a methylxanthine moiety.

Scientific publications and presentations:

- Hristova M, Atanasova M, Valkova I, et al. Molecular docking study on 1-(3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)-3,7-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione as acetylcholinesterase inhibitor. CBU Int Conference on innovations in science and education 21-23 Mar 2018, Czech republic

Contract 91/02.05.2017 Synthesis, characterization, chemical properties and evaluation of the possible neuroprotective effects and human recombinant MAOB inhibition of new hydrazidehydrazones of caffeine-8-thioglycolic acid

Research team: Assoc. Prof. Boyka Georgieva Tsvetkova, PhD

- Prof. Alexander Zlatkov, PhD
- Assoc. Prof. Maya Georgieva, PhD
- Asst. Prof. Javor Mitkov, PhD
- Assoc. Prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Alexandra Kasabova
- Atanas Lukarski
- Yusef Sultan

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Pharmacy, 2 Dunav str., 1000 Sofia, BULGARIA

RESULTS: Thirteen new derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid have been synthesized. The structures of the obtained products were established by FTIR-, UV-, LC-MS, and ¹H NMR spectral data. In order to estimate the drug-likeness of compounds, a theoretical calculation of some molecular descriptors was made using two approaches: the Lipinski's Rule of Five limitations and the OSIRIS Property Explorer evaluation score as a prediction for pharmacokinetic properties. We investigate the *in vitro* effects of these derivatives on human neuroblastoma cell line SH-SY5Y as well as their possible inhibitory effects on human recombinant MAOB enzyme. The effects were compared to those of caffeine-8-thioglycolic acid, caffeine, and Deprenyl. On human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, all of the derivatives show statistically significant neurotoxic effects, compared to the control (non-treated cells). Three of the compounds J α -6, J α -7 and J α -9 had lower neurotoxic effects, then the others and were investigated for possible neuroprotective effects on 6-OH-dopamine (6-OHDA)-induced oxidative stress. On this model of toxicity, only J α -7 and J α -9 (at concentration 100 μ M) revealed statistically significant neuroprotective effects, compared to 6-OHDA. The effects were similar to those of caffeine-8-thioglycolic acid and caffeine. On SH-SY5Y cell line, in conditions of 6-OHDA-induced oxidative stress, J α -6 had no statistically significant protective effects, compared to 6-OHDA. All derivatives (at concentration 1 μ M) were an exam for possible inhibitory activity on human recombinant MAOB enzyme. A good statistically significant inhibitor activity revealed J α -7 and J α -9. They inhibit hMAOB activity with 29 % and 36 %, closer to the activity of Deprenyl, which inhibit hMAOB activity with 42 %, compare to pure hMAOB. We suggest that the neuroprotective effects of J α -7 and J α -9 might be due to possible inhibition of hMAOB, which catalyze the metabolism of 6-OH-dopamine to neurotoxic p-quinone, which produced ROS and damaged the nerve cells.

Contract D-92/02.05.2017 Antioxidant protection of quercetin, encapsulated in polysaccharide nanoparticles in vitro models of oxidative stress

Research team: Assoc. Prof. Virginia Yordanova Tzankova, PhD

- Prof. Krassimira Yoncheva, PhD
- Prof. Nikolay Danchev

- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Borislav Tzankov, PhD
- Assist. Prof. Denitza Aluani, PhD
- Yordan Yordanov, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dunav 2 str., 1000 Sofia

RESULTS: The main goal of this project deals with the development and evaluation of the safety profile of chitosan/alginate nanoparticles as a platform for delivery of natural antioxidant quercetin. The nanoparticles were prepared by varying the ratios between both biopolymers giving different size and charge of the formulations. The biocompatibility was explored *in vitro* in cells from different origin: cultivated HepG2 cells and isolated primary rat hepatocytes. The antioxidant properties of the developed quercetin-loaded system were explored in different cell models of oxidative stress. The protective effects of quercetin-loaded nanoparticles were investigated in the models of H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells and in tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in isolated rat hepatocytes. The results provide useful information about the lack of toxicity of chitosan/alginate nanoparticles and they could be considered as a safe drug-delivery carrier for quercetin against oxidative stress associated injuries.

Scientific publications and presentations:

- Yordanov Y, Tzankova V, Aluani D, et al. Encapsulated Quercetin Provides High Antioxidant Protection in Oxidative Stress Models in Vitro and in *Drosophila melanogaster* In Vivo. World Summit in Toxicology, 11-12 June 2018 Rome, Italy

Contract D-93/02.05.2017 Synthesis of N-pyrrolyl hydrazide-hydrazones and evaluation of their possible MAO-B inhibitory effect

Research team: Assoc. prof. Maya Boyanova Georgieva, PhD

- Prof. Alexander Zlatkov, PhD
- Assoc. prof. Lily Peikova, PhD
- Assoc. prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD,
- Assist. prof. Stanislava Vladimirova, PhD - UCTM
- Diana Tzankova, PhD student
- Maria Hristova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

RESULTS: The aim of the research is the synthesis of new N-pyrrolyl hydrazide and four new hydrazones and preliminary evaluation of their application using two approaches: drug-likeness evaluation of with Lipinski's Rule of Five and *in silico* prediction of the possible pharmacological effect of the newly synthesized structures. In addition, the obtained derivatives will be evaluated for possible inhibitory activity on recombinant human MAO-B. In order to achieve this goal, the classical Paal-Knorr cyclization approach was applied for obtaining the target N-pyrrolyl hydrazide. Further, in micro synthesis apparatus, the four new hydrazones were synthesized. The structures of the new compounds were elucidated with the corresponding IR and ¹H NMR spectral data, and their purity was proven by the respective melting points and TLC characteristics. Lipinski's Rule of Five was applied for preliminary evaluation of the drug-likeness and pharmacokinetic characteristics for the target molecules. It was determined that

compounds Ia-c and IIa-c follow Lipinski's limitations. This was confirmed by the corresponding theoretical values for % ABS. Applying readily to use *in silico* screening approaches for prediction of the possible pharmacological effects of the tested hydrazide-hydrazones was determined that all compounds express high activity as GPCR ligands and enzyme inhibitors, whereas with the highest activity are outlined IIIa and IIIb. In addition series of analogs to the newly synthesized N-pyrrolyl hydrazide hydrazones were evaluated for possible inhibitory activity towards human recombinant MAO-B. From the obtained results was concluded that from the tested groups, compounds 11 and 11l from I-st group and 12 and 12l from II-nd group exhibit good inhibitory activity against human recombinant MAO-B enzyme.

Scientific publications and presentations:

- Tzankova D, Peikova L, Vladimirova S, et al. Synthesis, drug-likeness estimation and prediction of possible pharmacological effects of new pyrrole hydrazones. Scripta Scientifica Pharmaceutica, 2017;4(2):27-33.
- Tzankova D, Georgieva M, Vladimirova S. N-pyrrolyl hydrazide-hydrazones as a target molecule for fighting neurodegenerative diseases. XIV Scientific poster session for young scientists, PhD students and students in UCTM. Sofia, Bulgaria, 19 May 2017
- Tzankova D, Peikova L, Vladimirova S, et al. Synthesis and structural characterization of pyrrole derivatives as possible selective MAO-B inhibitors. Fourth Pharmaceutical Business Forum and Scientific & Practical Conference "Innovation and Prospects in Pharmaceutical Practice". Varna, Bulgaria, 27-29 Oct 2017

Contract D-94/02.05.2017 Development of mesoporous silica nanoparticles as a drug system for pramipexole

Research team: Prof. Krassimira Pavlova Yoncheva, PhD

- Prof. Nikolai Lambov, PhD
- Assoc. Prof. Virginia Tzankova, PhD
- Assist. Prof. Borislav Tzankov, PhD
- Yordan Yordanov, PhD student
- Assist. Prof. Denitza Aluani, PhD,

Organization unit: Medical University of Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics

RESULTS: Pramipexole is a dopamine agonist that is applied in the treatment of Parkinson disease. The administration is often related to central or peripheral dose-dependent side effects. The occurrence of side effects could be overcome by encapsulation of pramipexole in drug delivery systems with sustained release, e.g. nanoparticles. However, pramipexole is a hydrophilic drug which requires specific drug loading procedure as well as appropriate modification of nanoparticles, which might hinder fast drug release. In the present pramipexole was loaded in mesoporous silica nanoparticles MCM-41 by incubation method in a water medium. XRD and nitrogen physisorption revealed that the drug was successfully encapsulated in the mesopores of the silica carrier. It was found that the optimal initial ratio between pramipexole and the mesoporous silica was 1:1. Transmission electron microscopy showed that the drug loading did not change the mesoporous structure. Further, the drug-loaded nanoparticles were coated with sodium alginate, chitosan or their combination, aiming to modify the drug

release rate. The data showed that the coating decreased the initial burst release of pramipexole in two media (pH 1.2 and 6.8). The protective effects of free and encapsulated pramipexole were evaluated in a model of H₂O₂-induced oxidative stress damage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Pramipexole loaded into nanoparticles possessed significantly higher protection against oxidative damage compared to free drug. The strongest protective effects demonstrated pramipexole loaded in single chitosan nanoparticles or double-coated chitosan/alginate nanoparticles, which revealed their potential as drug delivery systems for pramipexole.

Scientific publications and presentations:

- Aluani D, Tzankov B, Yordanov Y, et al. Pramipexole loading in mesoporous silica nanoparticles protect the human neuroblastoma SH-SY5Y cells from oxidative damage in vitro. 19 Int Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, Sofia, 21-22 Nov 2017
- Tzankov B, Spassova I, Yoncheva K, et al. Development and physico-chemical characterization of pramipexole loaded MCM-41 mesoporous particles as drug delivery system. 11th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, 19-22 Mar 2018

Contract D-95/02.05.2017 Experimental investigation of anti-tumor/antiproliferative activity of almiral solution for injection

Research team: Assoc. Prof. Niko Yosif Benbasat, PhD

- Assist. Prof. Lyubomir Marinov, PhD
- Assist. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Assoc. Prof. Stoyan Shishkov, PhD – SU “St. Kliment Ohridski”
- Assist. Prof. Anton Hinkov, PhD - SU “St. Kliment Ohridski”
- Assist. Prof. Kalina Shishkova, PhD - SU “St. Kliment Ohridski”
- Assist. Prof. Daniel Todorov, PhD - SU “St. Kliment Ohridski”
- Petiya Angelova, PhD student
- Prof. Reneta Toshkova, PhD – BSA
- Assist. Prof. Ani Georgieva, PhD - BSA

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy

RESULTS: The ability of tumor cells to penetrate and destroy basal membranes and adjacent tissues plays a central role in the complex multi-stage metastasis process. The studied substances show varying degrees of anti-tumor / antiproliferative activity to the human tumor cell lines used [(cervical adenocarcinoma (HeLa), colorectal adenocarcinoma (HT-29) and breast cancer (MCF-7)]. Diclofenac reduces cellular proliferation (vitality) in all three human tumor lines (MCF-7, HT-29, HeLa) detected by an MTT test. The effect of Diclofenac is time-dependent and dose-dependent. It achieves anti-tumor / antiproliferative efficacy through induction of apoptosis in treated cells, proven by fluorescence assay methods. The excipients tested were not toxic to MCF-7, HT-29 and HeLa tumor cells at the investigated concentrations corresponding to the concentrations in the commercial preparations. The observed single, decreased or elevated values of vitreal tumor cells are below 10% (values in the biological assays considered to be anti-proliferative /antitumor/ cytotoxic effect are about and above 30%). Further detailed studies of various agents are needed on their antitumor effects in an extended spectrum of human tumor cell lines in order to more accurately determine their potential anti-tumor effects.

Contract D-97/02.05.2017 Relationship between periodontal diseases and rheumatoid arthritis. Clinical, immunological and microbiological studies

Research team: Assoc. Prof. Theodora Nikolaeva Bolyarova-Konova, DDM, PhD

- Prof. Zlatimir Kolarov, DM, DSci
- Prof. Maria Nikolova, DM, DSci - NCIPD
- Radoslava Grozdanova, PhD - NCIPD
- Vladimir Tolchkov, PhD - NCIPD
- Yana Zdravkova, DM
- Lubomir Stefanov, DDM
- Gergana Christova, DDM

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Periodontology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia.

RESULTS: The aim was to search for a relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis (RA) based on clinical and laboratory characteristics. 81 patients of average age 55,23 (SD ± 10,90) have been involved in the study, divided into three groups: Group I – patients with periodontitis and osteoarthritis – 26 people; Group II – patients with periodontitis and RA – 30 people; Group III – patients with periodontal health and RA – 25 people. We applied to all patients: methods for diagnosing RA and periodontitis; determination of IgM-RF and anti-CCP (Anti-cyclic citrullinated peptide antibody) by ELISA in gingival crevicular fluid, peripheral blood and in 6 patients – in synovial fluid; determination of the periodontopathogens' presence in subgingival plaque by Polymerase chain reaction. We found in patients in group II higher activity and severity of periodontitis, estimated by higher values of: mean pocket depth (PD), bleeding on probing, PISA (Periodontal Inflamed Surface Area), a significantly more frequent *T. denticola* presence in subgingival plaque compared to patients in group I. In patients with periodontitis and *P. gingivalis* and *T. denticola* presence in subgingival plaque we found significantly higher: number of teeth with deep periodontal pockets, PD, PISA, clinical attachment loss, more frequent furcation lesions than patients with periodontitis and missing these microorganisms in subgingival plaque. We identified male gender, age, and smoking as risk factors for the periodontitis severity. We found a significant correlation between the number of lost teeth and DAS28 CRP Activity of RA. We confirmed a relationship between periodontitis and RA based on higher periodontitis clinical indicators and more frequent *T. denticola* presence in subgingival plaque in patients with periodontitis and RA compared to patients with periodontitis without RA. We found the dependence of periodontal parameters on the periodontopathogens presence and risk factors. We assume that the treatment of periodontitis would contribute to controlling of RA.

Scientific publications and presentations:

- Bolyarova-Konova T, Stefanov L. Relationship between periodontal disease and rheumatoid arthritis. Gen medicine 2017;XIX(2):31-40.
- Tolchkov V, Stefanov L, Christova G, et al. Detection of species of the oral anaerobic microflora using PCR. 16th National Congress on Clinical Microbiology and Infections, Sofia, 10-12 May, 2018, 67-68

Contract D-115/02.05.2017 Investigation of rs1799782 and 25487 polymorphisms in XRCC1 gene as factors for the development of dermatomyositis in adults

Research team: Assoc. Prof. Lyubomir Assenov Dourmishev, MD, PhD

- Prof. Radka Kaneva, MD, PhD
- Maria Hristova, MD, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Dermatology and Venereology, 1 Georgi Sofijski Street, 1431 Sofia

RESULTS: Altogether 30 patients with DM as well as 30 healthy controls were analyzed by real-time Taqman analysis. A higher frequency of the XRCC1 399Arg/Arg genotype was found among the DM patients (48.5 vs 38.4%, OR 1.5, 95% CI 0.7-3.4) but not among the SLE ones. No association was found with the clinical parameters of the diseases. The polymorphism XRCC1 Arg194Trp showed association neither with the diseases nor with their clinical parameters.

MEDICO-CLINICAL AREA “GRANT 2016”

Contract 9/2016 Contemporary trends in conventional and molecular methods in the species identification of microorganisms causing vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis and their chronic forms

Research team: Assoc. Prof. Vessela Vaskova Raykova, MD, PhD

- Assist. Radoslav Baykushev
- Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, Zdrave str. 2, Sofia 1431

RESULTS: The objective of this study was to apply PCR-based method for detection of *Candida* spp. and BV-associated organisms in symptomatic and asymptomatic women and to assess the need of PCR in the diagnostic algorithm of these conditions. Two vaginal samples were taken from 98 women (74 symptomatic, 24 controls). Amsel criteria and Nugent scoring were used together with tests such as: vaginal pH, Gram staining, routine culture, culture on dextrose agar with Gentamycin and Chromagar candida, and PCR for identification of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Eggerthella-like bacterium*, *Leptotrichia*, BVAB1, BVAB2, and *Megasphaera* type1. In the symptomatic group 17 swabs were with vulvovaginal candidiasis (VVC); 24 with BV, 8 with intermediate BV, 13 with co-infections, and 12 with other infections. In the control group 2 swabs were with VVC, 1 with BV and 1 with other infection. Using PCR in the group with complaints *G. vaginalis* was found in 59 samples (79.7%), *A. vaginae* in 21 (28.4%), *Eggerthella-like bacterium* in 15 (20.3%), *Leptotrichia* in 21 (28.4%), BVAB1 in 3 (4.1%), BVAB2 in 16 (21.6%), *Megasphaera* type1 in 25 (33.8%). In the control group *G. vaginalis* was identified in 4 samples, *A. vaginae* in 2, PCR for other bacteria remained negative. *Eggerthella-like bacterium*, *Leptotrichia*, BVAB2, and *Megasphaera* type1 could be used as strong markers of BV meanwhile *G. vaginalis* could not. PCR-based technique is sensitive and specific, but a combined approach is needed in the diagnosis of vaginal discharge conditions in which pathogens such as fungi, aerobe, anaerobe bacteria or different their combinations could be reason for the disease.

Scientific publications and presentations:

- Raykova V, Ovnarska D, Baykushev R. The role of probiotics in the therapeutic scheme of bacterial vaginosis. Med Rev. 2016;52(5):29-33.

Contract 22/2016 Clinical significance of serum hepcidin in inflammatory and tumor bowel diseases

Research team: Assoc. Prof. Milena Georgieva Velizarova, MD, PhD

- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Prof. Kamen Tzatchev, MD, PhD, DSci
- Prof. Ognyan Georgiev, MD, PHD

- Prof. Dyana Stefanova-Petrova, MD, PhD, DSci
- Assist. Radoslava Tzrancheva, MD
- Academic, Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Faculty of Medicine, Dept. of Clinical laboratory and clinical immunology, G. Sofiyski str. 1, Sofia 1431

RESULTS: During this project we used different methodological approaches for the diagnosis of inflammatory and tumor bowel diseases and assessment of iron disorders in the included patients. We used immunological ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method with formation of specific complex antigen-antibody, detected spectrophotometrically for quantification of serum hepcidin and interleukin-6 in patients with inflammatory and tumor bowel diseases. Obtained results were compared with control group, from previous studies. C-reactive protein was evaluated by turbidimetric method (for inflammation evaluation in ulcerative colitis, Cron's disease and tumor bowel diseases). The same method was used for quantification of transferrin and soluble transferrin receptors (for evaluation of iron metabolism disorders). Obtained results were compared with control group, from previous studies. We used immunological CLIA (Chemiluminescence immuno assay) method for assignation of serum ferritin concentrations (for evaluation of level of stored iron in patients with inflammatory and tumor bowel diseases). We evaluated 49 patients, diagnosed with inflammatory and tumor bowel diseases by specialist – gastroenterologist in University hospital "Aleksandrovska", Dept. of Gastroenterology and with iron homeostasis disorders, evaluated by the following parameters: red blood cells count, MCV, MCH, MCHC, hemoglobin, reticulocytes count, hemoglobin concentration in reticulocytes, C-reactive protein, serum iron and total iron binding capacity, interleukin-6, serum transferrin, ferritin and soluble transferrin receptors, outside the reference ranges by gender and age. The results were processed through the appropriate statistical methods to determine significance. Included patients were with average age, separated by gender: males 51.9 ± 3.1 , and females 52.1 ± 2.1 . We established statistically significant increased serum hepcidin concentrations in inflammatory and tumor bowel diseases patients ($71.1 \pm 10.6 \mu\text{g/l}$) compared to the control group ($21.5 \pm 2.1 \mu\text{g/l}$), $P < 0.001$. Serum IL-6 levels were statistically increased in inflammatory and tumor bowel diseases patients ($10.6 \pm 3.4 \text{ pg/ml}$) compared to healthy individuals ($1.5 \pm 0.7 \text{ pg/ml}$), which confirmed participation of inflammatory cytokines in hepcidin secretion, $P < 0.001$. Quantification of hemoglobin in reticulocytes in inflammatory and tumor bowel diseases patients ($22.5 \pm 0.9 \text{ pg}$) showed statistically decreased levels, caused by lower iron because of inflammation, compared to control group ($30.9 \pm 2.1 \text{ pg}$); $P < 0.001$. Ferritin in serum in inflammatory and tumor bowel diseases patients ($67.6 \pm 17.5 \text{ ng/ml}$) showed considerably decrease compared to control group ($198.7 \pm 21.4 \text{ ng/ml}$), $P < 0.001$. We found significant negative correlation between serum hepcidin and ferritin levels in inflammatory and tumor bowel diseases patients ($r = -0.718$; $P < 0.05$). Correlation between serum hepcidin and transferrin in patients with inflammatory and tumor bowel diseases ($r = 0.733$; $P < 0.001$) was positive. Quantified hepcidin correlated positively to IL-6 levels in inflammatory and tumor bowel diseases ($r = 0.883$; $P < 0.001$). Serum hepcidin in inflammatory and tumor bowel diseases ($r = 0.659$; $P < 0.005$) correlates to soluble transferrin receptors. We establish negative correlation between hepcidin and serum iron levels in patients with inflammatory and tumor bowel diseases ($r = -0.669$; $P < 0.001$). Correlation between hepcidin and hemoglobin in reticulocytes ($r = -0.742$; $P < 0.001$) showed negative significance. We found a statistically significant increased serum hepcidin in patients with inflammatory and tumor bowel diseases. This is caused by involvement of inflammatory cytokines (interleukin-6) in hepcidin

synthesis regulation. Levels of hepcidin determine redistribution of iron between macrophages and parenchymal cells and therefore may have leading role for progression of organ damage. The concentration of hepcidin is important to individualize therapy of anemia. Hepcidin levels determine the effectiveness of treatment of anemia.

Scientific publications and presentations:

- Manolov V, Velizarova M, Georgiev O, et al. Hepcidin in some diseases with impaired iron homeostasis. 10th National Clinical Laboratory Conference. 29.09-01.10.2016, Golden Sands
- Velizarova M, Manolov V, Georgiev O, et al. Evaluation of serum hepcidin concentration in inflammatory bowel diseases and intestinal tumor diseases. 12th Euro Global Gastroenterology Conference (Gastro Congress 2017) Sep 11-12, 2017 Paris, France.
- Velizarova M, Manolov V, Vasilev V, et al. Serum hepcidin quantification in inflammatory bowel diseases. 22nd Congress of the EHA Jun 22-25, 2017 Madrid, Spain.
- Velizarova M, Manolov V, Georgiev O, et al. Quantification of serum hepcidin in inflammatory bowel diseases. 22nd Eur Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC – EFLM) & 25th Meeting of BCLF Jun 11-15, 2017 Athens, Greece.
- Manolov V, Petrova J, Hadjidekova S, et al. Serum hepcidin quantification in stroke in β -thalassemia and rheumatoid arthritis patients. *Austin J Cerebrovasc Dis Stroke*. 2017;4(2): 1056.
- Manolov V, Georgiev O, Petrova J, et al. Iron homeostasis in inflammatory bowel diseases. *MRJMMS* 2017;5(3):123-125.

Contract 28/2016 Clinical and demographic characteristics and their relationship to some biomarkers of systemic inflammation in patients with asthma-COPD overlapping syndrome

Research team: Prof. Vasil Dimitrov Dimitrov MD, PhD

- Assoc. Prof. Maria Staevska-Kotasheva, MD, PhD
- Assist. Denislava Nedeva, MD
- Assist. Elena Petkova, MD
- Assist. Anna Dimitrova, MD, PhD student
- Assist. Adelina Tsakova, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Centre of Allergology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: Total of 66 patients were included in the project and they were divided into three groups-patients with asthma (Asth), with COPD (COPD), and with asthma-COPD overlap (ACO), the number of the patients within each group is 28, 16 and 22 respectively. Their demographic and clinical characteristics, along with the level of low-grade systemic inflammation were investigated.

There were significant difference between the mean age of each of the three groups ($p=0.000248$), the patients with ACO and COPD are older compared to these with asthma only. There was no significant difference with regards of sex distribution among the groups. The number of hospitalizations per year were significantly higher for the patients with COPD (2.5625 ± 1.209) and ACO (2.04545 ± 0.99892) and significantly rare in Asth group

(1.67857±0.6696) (p=0.01397). There is no significant difference between the ACO and COPD groups (p=0.158). Smoking, evaluated as pack years appears to be a risk factor for asthma-COPD development (p=0.000357) for the patients with asthma only. The use of oral corticosteroids is more frequent in the groups with asthma and ACO, compared to the group with COPD only. The frequency of sensibilization to inhalant allergens is equal among the patients with ACO -54% (12 of 22) and respectively 50% (14 of 22) in asthma patients, where all ACO patients with atopy have sensibilization to at least one perennial allergen (dust mites, mold, fungi), compared with 78% (11 of 14) of asthma patients. With regards of insulin resistancy and body mass index (BMI), no significant differences were found between the three groups (respectively p=0.6891 and p=0.226), but ACO patients have the highest mean BMI and HOMA index. Of the investigated biomarkers for systemic inflammation, highest values of TNF-alpha and IL-6 were measured in COPD groups as expected, respectively 6.09 and 5.89, and for IL-1beta in ACO group, respectively 3.71. No significant differences were found for none of the three parameters among the groups (TNF-alpha, p=0.926; IL-6, p=0.392, IL-1beta, p=0.465). As summary of all performed investigations, it can be concluded that the patients with asthma-COPD overlap have the highest risk for Metabolic syndrome development, as the latter could be a risk factor for ACO development for the patients with asthma.

Scientific publications and presentations:

- Nedeva D. Asthma-COPD overlap syndrome. Allergies, Hypersensitivity and Asthma 2016;13 (2):73-8

Contract 37/2016 Associations between hypersensitivity to food allergens and polymorphism in the HLA-DRB1 locus

Research team: Assoc. Prof. Ivan Dimitrov Dimitrov, PhD

- Prof. Irini Doytchinova-Tsekova, PhD, DSci
- Tanya Kadiyska, PhD
- Assoc. Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD
- Michaela Mladenova, student
- Ventsislav Yordanov, PhD student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Chemistry, 2 Dunav str., 1000 Sofia

RESULTS: A database consisting of 30 patients sensitive to food, inhalant and poison allergens was compiled. The patients were genotyped to HLA-DRB1 alleles. Alleles HLA-DRB1*14:19/14:21 were detected in three of them. Two of carriers were 6- and 14-month old boys and they showed allergy to cow's milk proteins Bos d5 (beta-lactoglobulin) and Bos d6 (bovine serum albumin). The third one, a five-year-old boy, has no allergy to cow's milk. The structure of HLA-DRB1*14:19/14:21 alleles are close to that of HLA-DRB1*03:01 allele. The HLA-DRB1*03:01 allele is found to be protective to cow's milk allergy. *In silico* enzyme hydrolysis of Bos d5 and Bos d6 was performed by three digestive enzymes – pepsin, trypsin and chymotrypsin. The peptide nonamers originating from Bos d5 and Bos d6 and binding to HLA-DRB1*14:19/14:21 and HLA-DRB1*03:01 were identified. Practically, after digestion by pepsin, trypsin and chymotrypsin, no binders to HLA-DRB1*14:19/14:21 and HLA-DRB1*03:01 remain. The concentration and activity of digestive enzymes in infants are lower

than those of adults. As DRB1*03:01 is found to be protective against cow's milk allergy, we conclude, by analogy, that HLA-DRB1*14:19 and *14:21 are protective as well. The observed milk allergy in the young patients from the present study rather is due to age-connected low concentration and activity of digestive enzymes than to HLA specificity. The information about the HLA specificity of the rest of the patients in the study was insufficient to determine any association between food allergens and HLA-DRB1 polymorphism.

Contract 57/2016 Role of Immunogenetic Biomarkers in Patients with Oral Preneoplastic Lesions and Oral Squamous Cell Carcinoma

Research team: Assoc. prof. Elitsa Georgieva Deliverska- Aleksandrova, PhD, DMD

- Assoc. prof. Milena Shivarova, PhD, MD
- Prof. Radomir Ugrinov, PhD, DMD, DSci
- Prof. Elisaveta Naumova, PhD, MD, DSci
- Assist. Prof. Hristo Stoyanov, DMD
- Assist. Prof. Lutchezar Petkov, DMD
- Velizar Shivarov, PhD, MD - University Hospital "Sofamed"
- Ivan Pavlov, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental medicine, Dept. of Oral and Maxillofacial surgery, G. Sofiyski 1 str., Sofia 1431

RESULTS: The aim of our study was to analyze associations of MICA polymorphism with oral squamous cell carcinoma (OSSC). Twenty seven patients with histologically proven OSSC were included in the study. The majority of patients had G2-G3 tumors according to Anneroth's classification. The control group included healthy subjects from the Bulgarian population. MICA genotyping was performed by PCR-SSO kit (LABType SSO MICA, OneLambda). Our results showed statistically significant protective association for MICA*12:01 allele ($P < 0.05$, OR-0.07), encoding a full length protein. Interestingly this allele had a higher frequency in the healthy Bulgarian population compared to other European populations. With the highest frequency in patients with OSSC was observed MICA*08:01 allele, encoding truncated protein. However the difference with the control group was with a borderline significance ($P = 0.053$). Although our data are preliminary considering the small number of patients analyzed, the associations observed support the model that alleles encoding truncated, ectopic and soluble MICA molecules play an important role in OSSC by down regulation of NKG2D on NK and CD8+ T cells leading to aberrant immunological surveillance.

Scientific publications and presentations:

- Al Hadra B, Ivanova M, Deliverska E, et al. Role and Characteristics of MICA in Cases of Oral Squamous Cell Carcinoma. J Zdrave i Nauka Jun 2017, p 2-6
- Al Hadra B, Deliverska E, Stoyanov H, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. 31st EFI & 25th DGI Joint Meeting, 30.05-03.06.2017, Mannheim/Heidelberg
- Al Hadra BN. Diploma thesis "Study on MICA polymorphism I oral squamous cell carcinoma", Nov 2016.
- Deliverska E, Ivanova M, Stefanov L, et al. MICA as a Biomarker of Predisposition to Oral Squamous Cell Carcinoma. 29th Eur Congress of Pathology, Pathology for patient Care. 2-6 Sep, 2017, Amsterdam

Contract 60/2016 Evaluation of reference intervals of ceruloplasmin oxidative activity in Bulgarians. Copper status – new laboratory aspects in patients with Wilson's disease

Research team: Assoc. Prof. Bisera Dimitrova Atanasova, PhD

- Irena Ivanova, MD, PhD
- Assist. Prof. Anna Kostadinova, MD
- Sonya Dragneva, MD, PhD
- Tanya Petkova, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, University Hospital "Alexandrovska", Dept. of Clinical Laboratory

RESULTS: Characterization of copper status in the body means the ability to measure copper-related metrics. The most commonly used laboratory indicator for this is serum / plasma copper concentration. The vast majority (70-95%) of copper (Cu) is in a complex with a specific protein - ceruloplasmin (Cp). Cp can be determined as a concentration (iCp g / L) or its oxidase enzyme activity (eCp IU / L) could be measured. Measurement of eCp provides information on the functional capacity of Cp and has greater specificity and sensitivity than iCp in diagnosis of congenital copper exchange defects, such as Wilson's disease (WD). For determination of eCp reference ranges in Bulgarians, totaly 42 patients (male: female = 16: 26; age 43 ± 13 years) were studied. The measurement of eCp was done by ABX Pentra; automated enzymatic method with chromogen substrate o-dianisidine. The REFVAL program was used. The study conducted totally 27 patients with WD with primarily hepatic impairment (male: female = 13: 14 males; age 38 ± 12 years) and 21 healthy controls (male: female = 10: 11; age 43 ± 8 years). Serum copper (sCu), zinc (sZn) and iron (sFe), iCp, transferrin (Tf), ferritin (Fer) and Cp / Tf ratio were established. We evaluated following reference limits for eCp in Bulgarians: 82-144 IU / L. It was established also significant difference between WD patients and healthy controls in: sCu ($p < 0.001$), sZn ($p < 0.001$), iCp ($p < 0.001$), Tf ($p = 0.007$) and Cp / Tf ($p < 0.001$). No statistical difference was found in the results for sFe ($p = 0.13$) and Fer ($p = 0.54$). The present study is the first contemporary examination of the eCp reference intervals for healthy Bulgarians. The values obtained are close to those quoted in the literature (60-140 IU / L). eCp is a topical indicator that, along with other physiologically related proteins in trace elements metabolism (transferrin, ferritin and hepsidin), gives new hopes for diagnostic and prognostic markers not only in rarely diagnosed diseases, but also in a wide range of pathological conditions associated with increased oxidative stress - neurodegenerative processes, chronic conditions and stress reactions.

Scientific publications and presentations:

- Atanasova B, Ivanova I, Kostadinova A et al. Iron and copper. Trace elements – contemporary clinical application. St. Ivan Rilski University hospital. Sofia. 29 Sep 2016.
- Ivanova I, Atanasova B, Dragneva S et al. Comparative analysis of copper and zinc in serum and urine in Bulgarian patients with hepatic manifestation of Wilson's disease and other chronic liver diseases. VII Natioanl conference in Rare diseases and orphan drugs. Plovdiv. 9-10 Sep 2016. Rare diseases and orphan drugs 2016;3.
- Ivanova I. PhD thesis. Copper status – laboratory aspects and clinical application in different diseases. Sofia, 2016.

- Ivanova I. Copper status – Clinical application: Wilson disease and neurodegenerative disorders. Expert Round table, Regional meeting for Patients and Doctors – Advanced in the treatment of Wilson’s disease; Skopje, 25 Nov 2016
- Ivanova I, Siotto M, Genova M et al. Study of ceruloplasmin activity in healthy Bulgarians. EUROMEDLAB Athens. 11-15 Jun, 2017.

Contract 61 /2016 Vitamin D levels in obstructive sleep apnea syndrome

Research team: Prof. Daniela Stoichkova Petrova-Nikolova, MD, PhD

- Prof. Ognian Georgiev, MD, PhD
- Assist. Daniela Miletieva, MD
- Asist. Adelina Tzakova, MD
- Asist. Radoslav Bilyukov, MD
- Asist. Tzanko Mondeshki, MD
- Asist. Vencislava Pencheva-Genova, MD, PhD

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Propedeutic of Internal Diseases

RESULTS: Patients with moderate and severe Obstructive Sleep Apnoea (OSA) were subjected to tests. The tested patients had significantly higher BMI and neck circumference results, compared to the control group of healthy individuals. The ESS results show statistically significant higher values in OSA. Patients with OSA are characterized by a Vitamin D deficit and severe Vitamin D deficit. This causes secondary hyperparathyroidism and increased bone loss. The severe OSA is associated to a longer duration of the average desaturation level during sleep and a severe Vitamin D deficit. The commencement of a Non-Invasive Ventilation treatment is related to a significant increase of the Vitamin D levels, also taking into consideration the significance of the different seasons. The low 25(OH) D levels are involved in the OSA pathogenesis. The Vitamin D deficit is among the causes of secondary hyperparathyroidism. OSA is a risk factor for secondary osteoporosis and increased risk of fractures, irrespective of the age. The low 25(OH) D levels are associated with a more severe obstructive sleep apnoea, longer duration of the desaturation episodes, higher BMI and longer neck circumference. The obese patients (BMI over 30) and those with longer neck circumferences suffer from a more severe Vitamin D deficiency. The seasonal follow-up after commencement of Non Invasive Ventilation treatment showed a significant increase in the Vitamin D levels. It is recommended that patients with OSA are subjected to screening tests for osteoporosis. In order to reduce the risk of fractures to levels below 22%, the Vitamin D values during wintertime, must be higher than 24 nmol/l, i.e. a moderate Vitamin D deficiency. This data is comparable to that, presented by other authors. The results confirm the established dependence between the Vitamin D levels, the sleep apnoea severity and the outcomes of the Non Invasive Ventilation treatment. The data we have obtained underline the need of future studies on the effects of the non-invasive therapy on the hormonal and bone changes in a larger number of patients with OSA.

Scientific publications and presentations:

- Krasimiorova D, D Petrova, O Georgiev. Vitamin D the known and unknown. Thoracic medicine 2016;8(1):58-75

- Krasimirova D, Petrova D, Georgiev O, et al. Parathyroid hormone and vitamin D levels in obstructive sleep apnea syndrome in winter. Thoracic medicine 2017;9(3):38-55
- Krasimirova D, Petrova D, Georgiev O, et al. Parathyroid hormone and vitamin D levels in obstructive sleep apnea syndrome in winter. ERS Int Congress 2017, Milan 9-13 Sep 2017

Contract 62/2016 Investigation of the diagnostic and prognostic significance of some new biomarkers (CCA-CA and M2-PK in blood serum and IGF-1 in bile) in patients with obstructive jaundice

Research team: Prof. Violeta Dimitrova Marinova, MD, PhD, DSci

- Vladislav Stoyanov, MD, PhD student
- Assist. Prof. Elena Arabadzhieva, MD, PhD
- Assist. Prof. Dragomir Dardanov, MD, PhD
- Lilia Simonova, MD, PhD student
- Assoc. Prof. Atanas Yonkov, MD, PhD
- Assoc. Dimitar Bulanov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Sasho Bonev, MD, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of medicine, Dept. of general and operative surgery,

RESULTS: The aim was to investigate the diagnostic and prognostic significance of CCA-CA and IGF-1 in blood serum and bile in patients with obstructive jaundice. From 2016 to 2017, a clinical and laboratory study of the serum and bile concentration of CCA-CA and IGF-1 was performed in 30 patients with obstructive jaundice. Depending on the cause of it, the patients are divided into 3 groups: I - 9 patients with extrahepatic bile duct carcinoma (EBDC); II - 11 patients with pancreatic carcinoma and III - 10 patients with benign diseases. Pre-operative blood investigation and bile juice during all operative treatment was performed for tumor markers. The materials were preserved according to the requirements of the standards of the Clinical Laboratory. Special kits and the ELISA method were used. For detection of CCA-CA and IGF-1 in serum and bile juice, human CCA_tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial (TRNT1) ELISA Kit, and human IGF-1 ELISA were used. The results obtained were statistically processed using SPSS 19.0.0. 30 patients were studied, 17 women (56.7%) and 13 men (43.3%). Male: female ratio is 1: 1.3, and the average age - 63 years. There was a statistically significant difference in both serum and biliary tumor marker concentrations between the patients with EBDC and patients with pancreatic carcinomas, EBDC group and the group with benign disease, as well as between EBDC group and the other two groups taken together. The initial results obtained by us have a theoretical, methodological and practical value. They confirm the theoretical hypothesis that elevated levels of CCA-CA and IGF-1 in bile juice and blood serum are found in patients with EBDC. In practice, the study of these markers in patients with obstructive jaundice provides additional information. They can also serve for diagnosis and confirmation of EBDC.

Contract Nr 64/2016 Study of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis and comparison of the results of standard microbiological examination of secretions from respiratory tract

Research team: Assoc. prof. Guergana Petrova Stoyanova, MD, PhD

- Assoc. prof. Tanya Strateva MD, PhD
- Snezhina Lazova, MD, PhD
- Assist. Dimitrinka Miteva, MD
- Spaska Leshichkova
- Prof. Penka Perenovska, MD, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of medicine, Dept. of pediatrics, G. Sofiyski Str. 1, 1431 Sofia

RESULTS: Infection with *P. aeruginosa* (PA) is a milestone moment in the natural course of the disease called Cystic Fibrosis (CF), since its presence is associated with worsening of lung function and is a significant predictor of mortality. Besides through microbiology culture of the bacteria, PA infection could be detected with the immune response of the microorganism. From the 140 patients with CF (mean age 0 to 61 years), criteria for a chronic PA infection was covered in 91 (65.4%). For some of them and all other patients (49) after signed informed consent we made an assay for antibodies against PA via a serum ELISA kit. Precise microbiological diagnosis has also been carried out. The results of both methods are analyzed and compared. In 10 patients with at least once isolated PA, antibiotic treatment was initiated according to the combined results obtained. The serological test is repeated on the 3rd and 6th month of treatment, and the microbiological on the 6th month. In the study group of 49 patients with no evidence of a causative agent in the specimen, an elevated titre of antibodies (39.06%) was found in 25, and in almost half of them (12 patients) titers were at levels consistent with chronic infection. Within 3 to 12 months after the initial study, the presence of PA and sputum was demonstrated at 8. The 10 children on the 3rd and 6th month after initiation of the treatment showed a significant decrease in the antibody titer and an improvement in the pulmonary functional tests for all but for the patient without change in therapy, where the reverse trend was observed. The results confirm the role of antibody testing as a useful marker for the progression of infection and the response to antibiotic treatment in patients with CF.

Scientific publications and presentations:

- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. The place of the examination of serum antibodies towards *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis, *Nauka pulmolog* 2016;4:22-7
- Miteva D, Perenovska P, Lesichkova S, et al. *Pseudomonas* Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with CF, *Zdraven navigator* 2017;2(10):14-16
- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Monitoring the titre of antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis – clinical application, *Thoracic medicine* 2017;2(9):44-55
- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis – concordance between the immunology and microbiology test results. *Nauka pulmologia* 12, 2017, N3, pp. 4-13
- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Is diagnostic of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in Bulgarian CF patients? 40th Eur Cystic Fibrosis Conference, 7-10.6.2017, Seville, Spain *J Cyst Fibros* 2017;16, S108

- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Imperfection of Sputum Examination for Chronic Lung Infections in Bulgarian CF Patients. *Pediatr Pulmonol* 2017;52:S132-S133.
- Petrova G, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Imperfection of Sputum Examination for Chronic Lung Infections in Bulgarian CF Patients. 16th Int Congress of pediatric pulmonology CIPP XVI, 22-25.06.2017, Lisbon, Portugal.
- Petrova G, Perenovska P, Zafirovski L, et al. Pseudomonas aeruginosa in bulgarian CF patients, is the sputum examination enough. 47 Pedijatrijski Dani Srbije sa međunarodnim učešćem, 6-8. 10. 2016. Nish, Serbia Abstr. pp64
- Cholakova K, Petrova G, Perenovska P, et al. Possible early detection of Pseudomonas aeruginosa in CF patients in Bulgaria could help prevent a chronic infection. XVI Int Congress Of Medical Sciences, 1-14.05.2017 Sofia, Bulgaria
- Miteva D, Perenovska P, Lesichkova S, et al. Pseudomonas Antibodies against Pseudomonas aeruginosa in patients with CF. XVIII National conference for GPs and pediatricians, 19-21.05.2017 Sunny beach, Bulgaria, abstr pp. 44
- Petrova G, Tzotcheva I, Perenovska P, et al. The sputum sample alone is not enough for chronic Pseudomonas infection detection in cystic fibrosis patients. 35th Annual Meeting of the Eur Society for Paediatric Infectious Diseases, 23-27.05.2017, Madrid, Spain, ESP17-0700
- Petrova G, Zafirovski L, Lesichkova S, et al. Clinical application of the antibodies against Pseudomonas aeruginosa. 48 Pedijatrijski Dani Srbije sa međunarodnim učešćem, 5-7.10.2017 Nish, Serbia abstr. p 78

Contract 65/2016 Investigation of lung function in children with scoliosis

Research team: Prof. Penka Ilieva Perenovska, MD, PhD, DSci

- Snezhina Lazova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Guergana Stoyanova, MD, PhD
- Hristina Rfailova
- Assoc. Prof. Vasil Yablanski, MD, PhD
- Evgeni Vlaev, MD
- Stamatios Priftis, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pediatrics, G. Sofiyski Str. 1, 1431 Sofia

RESULTS: Scoliosis is a spine deformity with high incidence affecting the thoracic cage with potentially severe and irreversible effects on pulmonary function. It is caused by lateral displacement and rotation of the vertebral bodies. Usually occurs in periods of rapid somatic growth. Vertebral distortion affects the anatomy and functions of the thoracic cage, lung and airways and the other intrathoracic organs. Pulmonary function in children with early onset scoliosis is predominantly severely affected. Detection of bronchial reversibility in children with scoliosis is associated with a severe restriction with more frequent manifestations, reduced physical exercise tolerance and rapid tiredness. Spirometry indexes demonstrate a very good correlation with the assessment of physical tolerance and hypoxemia (oxygen saturation assessed by pulse-oximetry and blood gas analysis). Using the method *arm span* for height determination increases the sensitivity of spirometry as a screening tool for early restrictive dysfunction in

children with scoliosis and becomes equal to the plethysmography sensitivity. Spirometry is the most widely available and practical accepted lung function test – it is well standardized and does not require an expensive and specially equipped functional laboratory. Incorporating it into the comprehensive approach (monitoring and treatment) protocol in children with scoliosis is practically easy to apply and would have a great medical (biological, psychological) and social effects. According to our information, no such studies have been performed in children with scoliosis. The results of this project are a successful addition to European and world literature (theoretical contribution), contributing to the optimization of the follow-up process of these children (practical and applied contributions).

Scientific publications and presentations:

- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. Assessment and comparison of spirometric indexes in children with scoliosis and asthmatic asthma. *Pediatrics* 2017;26:6-11
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. Int Severe Asthma Forum. Manchester, UK. 17-19 Nov 2016 Lung Function parameters in asthma, severe asthma and scoliosis in children
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. The impact of scoliosis on lung function in children. 16th Int Congress on Pediatric Pulmonology. Lisbon, Spain Jun 22-25, 2017.
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. 47 Pedijatrijski dani Srbije sa medunarodnim ucescem. Nish, Serbiq 6-8 Oct 2016. Pulmonary function tests in children with scoliosis. A65
- Lazova S, Yablanski V, Perenovska P et al. Pulmonary function tests in children with scoliosis. Congress of Respiratory Medicine of the Republic of Macedonia. Ohrid, Macedonia. 6-9 Oct 2016. Abstr. p 122
- Papochiev K, Lazova S, Yablanski V et al. Lung in distress - asthma vs. scoliosis. VI Int Congress of Medical Sciences. Sofia, Bulgaria. 11-14 May 2017. abstr 196 p

Contract 66/2016 Clinico-morphological cross-section and analysis of soft-tissue tumors with retroperitoneal localization; Study and evaluation of the diagnostic, clinical and prognostic value of the immunohistochemical expression of P53 and MDM2

Research team: Assoc. Prof. Atanas Stefanov Jonkov, MD, PhD

- Assist. Prof. Samia-Nadin Katibova, MD, PhD student
- Assist. Prof. Ivanka Stancheva, MD, PhD
- Assist. Prof. Tihomir Dikov, MD
- Assoc. Prof. Vesela Todorova, MD, PhD
- Tihomir Petkov, student

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of General and Operative Surgery, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: In the analysis of the documentation of the patients with retroperitoneal tumors who had surgery at the Clinic of General and Liver-Pancreatic Surgery of the University Hospital "Alexandrovska" for the period 2005-2016, 18 patients were selected with liposarcoma diagnosis (12 well differentiated at the moment of debut and 6 dedifferentiated at the same time) suitable for phenotypic and molecular studies. Of these, 20 were males, aged 37.6 to 76.1 years (average age 57.1); Females - 8, aged 27 to 81.9 (average age 55). The size of the tumor formations

ranged from 4 to 30 cm, an average of 15 cm. 11 of the 18 cases with the liposarcoma group had one or more recurrences of the disease. As a control group, 10 cases with the closest soft tissue differential diagnosis (lipoma in size over 15 cm - 2, desmoid tumor - 1, leiomyosarcoma - 3, peripheral nerve skin tumor 2, undifferentiated pleomorphic sarcoma - 2). Immunohistochemical expression of MDM2 was detected in 89% of the cases in the liposarcoma group, respectively 20% of the cases in the control group. The tendency of increasing the MDM2 expression in liposarcoma subdifferentiation was confirmed, with the highest incidence in the recurrent cases, being 91%. Immunohistochemically detectable expression at the protein level reflects an increased number of MDM2 gene copies on chromosome 12, which is parallel to the liposarcoma differentiation stages with a consistently higher average gene copy number in the dedifferentiated liposarcoma - an average of 16 to 9 gene copies in the well differentiated. In the non-liposarcoma control group, no in situ hybridization data was found for amplification in the MDM2 gene locus on chromosome 12. The paraffin blocks selected for molecular studies are a temporary biobank database to serve for further studies, particularly, the immunohistochemical expression of P53 with subsequent interaction analysis of MDM2-p53.

Contract 69/2016 Polycystic ovarian syndrome and cardiovascular risk

Research team: Antoaneta Trifonova Gateva, MD, PhD

- Prof. Zdravko Kamenov, MD, PhD, DSci
- Tsvetelina Velikova, MD, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Dept. of Internal Medicine, G. Sofiyski Str. 1, 1431 Sofia

RESULTS: In the study were included 80 patients – 25 obese, 35 nonobese PCOS and 20 obese PCOS. The groups were similar in age, but nonobese PCOS women had significantly lower BMI, waist circumference, WHR and WSR compared to obese women with and without PCOS. Patients with obesity with or without PCOS had significantly higher prevalence of visceral obesity compared to nonbese PCOS patients, although 1/3 of them had visceral redistribution of fat. The patients with visceral obesity had higher levels of blood glucose and IRI during OGTT, HOMA-index, HDL-cholesterol and triglycedires, ALT and GGT, uric acid, white blood cells and ESR. Obese PCOS patients had the worst indices of carbohydrate metabolism and statistical significance was observed for IRI on 0 and 60 min of OGTT, HOMA-index and prevalence of insulin resistance. There was a tendency towards lower peroxiredoxin 4 levels in nonobese PCOS patients (5674.8 ± 3822.4 pg/ml), higher in obese PCOS patients (6588.9 ± 3731.0 pg/ml) and even higher in obese patients without PCOS (7724.6 ± 4840.4 pg/ml). The patients with abdominal obesity according to waist circumference and WSR had significantly higher peroxiredoxin 4 levels compared to those without (7108.2 ± 4568.0 vs. 5079.8 ± 2555.4 pg/ml; $p=0.015$ and 7310.6 ± 2646.2 vs. 4785.0 ± 2646.2 pg/ml; $p=0.013$). There was no difference in peroxiredoxin 4 levels in patients with and without insulin resistance, hypertension, dyslipidemia, hyperandrogenemia and metabolic syndrome. Peroxiredoxin 4 showed a weak positive correlation to weight ($r=0.228$; $p=0.044$) and VAI ($r=0.278$; $p=0.031$) and stronger with ESR ($r=0.4$; $p<0.01$), but not with hormonal parameters and insulin sensitivity indices. In conclusion nonobese women with PCOS had lower levels of classical and new (peroxiredoxin 4) cardiovascular risk factors.

Contract 70/2016 Neurological, vascular and biochemical factors in evolution of diabetic foot

Research team: Prof. Zdravko Asenov Kamenov, MD, PhD, DSci, FACE

- Prof. Ivan Poromanski, MD, PhD - University hospital “Pirogov”
- Prof. Iulia Petrova, MD, PhD, Dsci
- Assoc. Prof. Dobrin Vasilev, MD, PhD
- Tsvetan Gatev, MD PhD student
- Silvia Nacheva, MD, PhD student
- Assist Prof. Yavor Asyov, MD, PhD
- Assist Prof. Antoaneta Gateva, MD, PhD
- Tsvetelina Velikova, MD, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, G. Sofiyski Str. 1, 1431

RESULTS: The aim of our study is to analyze the role of some neurological, vascular and biochemical factors in the evolution of the diabetic foot. For this purpose we used questionnaires, instrumental and laboratory tests. In the study were enrolled 84 diabetic patients over the age of 40: 56 males (66.7%) and 28 females (33,3%) with the average age of 55.8 ± 9.3 who were divided into 3 groups – newly diagnosed diabetes (n=31; 36.9%), type2 diabetes and proven neuropathy (n=33; 39.3%) and diabetic foot (n=20; 23.8%). Regular blood tests, biomarker blood tests (Cystatin C, Vaspin, ThromboxaneA2), instrumental tests (ankle/brachial index, intima media thickness, biothesiometer, EZscan, Neuropathy Disability Score, EMG, ENG, sympathetic skin response, endothelial tracking, capillaroscopy), antropometry, questionnaires–NSS(Neuropathy Symptom Score), MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument) were performed. As a result we found statistically significant higher levels of Cystatin C among people with diabetic foot and those with type 2 diabetes and established polyneuropathy compared to newly diagnosed diabetics. Moreover, we proved the predictive role of this biomarker in the evolution through diabetic polyneuropathy to diabetic foot (AUC=0,683; CI95: 0,566-0,799, p=0,005). We found substantially higher asymmetry in the electrochemical conductance of the feet (EZscan) among patients with diabetic foot compared to newly diagnosed diabetics and those with long-standing type 2 diabetes and proven polyneuropathy. Also we confirmed thicker intima-media layer of the common carotid artery in the group with diabetic foot compared to the group of newly diagnosed diabetics. From the questionnaires and semi-quantitative methods which were used we found a predictive role for developing diabetic foot of the MNSI (score >10.5-high risk for diabetic foot, 83.3% sensitivity and 70% specificity) and NDS (score > 6.5 high risk for diabetic foot, 95% sensitivity and 80% specificity). In conclusion we suggest that the levels of Cystatin C, foot asymmetry (EZscan) and IMT plus MNSI and NDS may have practical role for an earlier identification of the people at high risk for developing diabetic foot.

Contract 71/2016 Exploration of the importance of immunological and immunogenic factors for the development of bkV replication after transplantation

Research team: Prof. Elisaveta Yordanova Naumova, MD, DSci

- Assoc. Prof. Snezhina Kandilarova, MD, PhD
- Atanaska Georgieva, PhD
- Yana Krusteva
- Valentina Atanasova, PhD
- Tsvetelin Lukanov, PhD
- Prof. Anastasia Mihaylova, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Clinical Laboratory and Clinical Immunology

RESULTS: The aim of our study was to assess the risk factors associated with the occurrence of BK virus (BKV) induced complications in patients after RT. Along with BK replication in recipients, we studied and analyzed immunological factors such as HLA antigens, alloreactivity, cellular immune status before and in the early post-transplant period, tissue incompatibility, presence of CMV, EBV co-infections, dialysis time, some demographic features. The results of this study revealed that BKV is replicated in both urine and/or plasma in any post-transplant period, requiring optimization of monitoring scheme. The development of other co-infections in transplants was not related to the presence of BKV viremia and vice versa. There was a tendency for an increased risk of BK infection in older recipients, males, individuals with a higher degree of tissue incompatibility, and those treated with long-term hemodialysis. The type of donor and the presence of certain HLA alleles as well as the humoral alloreactivity were not found to predict an increased risk for BK reactivation. The elevated absolute number of NKT cells in the early post-transplant period is associated with an increased risk of BK viremia ($p = 0.013$), which pointed the important role of non-specific immune response in the pathogenesis of the infection. Immunological and other factors associated with BKV replication identified would contribute to improvement of individual follow-up of patients at increased risk of ineffective response to BK virus, which would benefit prophylaxis and therapy.

Scientific publications and presentations:

- Georgieva A, S Mihailova, Y Krasteva, et al. Naumova. Role of virological monitoring of BKV replication in renal transplant patients. BACI annals, 2016, 79-84.
- Krasteva Y, A Georgieva, S Mihailova, et al. Persistent BKV infection in a patient after renal transplantation - clinical case. BACI annals, Jubilee Scientific Conference, 28-29 Oct 2016, Sofia. BACI Abstr. 52.
- Georgieva A, S Mihailova, Y Krasteva, et al. Naumova. Role of virological monitoring of BKV replication in renal transplant patients. BACI annals, Jubilee Scientific Conference, 28-29 Oct 2016, Sofia. BACI Abstr. 13.

Contract 72/2015 Association between stress as a neuroendocrine factor and disease course in patients with chronic urticaria

Research team: Assoc. Prof. Maria Toncheva Staevska-Kotasheva, MD, PhD

- Prof. Vasil Dimitrov MD, PhD
- Assist. Prof. Elena Petkova, MD
- Assist. Prof. Denislava Nedeva, MD
- Assist. Prof. Anna Dimitrova, MD, PhD student

- Assist. Prof. Adelina Tsakova, MD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Centre of Allergology, G. Sofiyski Str. 1, 1431 Sofia

RESULTS: We examined the levels of leptin, ACTH and insulin in 41 patients with acute and chronic urticaria, and compared them with the disease severity. The patients were asked to fill in questionnaires to determine the levels of stress, anxiety and activity/severity of the disease. Based on the disease course and severity, we defined 3 patient groups: acute, mild/moderate and severe/very severe urticaria. The enrolled patients were characterized by demographic characteristics and compared according to laboratory results. Most patients (31.7%) in the severe/very severe urticaria group reported stress as a major factor for exacerbation of the disease. Regarding NSAIDs and viral infections, there is no such difference observed. With regard to the course of the disease, statistically significant differences were found for the inflammatory markers D-dimer ($p = 0.04$) and ESR ($p = 0.045$) depending on the disease severity, with the highest values for D-dimer found in the severe/very severe urticaria group (1.15 mg/l), and for the ESR in the acute urticaria group (10.05 mm/h). There was a trend towards higher hsCRP levels (27.01 mg/l) in the severe/very severe urticaria group and in the acute urticaria group (11.21 mg/l). Mean values of total IgE were the highest and above normal ranges in the severe/very severe urticaria group (141.8 IU/ml). Regarding leptin, ACTH and insulin levels, no significant differences were found depending on the clinical course of the disease. In terms of DHEA-S values, there was generally a trend towards a lower limit of normal ranges in all groups (acute: 2.80 mkmol/l, mild/moderate: 3.91 mkmol/l and severe/very severe 3, 60 mkmol/l). Significant difference was found between the severity of urticaria and the results of the anxiety ($p = 0.02$) and urticaria activity tests ($p = 0.04$). No statistically significant difference was found for the Holmes-Rahe stress test, but there was a trend towards higher scores in the group of patients with severe/very severe urticaria (acute: 150.3 points, mild/moderate: 187, 9 points and severe/very severe 238.3 points). Patients who reported stress as a risk factor for disease exacerbation have been found to have the highest points from stress and anxiety questionnaires (232.9 and 24.3 points, respectively).

Scientific publications and presentations:

- Petkova E, Staevska M, Valerieva A, et al. Association between stress as a neuroendocrine factor and disease course in patients with chronic urticaria. *Allerg Hypersensit Asthma* 2016;13:34-40

Contract 73/2016 Assesment on NT-ProBNP in chronic failure patients

Research team: Assoc. Prof. Raya Stefanova Ivanova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Dobrin Vasilev, MD, PhD
- Assist. Prof. Adelina Tcakova, MD, PhD
- Assist. Prof Teodora Janeva-Sirakova, MD, PhD
- Assist. Prof. Zoya Vaskova, MD
- Assist. Prof. Cenka Boneva, MD
- Assist. Prof. Galina Zlatancheva, MD, PhD student
- Plamen Dunev, MD
- Prof. Rumiana Tarnovska-Kadreva

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The aim of our study was to evaluate the diagnostic and prognostic value of cardiovascular biomarker NT-proBNP in patients with patients with chronic heart failure (CHF). Material and methods: A total of 60 patients with CHF (46 m, 14 f, mean age 66.27 ± 12.65 y, 7-class 2, 44-class 3 и 9-class 4 NYHA classification) were included. The basal level of NT-proBNP was investigated in all cases and in 38 patients the assay was controlled, at least one month after inclusion in the study on the background of optimized therapy for CHF. During the study period a cardiovascular mortality was registered in 11 patients. The diagnosis of CHF was based on standard clinical, biochemical and echocardiography parameters. Results: The basal levels of NT-proBNP were increased (above 125 pg/ml) in 56 patients (93%), broadly varying from 88,71 to 34995,07 pg/ml. The mean value of this biomarker was significantly higher in the group of patients with class 4 NYHA classification compared to those of patients with class 2 and class 3 NYHA ($p=0.012-0.001$). In patients with registered adverse event the mean level of NT-proBNP was significantly higher compared to the other patients ($18260,82 \pm 12483,49$ pgl/ml и $5730,14 \pm 9148,78$ pg/ml, $p < 0.0001$). The ROC curve identified a cut-off point of 5952,04 pg/ml with sensitivity 90% and specificity 78% (area under the curve 0.855). The value of control NT-proBNP was significantly decreased compared to that of basal level of NT-proBNP ($p=0,032$), and only in 3 cases was found increased of the biomarker. We found that the values of NT-proBNP correlated positively with creatinine ($p=0,001$), potassium ($p=0,021$) and hs troponine ($p=0,0001$) levels, as well as the echocardiographic parameters LV End Systolic Dimension ($p=0,046$), LV end systolic volume ($p=0,008$) and diameter of inferior vena cava (IVC), ($p=0,045$). A negative correlation was found with hemoglobin ($p=0,042$), eGFR ($p=0,003$) and natrium levels ($p=0,001$), as well as with EF ($p=0,023$). In conclusion, our results show that NT-proBNP is a valuable surrogate marker in determination of prognosis and monitoring the response to drug therapy of chronic heart failure patients.

Scientific publications and presentations:

- Boneva T, Ivanova R, Vasilev D. Natriuretic peptides as prognostic marker in the diagnosis, prognosis and therapy of cardiac failure. Medicart, 2017

Contract 74 /2016 Inflammation and thyroid autoimmunity in patients with fibromyalgia

Research team: Prof. Rasho Kolev Rashkov, MD, DSci

- Assist. Prof. Valentina Reshkova, MD, PhD
- Prof. Zdravko Kamenov, MD, DSci
- Assist. Prof. Antoaneta Gateva, MD, PhD
- Assist. Prof. Adelina Tzakova, MD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, 13 Urvict Str., 1612 Sofia

RESULTS: The aim of the study is to investigate the link between some inflammatory markers, thyroid autoimmunity and pain threshold in patients with fibromyalgia. In the study were included 43 women with fibromyalgia with mean age 46.1 ± 10.5 years. Of them 23 were in the age range 43-49 and 18 healthy controls. Twenty three (53,5%) of the women were menopausal, none of them took hormone replacement therapy. 74.4% of the included women were euthyroid,

23.1% - hypothyroid (10.3% drug compensated, 12.3 noncompensated) and only one woman was hyperthyroid. Although we cannot confirm the presence of significant link between interleukin 17 and autonomic neuropathy in patients with osteoarthritis and fibromyalgia ($p=0.237$), there is a marled correlation. There was no significant link between IL17 levels between patients with fibromyalgia and healthy controls despite the tendency towards higher levels in FM (33.1 ± 128.7 vs. 9.1 ± 9.8). This results present that thyroid status assesment is important in patients with fibromialgia. The difference in cortisol concentration in patients with and without autoimmune thyroiditis does not significantly affect pain in fibromyalgia. There is no difference in IL17 levels between patients with and without thyroid autoimmunity. There is no significant correlation between LI17 and TSH levels. The clinical observation and assessment of patients leads to practical results, linked to establishment of hypothyroidism as a reason for fibromyalgia in more than 30% of the patients. There is a marked, although nonsignificant difference in the levels of interleukin 17 – higher in patients with fibromyalgia than in controls. This shows that the presence of inflammatory process can be linked to the clinical signs in patients with fibromyalgia and this is a component of the mixed pain in fibromyalgia.

Contract 75/2016 Evaluating the diagnostic and prognostic value of plasma miRNAs in patients with systemic lupus erythematosus

Research team: Assos. Prof. Simeon Valentinov Monov, MD, PhD

- Assist. Prof. Russka Shumnalieva, MD, PhD
- Viara Shumnalieva, MD, PhD – IQVIA
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Darina Kachakova-Yordanova, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept of Internal Medicine, UMHAT “St. Ivan Rilski”, Clinic of rheumatology

RESULTS: Expression levels of miR-146a were analyzed in plasma sample from 40 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and compared to 10 healthy controls using real time PCR, SybrGreen technology. We used for normalization RNU6B as reference control and $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method in order to estimate expression levels. When compared to healthy controls miR-146a in plasma showed decreased expression in 40%, increased in 12.5% and without difference in 47.5% from patients. ROC curve analysis displayed that plasma miR-146a levels are not able to reliably discriminate patients from controls. In our previous study we demonstrated that analyzed miRNA in total blood is elevated in 62.5% of the patients and represents a potential diagnostic biomarker in SLE. Plasma miR-146a expression levels statistically significant correlate ($rs= 0.402$, $p=0.028$) with the levels in total blood, but not clinical characteristics of the disease. miR-146a levels are significantly elevated in plasma compared to whole blood in all analyzed patients. In conclusion miR-146a in total blood but not in plasma represent potential diagnostic biomarker in SLE. In order to confirm the obtained results validation study including larger group of SLE patients and healthy controls should be performed.

Contract 76/2016 Expression analysis of plasma miRNAs in patients with rheumatoid arthritis and evaluation of their diagnostic and prognostic value

Research team: Prof. Zlatimir Gospodinov Kolarov, MD, DSci

- Assoc. Prof. Simeon Monov, MD, PhD
- Assist. Prof. Russka Shumnalieva, MD, PhD
- Viara Shoumnaieva, MD, PhD – IQVIA
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD
- Darina Kachakova-Yordanova, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept of Internal Medicine, UMHAT “St. Ivan Rilski”

RESULTS: In the current study we performed for first time an expression analysis for miR-124 in plasma of 34 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 10 healthy controls (HCs). For the analysis of the results from the executed real time-PCR the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method was used. The reference control RNU6B was chosen for normalization of the expression data. Increased levels of miR-124 in plasma were established in all but one RA patient when compared to HCs. The executed ROC curve analysis showed that the miR-124 plasma levels could discriminate RA patients from HCs with sensitivity of 91.2% and specificity of 80%, and AUC = 0.879 (95%CI=0.740-1.00), $p = 0.303 \times 10^{-3}$. We found that the miR-124 levels statistically significant correlate with the diagnosis ($rs=0.551$, $p=0.106 \times 10^{-3}$), ESR ($rs=0.298$, $p=0.0497$), CRP ($rs=0.325$, $p=0.047$), aCCP ($rs=0.345$, $p=0.025$), RF as a whole ($rs=0.410$, $p=0.007$), but also separately with different RF subtypes as RF IgM ($rs=0.430$, $p=0.004$), RF IgG ($rs=0.434$, $p=0.004$), RF IgA ($rs=0.425$, $p=0.005$). Our results show that miR-124 expression levels in plasma could be used as reliable noninvasive diagnostic biomarker in RA. It is necessary to conduct validation study with larger group of patients and controls in order to confirm the obtained results.

Scientific publications and presentations:

- Shumnalieva R, Kachakova D, V Shoumnaieva-Ivanova, et al. Expression levels of miR-124 in the plasma of rheumatoid arthritis patients, EULAR Annual congress of Rheumatology, Amsterdam, 13-16 Jun, 2018

Contract 77/2016 Evaluation of the efficacy of autologous platelet-rich plasma in patients with Knee Osteoarthritis

Research team: Prof. Rumen Malinov Stoilov, PhD

- Tsvetoslav Georgiev, MD
- Prof. Rasho Rashkov, MD
- Aleksandar Kopchev, MD
- Rositsa Dacheva, MD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Internal Diseases, University hospital “St. Iv. Rilski”

RESULTS: Patients treated with PRP showed a statistically significant improvement in all clinical points of evaluation: VAS ($p < .001$), HAQ-DI ($p < .001$), Lequesne ($p < .001$), and WOMAC ($p < .001$) in comparison with their values measured prior to intra-articular injection of

PRP. When compared to the group of patients treated with high molecular-weight hyaluronic acid, there was no statistically significant difference ($p > 0.05$). However, a better response was seen in a comparison of clinical parameters in the PRP group in comparison with patients treated with glucosamine sulphate ($p < .001$). In glucosamine sulphate group there was no significant improvement in VAS, WOMAC, HAQ-DI, Lequesne after the six month of treatment ($p > 0.05$). An additional analysis found that the difference in the tested clinical parameters between treatment with high molecular weight hyaluronic acid on the one hand and PRP on the other was not significant. In a subgroup analysis, it was found that patients with mild radiology knee osteoarthritis (KL=1) had a better response in the Lequesne index at the sixth month post-PRP versus hyaluronic acid treatment ($p = .027$). In patients treated with high molecular weight hyaluronic acid after the third month, the effect persists in time to six months. Patients treated with PRP experienced a significant improvement in VAS ($p = .001$), WOMAC ($p < .001$) and Lequesne ($p < .001$) in the second trimester of follow-up. One patient (1/16, 6.25%) in the PRP group reported acute but transient pain, swelling and warming in the area of the injected knee, which spontaneously resolved within 24 hours of onset.

Scientific publications and presentations:

- Georgiev T, R Dacheva, M Ivanova, et al. The place of autologous platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis. Rheumatology 2016;4:3-5
- Georgiev T, M Ivanova, R Stoilov, et al. Treatment with oral glucosamine sulfate, intra-articular hyaluronic acid and platelet-rich plasma (PRP) - Results from a prospective longitudinal study in patients with knee OA Bulg National Conference for Rheumatology, 12-14 May 2017, Aheloy

Contract 78/2016 Sleep disorder in patients with acute heart failure

Research team: Prof. Asen Rachev Goudev, MD, PhD

- Petar Kalaydzhiev, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicin, Dept. of Emergency medicine

RESULTS: The Project aims to detect the degree of comorbidity in these patients. To differentiate the individual forms of sleep apnea and to formulate a strategy for additional therapy. Due to the complexity of the topic, the difficult selection of patients and high goals, the project is still being developed. Preliminary results are insufficient to predict and draw conclusions. The complexity of the problem requires extensive research and work with a wide range of specialists in the field, further delaying the team's work. Elaborated overview on the theme. The results will be published after their statistical processing. 58 patients have been screened. Of these, 42 patients have heart failure. 30 patients experienced a sleep disorder. The results so far confirm the data from European studies in this field. Obstructive sleep apnea is more likely to occur. This allows the addition of mechanical ventilation to heart failure therapy. A detailed analysis of the data will be presented after the end of the study.

Contract 79/2016 Evaluation and follow-up of cardiovascular risk and the role of apolipoprotein C3 in patients with chronic pancreatitis, primary and secondary pancreatic exocrine insufficiency

Research team: Prof. Borislav Georgiev Vladimirov, MD, PhD

- Mila Kovacheva-Slavova, MD
- Sylvie Mitova-Siminkovitch, MD, PhD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Gastroenterology, Byalo more Str. 8, 1527 Sofia

RESULTS: Pancreatic diseases lead to pancreatic endocrine and exocrine deficiency (PEI). Patients have increased cardiovascular risk (CVR). The purpose of this study was to investigate CVR and its relation to PEI. CVR was evaluated by score systems (SCORE, Framingham), extended lipid profile, apolipoproteins A1, B, C3, CRP, pulse wave velocity (PWV). Prealbumin and retinol binding protein (RBP) were evaluated as protein absorption markers. Structural changes severity was determined by Cambridge classification, and the endocrine function-by glucose, HbA1c. Study enrolled 80 patients with chronic and acute pancreatitis (CP, AP), pancreatic cancer/resections leading to PEI. Patients mean age was 52.16 ± 12.36 years, 62.5% were men, alcohol was most common etiology. 46.25% were smokers, 32.5% suffered from hypertension and 30%-from diabetes mellitus. All received pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) based on PEI severity. We found optimal PERT in 50% of all patients. Dyslipidaemia with high TC (5.67 ± 2.49 mmol/L), LDL (3.51 ± 2.10 mmol/L), triglycerides (1.70 ± 1.25 mmol/L) levels had 30% without correlation to PEI. Triglycerides were not leading CVR factor. Low HDL levels (1.07 ± 0.37 mmol/L) were found in 53.57%, predominantly in males and AP. 65% had elevated CVR by non-HDL. TC/HDL ratio decreased with PERT optimization. Lipids and apolipoproteins A1, B, C3 correlated with malnutrition parameters. Unlike morphological changes, PEI correlated with TC, non-HDL, VLDL. We found a significant correlation between Framingham score and each lipid marker, apoB, apoB/apoA ratio, as opposed to SCORE. High stroke risk based on ApoB/apoA ratio was found in 45.41% and was significantly higher in men, pancreatic cancer/resection, inflammation. ApoC3 correlated with PEI and structural changes severity, moderately with atherogenic lipids, apoA, apoB, weak with HDL, $p < 0.05$. PWV increased significantly with functional dysfunction and morphological changes progression. PERT improves protein, well as fat malabsorption. For the accurate assessment of CVR and its proper prevention, the complex use of the Framingham score system, lipid profile, apolipoproteins, PWV are recommended.

Scientific publications and presentations:

- Kovacheva-Slavova M, S Siminkovitch, J Genov, et al. Apolipoproteins A-I, A-II, B, C-III as cardiovascular risk markers in patients with pancreatic disorders, Eur Pancreatic Club Jun 28-Jul 1, 2017, Budapest
- Kovacheva-Slavova M, S Siminkovitch, J Genov, et al. Modern approach by monitoring patients with pancreatic exocrine insufficiency and optimization of pancreatic replacement therapy, III National Congress for Young Gastroenterologists 24-26.03,2017, Sofia

Contract 82/2016 Study of vitamin D [25 (OH) D] levels in school-aged children during winter-spring and summer-autumn season

Research team: Assoc. Prof. Elisaveta Milkova Stefanova, MD, PhD

- Prof. Dobrin Svinarov, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Krasimira Kazakova, MD
- Assist. Prof. Desislava Yordanova, MD
- Zdravka Todorova, MD

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pediatrics , Iv. Geshov str. 11, Sofia 1606

RESULTS: The aim is to establish vitamin D status of healthy school aged children at the time expected for the highest (September - October) and the lowest (March - April) serum levels of vitamin D and to assess the need for vitamin D intake. Serum levels of 25 (OH) D were measured with the electro-chemiluminescence method (ECLIA). 116 students aged 7 to 16 years participated and 138 samples were measured. The distribution shows: for summer-autumn period - 102 children (49 boys; 53 girls) and for winter-spring period - 36 (16 boys; 20girls). We divided the boys and the girls into three group. Most children had sufficient levels of 25 (OH)D according to the predetermined reference ranges. We found 25 (OH)D deficiency in single cases – 5 children for the first period and 2 children for the winter-spring period. Prepubertal students were the largest number in the two periods. Despite the small number of pubertal pupils the the 25 (OH)D deficiency is more pronounced in this group. Only 22 children participated in the second stage. Of these – one child remained with insufficient level of 25(OH)D and in one child the level of 25 (OH)D raised but remained within the insufficiency range. These children did not take the prescribed therapy regularly. The results for vitamin D levels showed the trend in vitamin D status in healthy school aged children, divided by sex, age and season. They are also important for assessing the need for treatment and prophylaxis. The study may be the beginning of a larger study of vitamin D status assessment in Bulgarian children, on the basis of which a vitamin D prophylaxis program for school aged children will be developed.

Scientific publications and presentations:

- Yordanova D, Stefanova E, Kazakova K et al. Prophylaxis, diagnosis, therapy in childhood and adolescence, 2018. Healthy child – complex care. “Arbilis”, pp 31-38
- Yordanova D. Vitamin D level in Bulgarian school aged children. Prophylaxis, diagnosis, therapy in childhood and adolescence, 2018. Healthy child – complex care. Nesebar 19-22 Apr 2018

Contract 83/2016 Nonclassical forms of 21-Hydroxylase Deficiency: clinical and molecular-genetic diagnosis

Research team: Prof. Iva Hristova Stoeva, MD, PhD

- Antoaneta Kostova, MD
- Prof. Maia Konstantinova, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Elisaveta Stefanova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD -
- Radoslava Saraeva, PhD

- Ganka Dineva, PhD - American College of Sofia
- Daniela Pencheva, PhD
- Kalina Mihova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pediatrics, 11 Iv. Geshov Str., 1606 Sofia

RESULTS: Sixteen patients with clinical diagnosis non classical congenital adrenal hyperplasia (CAH) were selected for the present study – 15 girls and 1 boy. The clinical symptoms in the girls were hirsutism and/or menstrual irregularities, while the boy had ultrasound data for adrenal hyperplasia. Polycystic ovaries were seen on ultrasound in 7 of the cases. Five of the mothers had history of hirsutism and/or menstrual irregularities or difficulties in conception. The diagnosis was based on increased basal or stimulated levels of 17-OH-Progesterone. The hormonal samples were taken before 9 a.m., according the circadian rhythm of ACTH, in the early follicular phase of the menstrual cycle in order to avoid the false positive results from progesterone, secreted from corpus luteum. The levels of testosterone were investigated in 11 patients and were not elevated above the reference range. ACTH stimulation test was carried out in 5 patients; levels three times higher than the baseline were considered diagnostic. Seven of the patients were treated with long-acting corticosteroids. Samples of EDTA blood were taken from the patients after an informed consent was obtained and DNA was isolated for molecular-genetic analysis of CYP21A2. Due to technological problems in differentiating the sequences of the active gene and the pseudogene, multiple optimizations of the sequencing were necessary and the results of the molecular –genetic analysis will be presented later. Conclusions: 1. There is an overlap in the clinical symptoms of patients with polycystic ovary syndrome and non classical CAH; 2. Increased levels of testosterone were not registered in our patients with clinically diagnosed CAH; 3. The girls prevail among the selected candidates, therefore probably the majority of cases of non classical CAH remain undiagnosed in boys.

Contract 84/2016 Genetic polymorphisms associated with PCOS neuroendocrine dysfunction

Research team: Assist. Prof. Ralitsa Nikolaeva Robeva, MD, PhD

- Prof. Philip Kumanov, MD, PhD, DMSci
- Prof. Alexey Savov, PhD
- Silvia Andonova-Baklova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a common heterogeneous disorder characterized by multiple clinical features including chronic anovulation, infertility, polycystic ovaries and hyperandrogenic signs. Heredity is an important factor for the PCOS development, but the search for the specific PCOS related genes is still in progress. Neuroendocrine dysregulation might play a crucial role in the PCOS development, thus the hypothalamic – pituitary secretion as well as gonadotropin receptor changes are an important target of research. Two single nucleotide polymorphisms rs12470652 c.872A>G/p.Asn291Ser and rs2293275 c.935G>A/p.Ser312Asn in the Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor (LHCGR) gene as well as PROGINS variant of the progesterone receptor have been studied in healthy

Bulgarian women and PCOS patients. The prevalence of all polymorphisms was within the expected ranges for Caucasians and did not differ between the patients and controls ($p > 0.05$). The heterozygous rs2293275 c.935G>A/p.Ser312Asn PCOS carriers reported infertility more often than both homozygous groups (40% vs. 12.5%, $p = 0.022$). The same polymorphism was associated with insulin levels and lipid profile in obese PCOS women. Additionally, it might modulate the gonadotropin secretion in overweight patients. The obtained results showed that the rs2293275 c.935G>A/p.Ser312Asn genetic variant could modulate the clinical and hormonal characteristics of the PCOS especially in overweight and obese patients. Thus, larger studies in different ethnic groups and variable PCOS subgroups could reveal important genotype-phenotype associations.

Scientific publications and presentations:

- Robeva R, Andonova S, Savov A. Genetic polymorphisms of the progesteron receptor in some female reproductive system disturbances. Akush Gynekol (Sofia), 2017
- Robeva R, Andonova S, Tomova A, et al. LHCG receptor polymorphisms in PCOS patients. Biotechnol Biotechnol Equip. 2018;32(2):427-32.

Contract 85/2016 Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/ non-alcoholic steatohepatitis in patients with glucose intolerance

Research team: Assoc. Prof. Radina Stefanova Ivanova Boyanova, MD, PhD, DSci

- Prof. Luydmila Vladimirova, MD, PhD, DSci
- Prof. Asen Nenov Alexiev, MD, PhD
- Assist. Prof. Maria Boyadzhieva-Vladimirova, DM, PhD
- Assist. Prof. Nevena Chakarova, MD, PhD
- Assist. Prof. Tsvetelina Marinova, MD, PhD
- Assist. Prof. Romyana Dimova-Draganova, MD, PhD
- Assist. Prof. Greta Grozeva-Damyanova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: The aim was to investigate noninvasive surrogate markers for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) screening and assess the degree of risk for progressive liver disease (advanced fibrosis) in patients with prediabetes and type 2 diabetes mellitus (T2DM), and determine their prevalence. Patients with prediabetes ($n = 30$) and T2DM ($n = 310$) were compared with T1DM ($n = 94$), NAFLD ($n = 403$), and healthy subjects ($n = 241$). For NAFLD screening, the fatty liver index (FLI) was used, and for advanced fibrosis assessment - APRI / APRI 1 (cut-off 1), FIB-4 and NFS, and FibroMax (25). The NAFLD frequency (FLI > 60) for T2DM and prediabetes was 81% and 85% respectively, and 12% - for T1DM. The positive predictive value of FLI in the ultrasound confirmed NAFLD was 91% and in NAFLD cases with newly diagnosed T2DM - 98%. Advanced fibrosis and cirrhosis were predicted in 3% to 25% of patients with prediabetes and T2DM, depending on the used method and the subjects studied group. The predictive negative value of NFS and FIB-4 for advanced fibrosis and cirrhosis was better than the positive one compared to the histologically determined stage of fibrosis. The FibroMax test provided additional information on steatosis, inflammation and clinically significant fibrosis (F2), respectively, with a more optimal risk assessment. The incidence of NAFLD, as well as the

risk of advanced fibrosis in prediabetes and T2DM is high. In these patients the FLI can be used to screen NAFLD. Fibrous markers NFS, FIB-4, and APRI / APRI1 may reject advanced fibrosis, but to a lesser extent to predict it. FibroMax may be investigated if additional information is needed.

Scientific publications and presentations:

- Boyadzhieva M. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes type 2. *Sci Endocrinol* 2016;1:5-9.

Contract 86/2016 Indexes for glyceimic control among pregnant women with gestational diabetes and diabetes

Research team: Assist. Prof. Nevena Yankova Chakarova, MD, PhD

- Assist. Prof. Maria Boyadjieva-Vladimirova, MD, PhD
- Assist. Prof. Romyana Dimova-Draganova, MD, PhD
- Assist. Prof. Greta Chakarova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Iliana Borisova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: During pregnancy a strict glyceimic control is essential to prevent the perinatal complications. Good glyceimic control could not be obtained without markers for evaluation of glycemia. Our data shows that women with GDM are older compared to controls (32.2 ± 5.0 vs 30.7 ± 4.5 , $p < 0,0001$). Such difference did not appear between pregnant women with diabetes and controls ($p > 0.78$); pregnant women with GDM have significantly higher BMI before pregnancy, as well as during the pregnancy when compared to women with diabetes and controls. Optimal sensitivity (64.7%) and specificity (62%) we found with HbA1c value threshold $> 5.6\%$ for GDM diagnosis. However, when we apply this value there are 1/3 of false positive, as well as 1/3 false negative case. Such significance was observed between GDM and controls regarding glycated albumin. The values for diabetic women were between 110.2 and 680.5 $\mu\text{mol/L}$, for women with GDM were between 35.8 and 656.2 $\mu\text{mol/L}$. Optimal sensitivity and specificity we found when we use threshold of 300 $\mu\text{mol/L}$. In this manner, GA could exclude GDM with sensitivity 58% and specificity of 59.1%. Again, there are similar as HbA1c many false-positive and false-negative values, making OGTT obligatory. Both markers have their own place for screening, as well as monitoring of pregnancy glyceimic control. There is a need for longer duration studies, thus how we could evaluate the correlation between glyceimic control markers and the risk for mother and her child in different types of glyceimic disturbances during pregnancy.

Scientific publications and presentations:

- Boyadzhieva M. Indexes for glyceimic control during pregnancy. *Endocrinology*, 2016;1:15-19
- Boyadzhieva M. Chapter 3. Evaluation of Glyceimic control indexes during pregnancy. The role of HbA1c, glycated albumin and fructosamine. *Nutrition and Diet in Maternal Diabetes*. Springer International Publishing AO, 2017

Contract 87/2016 Relationship between cardio-vascular autonomic dysfunction and sensory polyneuropathy, advanced glycation end-products and some cardio-metabolic risk factors in prediabetes (impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance)

Research team: Assist. Prof. Greta Gancheva Grozeva-Damyanova, MD, PhD

- Assist. Prof. Nevena Chakarova, DM, PhD
- Assist. Prof. Romyana Dimova-Draganova, DM, PhD
- Assist. Prof. Maria Boyadjieva-Vladimirova, DM, PhD
- Prof. Georgi Georgiev, DM, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Diabetology, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: Confirmed CAN was found in 12.3% of NGT, 19.8% of prediabetes (13.2% of IFG and 20.6% of iIGT), and 32.2% of NDT2D group. The prevalence of confirmed DSPN was 0% in NGT, 5.7% in prediabetes, and 28.6% in NDT2D. There was an enduring trend towards lower sympathetic and parasympathetic tone at rest and during standard clinical tests – deep breathing, Valsalva maneuver and standing from a seated position with the progression of glucose intolerance; the same tendency was observed for the sural nerve electrophysiological parameters (the amplitude of sural nerve action potential (SNAP), the sural nerve conduction velocity (SNCV) and sural nerve distal latency). In a stepwise multiple regression analysis the panel of age, QTc interval, waist circumference, diastolic blood pressure, and 120 min plasma glucose was significantly related to sympathetic activity (F [5,451]=78.50, p<0.001), determining 46,5% of its variance; and the panel of age, waist circumference, and QTc interval was significantly related to parasympathetic power (F [3,453]=132.26, p<0.001), determining 46,7% of its variance. HbA1c and age were significantly related to sural SNAP (F [2,454]=15.12, p<0.001), determining 23,6% of its variance, and HbA1c and tissue AGEs accumulation were significantly related to sural SNCV (F [2,476]=12.18, p<0.001), responsible for 20,2% of its variance. No abnormalities in nerve conduction velocity of other examined somatic nerve fibers was found.

Scientific publications and presentations:

- Dimova R, Tankova T, Chakarova N, et al. Cardio-metabolic profile of subjects with early stages of glucose intolerance and cardiovascular autonomic dysfunction. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;126:115-21.
- Dimova R, Tankova T, Guerguelcheva V, et al. Risk factors for autonomic and somatic nerve dysfunction in different stages of glucose tolerance. *J Diabetes Complicat.* 2017;31(3):537-43.
- Dimova R, T Tankova, G Kirilov, et al. Insulin Resistance and Cardiovascular Autonomic Tone in Early Stages of Glucose Intolerance. The ADA's 77th Scientific Sessions, San Diego, California, Jun 9-13, 2017.
- Dimova R, T Tankova, N Chakarova, et al. Main predictors of cardiovascular autonomic dysfunction in early stages of glucose intolerance. 52nd EASD Annual meeting, Munich, Germany, 12-16 Sep 2016.

Contract 88/2016 Frequency and progression of autoimmune thyroid diseases in female patients with prolactinomas: a comparative prospective study

Research team: Assoc. Prof. Atanaska Petrova Elenkova, DM

- Assoc. Prof. Atanaska Elenkova, DM
- Assoc. Prof. Iliana Atanasova, DM
- Prof. Georgi Kirilov, DM
- Prof. Fani Gergieva Martinova, DMSc
- Assist. Prof. Joanna Matrozova, DM
- Assist. Prof. Emil Natchev
- Assist. Prof. Vladimir Vasilev, DM
- Assist. Prof. Silvia Vandeva, DM

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Clinical Centre of Endocrinology & Gerontology, Zdrave Str, 2, Sofia 1431

RESULTS: The aim of this study was to assess the prevalence and progression of the autoimmune thyroid diseases (AITD) in patients with prolactinomas compared to sex- and age-matched control group in a prospective design. The study population consisted of 260 females (154 patients/106 controls) - participants in the scientific project/contract 3-C/2011. A total number of 144 females (84 patients/60 controls) were followed-up. Physical exam, thyroid ultrasound and laboratory testing (measurement of antibodies to thyroglobulin, thyroid peroxidase, TSH-receptor, serum TSH and FT4 levels) were performed. AITD were diagnosed in 28.6% of the patients and 15% of the controls ($p=0.056$). Hypothyroidism was found in 13% ($n=11$) of the patients versus 1.7% ($n=1$) of the control group ($p=0.014$). None of the participants was diagnosed with hyperthyroidism. The average Levothyroxine daily dose in our patients was 61.36 mcg [range: 25-150 mcg/d] and 25 mcg in the only woman from the control group who needed substitution therapy. Female patients with prolactinomas seem to be prone to autoimmune hypothyroidism. As a pathogenetic mechanism we could suggest the selective immunomodulatory action of PRL predominantly on cell autoimmunity, complement activation and antibody dependent cytotoxicity resulting in earlier and more rapid progression of Hashimoto's thyroiditis toward hypothyroid state in genetically predisposed individuals. Based on our results, we suggest performing routine screening procedures for AITD (hormonal, immunological and thyroid ultrasound examination) in all female patients diagnosed with prolactinoma at the time of diagnosis. We recommend annually measurement of serum TSH and Anti-TPO in young females with prolactinomas and monthly assessment of thyroid function during pregnancy.

Contract 91/2017 Patogenic role of the T-regulatory lymphocytes (Treg) in HIV+HCV+ coinfecting patients

Research team: Prof. Tatyana Petrova Penkova - Tchervenyakova, DSc

- Prof. Maria Nikolova, MD, PhD, DSc
- Assist. Nina Yancheva-Petrova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Ivaylo Elenkov, MD, PhD
- Marina Aleksandrova, PhD Student
- Andon Timchev, MD,

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Infectious Diseases, Parasitology and Tropical Medicine, Iv. Geshov str. 17, Sofia 1606

RESULTS: Regulatory CD4 T lymphocytes with inhibitory function (Treg) have a controversial effect in persistent infection by restricting immune inflammation at the expense of effective antigen-specific response. HCV co-infects over 25% of HIV-positive individuals in Bulgaria, changing the clinical course of HIV infection and the effect of antiretroviral therapy (ART). The impact of coinfection on Treg is not clear. We investigated HCV effects on the differentiation and inhibitory potential of Treg, and hence on T-cell response and immune recovery in the course of ART. 25 HIV/ HCV+ and 25 HIV+ subjects were tested before and during 12-month ART, and compared to HCV-monoinfected and healthy controls. Using multiparameter flow cytometry a detailed phenotypic analysis of peripheral blood effector and regulatory T cells was made. Non-specifically stimulated cytokine secretion (IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IL-10) was assessed in the presence of, and after immunomagnetic depletion of Treg. HCV coinfection had a significant negative impact on immune recovery (CD4AC and its increase) in spite of suppressed HIV viral load. Both HIV + groups were characterized by accelerated differentiation of effector CD4 and CD8 T in the presence of increased Treg subset. Coinfection further suppressed IL-2, IFN γ , and IL-17 production and increased IL-6 / IL-2 ratio, regardless of ART. HCV/HIV coinfection was characterized by narrowed plasticity of the regulatory pool and significantly increased CD39+Treg subpopulation with pronounced suppressor effect. Treg removal had a significant beneficial effect in conditions of co-infection: it led to prevalence of IL-2+ and IL-10+ over Th17 clones, possibly limiting hepatic fibrosis. However, Treg depletion in HIV monoinfection promoted a Th2 profile due to the exhaustion of Th1 effectors. Our results highlight the need for concurrent antiretroviral therapy of HIV and HCV infection, provide background for rational immune monitoring (CD39Treg, IL-6 / IL-2), and for development of immune-based strategies for functional immunological recovery.

Scientific publications and presentations:

- Alexandrova M, Emilova R, Golkocheva-Markova E, et al. HCV coinfection additionally compromises regulatory T cell functions in HIV-positive patients. IVth National Symposium of South Bulgarian Society of Infectious Diseases, Epidemiology and Parasitology: Imported and autoctone exotic infectious and parasitic diseases HIV/AIDS and coinfections. 2016: 54-61.
- Alexandrova M, Golkocheva-Markova E, Timchev A, et al. HCV Co-Infection Compromising the Effects of c-ART—an Insight from the HIV-Positive Population in Bulgaria. Int J Scient Res, 2016; 5 (9):1732-5.
- Alexandrova M. PhD Thesis: Study on the Effector and Regulatory Cellular Immunity Mechanisms in HIV- patients coinfecting with HCV, 2017.
- Alexandrova M, Emilova R, Timchev A, et al. T regulatory cells affect differentially effector T cell response in chronic HIV and HIV/HCV co-infection. Fifth National Symposium of Exotic Infectious and Parasitic Diseases. HIV/AIDS and co-infections. 19-21 Jun 2017, Cigov Chark
- Yancheva N, Alexandrova M, Timchev A, et al. Compromised T cell Response Regulation in HCV Co-Infected HIV+ Subjects. 13th Int Workshop on Co-infection HIV & Hepatitis. 21-23 Jun 2017, Lisbon, Portugal

Contract 92/2016 Role of some genes associated with ovarian function for premature ovarian ageing in women

Research team: Prof. Alexey Slavkov Savov, PhD

- Silvia Andonova-Baklova, MSc
- Assist. Prof. Ralitzia Robeva, MD, PhD
- Tihomir Todorov, PhD
- Maria Glushkova, PhD student
- Assoc. Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of obstetrics & gynaecology, Zdrave str. 2, Sofia 1431, Bulgaria

RESULTS: The aim of the study was to investigate the role of *FMRI* (fragile X mental retardation 1 gene) and *BMP15* (bone morphogenic protein 15 gene) and their association with ovarian function for the development of premature ovarian aging and premature ovarian failure. A total of 20 patients with premature ovarian aging or non-syndromic premature ovarian failure, as well as a control group of 20 healthy women, were examined. In both groups the *FMRI* CGGn polymorphism and *BMP15* gene were investigated by fragment analysis and Sanger sequencing, respectively. Patients with premature ovarian aging had significantly higher CGG repeat number in their shorter *FMRI* allele (27.14 ± 0.38) in comparison to healthy women (24.30 ± 3.64) as well as compared to patients with premature ovarian failure (24.46 ± 3.57) ($p = 0.015$). Two variants with a presumable negative effect on the reproductive function were found only in the group of patients: the c.538G>A/p.Ala180Thr variant, which was already described in other ethnic groups of patients with ovarian dysfunction, as well as the very rare c.269T>C/p.Ile90Thr variant with unknown clinical significance. The latter was found in a patient with intermittent premature ovarian failure. The results suggested that *FMRI* and *BMP15* genes might be associated with the ovarian dysfunction in some Bulgarian patients. Early identification of genetic variants that increase the risk for premature ovarian dysfunction could allow an adequate therapy for women with postponed reproductive plans.

Scientific publications and presentations:

- Robeva R, Andonova S, Glushkova M, et al. Current genetic aspects in the premature ovarian insufficiency. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2017;56(3):32-38
- Glushkova M. Molecular-genetic tests for risk estimation of premature ovarian insufficiency and polycystic ovaries, Plevan Immunology Days 2017, Plevan, 28-30.04.2017

Contract 93/2016 New accents in the diagnostic algorithm, spectrum and frequency of virological agents (parvovirus B19, adenoviruses and Chlamydia trachomatis) involved in the development of pathological pregnancy

Research team: Prof. Borislav Marinov Marinov, MD, PhD, DSci

- Stefka Ivanova - NCIPD
- Svetla Angelova - NCIPD
- Petia Genova-Kalou,
- Silviya Emilova Voleva -IInd UMHAT Sofia

Organization unit: University Obstetrics and Gynecology Hospital “Maichin Dom”

RESULTS: Different methodological approaches have been used in the course of the project with a view to providing data on the circulation of the three infectious agents (parvovirus B19,

adenoviruses and *Chlamydia trachomatis*) among women with pathological pregnancy in the Bulgarian population. This study aimed to enriching the diagnostics algorithm of the laboratory testing in case of clinical complications during pregnancy. Indirect ELISAs based on an antigen-recombinant technique were used to demonstrate specific IgM and IgG class antibodies against parvovirus B19, adenovirus and *Chlamydia trachomatis* in order to demonstrate the presence of acute or past viral/chlamydial infection and their role in case of clinical complications during pregnancy. Molecular biological methods were used: a colon-based method for the extraction of pathogenic DNA according to the starting clinical material (serum) and an amplification assay (PCR test) for the detection of viral DNA (a diagnostic marker for acute infection). An electrophoresis analysis in 2% agarose gel and ethidium bromite was used to visualize the results obtained. A total of 47 serum samples from pregnant women with pathological and risky pregnancies received and diagnosed at the University Obstetrics and Gynecology Hospital “Maichin Dom”, Sofia were studied. Patients were divided into four groups: women with anemia (n = 22), non-immune hydrops fetalis (n = 8), fetal ascites (n = 6) and women suffered spontaneous abortion (n = 11). Among all the samples tested, a acute B19V infection (presence of a serological B19V-IgM marker and/or B19V-DNA) was demonstrated in 9/47 (19.15%), with 7/47 (14.89%) positive results for all B19V tested markers (B19V-IgM, B19V-IgG and B19V-DNA). The highest percentage B19V positive sample were detected among pregnant women with anemia (5/47, 10.63%). The seroprevalence of B19V (specific IgG antibodies) among the total number tested patients was calculated at 40.43% (19/47). On the other hand, 19 of the study patients had no evidence of a B19V infection. The present *Ch. trachomatis* infection (a combination of anti-*Ch. trachomatis* IgM and anti-*Ch. trachomatis* IgG markers) was demonstrated in 11/47 (23.4%) pregnant women. The past *Ch. trachomatis* infection (a positive anti-*Ch. trachomatis* IgG results) was found in 5/47 (10.64%) patients. One of the pregnant women involved in the study was B19V and *Ch. trachomatis* coinfecting with positive results for all tested immunoenzyme and molecular markers. Among all tested samples, acute adenovirus infection (presence of a serological Adenovirus IgM marker) was demonstrated in only 1/47 (2.13%) in the group of patients with anemia. Adenovirus IgG seroprevalence was found in 38/47 (80.85%) of the study women. In view of the varied B19V transmission, namely the transplant pathway, as well as the wide range of complications arising from Chlamydia and adenoviral infection, screening of pregnant women and women of childbearing age for these infectious agents is an important approach in the monitoring of pregnancy.

Scientific publications and presentations:

- Ivanova S, Genova-Kalou P, Voleva S, et al. Infectious Agents and Miscarriage in Bulgaria. Am Sci Res J Engineer Technol & Sci (ASRJETS) 2016;25(1):1-10.
- Voleva S, Ivanova S, Marinov B. Parvovirus B19 and cytomegalovirus associated with pathological pregnancy. Medical Magazine, 38, 2017, 44-48.
- Ivanova S, Voleva S, Marinov B, et al. Algorithm for investigation of pregnant women exposed to the viruses that cause non-vesicular (maculopapular) rash. Proceedings of the VII Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, ISSN 1314-9091, 2016
- Voleva S, Angelova S, Ivanova S, et al. Infectious agents (Parvovirus B19, Rubellavirus, Adenovirus, Chlamydia trachomatis) involved in miscarriage pathogenesis, Xth National Congress of Infectious Diseases. 6-8 Oct 2016, National Palace of Culture, Sofia.

- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Anemic conditions in pregnant women associated with Parvovirus B19 infection, XX National gynecological conference, 16-18 Mar 2017, Borovets
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Parvovirus B19 as a causative patogene in a pathological pregnancy during the 2015-2016 year in Bulgaria. XVI Int Congress for Medical Sciences (ICMS), 11-14 May 2017, MU-Sofia, Bulgaria.
- Voleva S, Krumova S, Angelova S, et al. Seroprevalence of infectious agets (Parvovirus B19 and Chlamydia trachomatis) in women with pathological and risk pregnancy. XV National congress on clinical microbiology and infection of the bulgarian association of microbiologists, Sofia 17-19 May 2017.

Contract 94/2016 Postdural puncture headache after spinal anesthesia for Cesarean section - randomized study comparing spinal needles with Quincke, Sprotte and Atraucan design of the needle tip

Research team: Prof. Silvi Lubchov Georgiev

- Roumiana Ivanova Batova, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Anesthesiology and Intensive care, University Hospital of Obstetrics and Gynecology ‘Maichin dom’

RESULTS: A prospective randomized study was performed which included 449 consecutive spinal anesthetics for cesarean section in a period of 1 year. The aim was to study the impact of the spinal needle tip design on the incidence and severity of postdural puncture headache (PDPH) in the obstetric population. The higher susceptibility of obstetric patients to PDPH is well established. The patients were randomly assigned to receive spinal anesthesia with either the Sprotte 25G, the Atraucan 26G or the Quincke 25G spinal needle. 394 patients were included in the analysis of data. Analysis of the incidence of PDPH showed an incidence of 0% (n=133) in the Sprotte group, 2,3%(n=131) in the Atraucan group and 7,7%(n=130) in the Quincke group. The atraumatic pencil point Sprotte needle tip and the double bevel atraumatic/cutting Atraucan needle tip were found to be associated with significantly ($p=0,009$) lower risk of PDPH as compared to the sharp bevel cutting Quincke needle tip.

Contract 95/2016 Creation or risk model for late preeclampsia by biophysical and biochemical markers in 30- 33 gestational weeks

Research team: Assoc. prof. Zhivka Tsocheva Karagiozova, MD, PhD

- Ibryam Ibryam MD, PhD student
- Prof. Stoimen Ivanov, MD, PhD, DSci
- Prof. Aleksei Slavov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of obstetrics & gynaecology, Zdrave str. 2, 1431 Sofia, Bulgaria

RESULTS: Preeclampsia affects 2-3% of all pregnancies and is one of the leading causes for maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide. The purpose of this study was to

create a screening model for late preeclampsia that would lead to the timely detection of patients at high risk of developing preeclampsia at low false positive rate of the method. For this purpose, 20 pregnant women with high risk of preeclampsia were studied: newly emerged hypertension or proteinuria, US evidence about changes in the uterine artery blood flow. Exclusive criteria: overt preeclampsia, eclampsia and HELLP syndrome. All patients included in the study were given informed consent and completed anamnestic data. Each patient had their blood pressure measured twice on both arms, pulsatility index of both uterine arteries, height and weight. The software of the Fetal Medicine Foundation, London was used for risk assessment based on anamnestic and biophysical data. Serum levels of soluble tyrosine kinase-1 (sFlt-t) and placental growth factor (PLGF) were investigated using Roche reagents. The ratio between the two proteins sFlt-t/PLGF was calculated and 38 was found to be a limit ratio excluding diagnosis Preeclampsia. After all data was obtained, the average time for development of preeclampsia and the need for delivery due to fetal distress was calculated. Results: Classical diagnostic criteria, BP over 140/90 mmHg and proteinuria over 300 mg/24 hours, used to diagnose preeclampsia, are not reliable markers for diagnosis. Their use in the clinical practice detects 72% of the cases with preeclampsia, with 10% false positives. Adding age, parity, weight, and pulsatility index of the uterine arteries to the above criteria increases the sensitivity of the diagnosis to 80%, with 5% false positives. The best prognostic value is the use in the clinical practice of all listed anamnestic and biophysical markers, as well as the sFlt-t/PLGF ratio, which increases the sensitivity of the diagnosis to 99%, with 5% false positives. The average time from the conducting of the research to the development of preeclampsia is two weeks. Based on the results we created a clinical practice protocol to select patients who should be subjected to stricter monitoring and to select those who do not need hospitalization.

Scientific publications and presentations:

- Ibryam I, Karagiozova Z, Savov A, et al. Screening for late preeclampsia, J Akusherstvo I ginekoogia. 2016;(supl. 2):31-6
- Ibryam I, Karagiozova Z, Savov A, et al., Sreening for late preeclampsia; XXXV National obstetrics conference, Elenite resort, 16 – 18.06.2016, page 6
- Ibryam I, Sreening for late preeclampsia, XIV National congress of obstetrics and gynecology, Plovdiv, 26 – 29.10.2017, page 26
- Ibryam I, Ivanov S, Karagiozova Z. Screening model for late preeclampsia, Abstract book, Plovdiv 2017, p 25-6

MEDICO-CLINICAL AREA “GRANT’ 2017”

Contract D-54/02.05.2017 Study of hepcidin’s role in the pathogenesis of atherosclerosis

Research team: Corr. Member of BAS Latchezar Dinchov Traykov MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Prof. Iulia Petrova - MD, PhD
- Assist. Prof. Maria Petrova, MD, PhD
- Todor Kunchev MD
- Prof. Kamen Tzatchev, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Yavor Jelev, MD, PhD
- Petar Jeloazkov, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Neurology, Dept. of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: During this project different methodological approaches are used for the diagnosis of atherosclerotic changes in a. carotis and assessment of iron disorders in the patients included. Immunological ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method with the formation of specific complex antigen-antibody, detected spectrophotometrically is used for quantification of serum hepcidin in the control group and patients with atherosclerotic changes in a. carotis. By turbidimetric method are measured C-reactive protein for substantiation of inflammation, transferrin, and soluble transferrin receptors – for evaluation of iron metabolism disorder, serum ferritin – for evaluation of stored iron in control group and patients with atherosclerotic changes in a. carotis. For risk assessment of atherosclerotic disease are used immunological CLIA (chemiluminescent immunoassay) method for evaluation of homocysteine levels and additional quantification of lipid profile parameters through colorimetric methods. 80 patients are included, diagnosed by a specialist – neurologist with atherosclerotic changes in a. carotis in University “Aleksandrovska” hospital, Dept. of Neurology, with cognitive brain function disorders and with impaired iron homeostasis, evaluated by red blood cells count, MCV, MCH, MCHC, hemoglobin, C-reactive protein, serum iron and total iron-binding capacity, serum transferrin, ferritin and soluble transferrin receptors, outside the reference ranges by gender and age. The results are processed through appropriate statistical methods to determine significance. Included patients’ average age is 62.0 ± 6.8 years. Statistically significant increased serum hepcidin concentrations are established in patients with atherosclerotic changes in a. carotis 56.7 ± 8.3 $\mu\text{g/l}$ – for both genders and ages groups) compared to the control group 20.9 ± 3.0 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.001$. Serum homocysteine 27.1 ± 6.1 $\mu\text{mol/l}$ and LDL-cholesterol (2.5 ± 0.4 mmol/l) levels are statistically increased compared to healthy individuals (2.0 ± 0.3 $\mu\text{mol/l}$), and (1.1 ± 0.2 mmol/l), resp., in patients with atherosclerotic changes in a. carotis, $P < 0.001$. Ferritin concentrations in patients with atherosclerotic changes in a. carotis (271.9 ± 48.4 ng/ml) are increased compared to the control group (122.8 ± 20.4 ng/ml), which confirmed iron deposition in the organism, $P < 0.001$. Concentrations of transferrin (3.1 ± 0.2 g/l) in patients with atherosclerotic changes in a. carotis are increased in comparison to control group (2.4 ± 0.2 g/l), $P < 0.001$. Pathologically elevated are parameters IMT (1.11 ± 0.14) and ABI (1.62 ± 0.13) in patients with atherosclerotic changes in a. carotis compared to control group IMT (0.38 ± 0.11)

and ABI (1.18 ± 0.08), $P < 0.001$. In patients with atherosclerotic changes in a. carotis is established a significant positive correlation between serum hepcidin and homocysteine ($r=0.813$; $P < 0.001$). The relation between serum hepcidin and ferritin ($r=0.756$; $P < 0.001$) is positive. Quantified serum hepcidin correlates significantly positively to IMT ($r=0.882$; $P < 0.001$) and ABI ($r=0.824$; $P < 0.001$) in patients with atherosclerotic changes in a. carotis. A statistically significant increased serum hepcidin levels are observed in patients with atherosclerotic alterations of a.carotis, which causes iron over-accumulation in the wall of a. carotis. Increased serum hepcidin, homocysteine, ferritin, and LDL-cholesterol is established in atherosclerotic changes group ≥ 65 years compared to ≤ 65 years; $P < 0.01$. IMT and ABI parameters are increased too in patients. Mediated oxidative stress from iron further leads to atherosclerotic changes development. Determination of serum hepcidin is still novel in clinical and laboratory practice. The results of the present study contribute for elucidating the role of hepcidin in the pathogenesis of atherosclerotic changes occurring in the blood vessels, thus helping to diagnose and select a suitable therapeutic approach in the treatment of this condition. The relationship between hepcidin and homocysteine serum concentrations, as well as iron homeostasis parameters, is established. A theoretical contribution is the elucidation of hepcidin role and the iron fluxes it regulates in the pathogenesis of atherosclerosis, which improves the risk assessment of this disease. A practical contribution is to introduce the quantification of hepcidin in serum as a marker for early diagnosis of impaired iron metabolism, a trace element involved in the pathogenesis of atherosclerotic changes in blood vessels.

Scientific publications and presentations:

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin quantification in atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis* 2017;43(suppl 1):I-II:52.
- Manolov V, Petrova J, Vasilev V, et al. Role of hepcidin in the pathogenesis of atherosclerosis. *Med Rev* 2017;53(3):16-23.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Evaluation of iron homeostasis in patients with atherosclerosis. 3rd Eur Stroke Organization Conference. 16-18.05.2017, Prague, Czech republic
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin quantification in atherosclerosis. 26 Eur Stroke Conference. 24-26 May 2017, Berlin, Germany
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Quantification of serum hepcidin in patients with atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:S1483-S1505.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Quantification of serum hepcidin in patients with atherosclerosis. 23 Int Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC World Lab 2017). 22-25 Oct 2017, Durban, South Africa

Contract D-60/02.05.2017 Contemporary molecular diagnostic techniques for detection of herpes virus (HSV-1, HSV-2, and VZV) infections in suspected patients or patients with an unclear clinical picture

Research team: Assoc. Prof. Vessela Vaskova Raykova, MD, PhD

- Assist. Nikolai Kalvatchev, PhD
- Assist. Radoslav Baykushev
- Corresp. Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave str., 1431 Sofia

RESULTS: Herpesviruses are characterized by the development of latent infections, persistent carriers, frequent recurrences. Rapid and accurate laboratory diagnosis, distinguishing them within the family itself, as well as infections with other agents, is crucial when the patients are with unclear manifestations, CNS infections, or when the patients are immunocompromised, transplanted or multiple pathologies. The aim of this project was the introduction of In-home Real-time PCR amplification programs for the detection of HSV-1, HSV-2 and VZV infections, and to compare them with commercial kits. The other purpose was to apply them for testing samples from patients with complications or unclear clinical manifestations. For this reason, 44 patients with different diagnoses were studied (23 children, 5 men, 16 women, including 3 pregnant women). DNA extraction from the taken samples was made and it was subsequently subjected to PCR detection. Three different In-home amplification programs have been developed and optimized using TaqMan real-time. The newly-introduced In-home Real-time PCR method for the detection of HSV-1, HSV-2 and VZV and commercial kits for detecting the same viruses yielded identical results. Different herpes virus infections were detected respectively in 14 children, 3 men, 9 women, 2 of whom pregnant. In conclusion, the rapid detection of HSV-1, HSV-2, and VZV by real-time PCR is a suitable method for proving herpes viral infections in the modern microbiology laboratory. Testing through the newly introduced In-home amplification systems to demonstrate HSV-1, HSV-2 and VZV helped to identify suspected patients for herpes virus diseases and to start appropriate therapy. The sensitivity, specificity and results of these In-home systems fully correlate with the results obtained from commercial kits and could be safely used and implemented in routine practice.

Scientific publications and presentations:

- Raykova C. An atypical clinical case of zoster infection in a two-year-old child. Health and Science 2017;4(028):30-2.
- Raikova B, Lozanova P. The Challenges of varicella-zoster virus infection during pregnancy. Spring Varna dermatological days, 12-15 Apr 2018

Contract D-96/02.05.2017 Evaluation of upper incisors coverage of the upper lip at rest and during smile

Research team: Prof. Laura Stefanova Andreeva- Gurgurieva, DMD, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Vladimir Petrunov, DMD, PhD
- Assist. Prof. Martin Mariyanov, DMD, PhD
- Neli Dilkova, DMD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of dental medicine, Dept. of Orthodontics, 1st George Sofiyski Str., 1432, Sofia

RESULTS: Good photo documentation is an integral part of complete orthodontic diagnostics. Until now, a protocol with precise parameters for the creation of orthodontic-specific photos has not been established. Furthermore, the ratio of central incisors / upper lip at rest and during smile of different types of skeletal orthodontic deformities has not been studied. Aim: To create a method of evaluating the upper incisors coverage of the upper lip at rest and during smile. Material and Methods: With the help of flash equipment, a protocol was developed with the most

suitable parameters for shooting the best possible orthodontic photo. 90 patients from the three skeletal classes of orthodontic deformities were selected, meeting well-defined patient selection criteria. Their frontal extra-oral photos were examined at rest and during smile in order to determine the degree of coverage of upper incisors of the upper lip in both conditions. Results: A variety of upper incisors coverage of the upper lip has been found in the different classes of skeletal deformations - I, II and III, as well as the various types of accompanying orthodontic deformities. The relationship between the degree of incisor coverage and the presence of different types of bad habits or malfunction was also found. Conclusions: A protocol for the orthodontic photo documentation was created. A protocol was established to evaluate the upper incisors coverage of the upper lip in different skeletal deformities. We determined what are the deviations of concomitant deformations. The upper incisors coverage by the upper lip in the presence of a harmful habit and/or malfunction was also established. Protocols for the preparation of photo documentation for orthodontics and a photo-shooting protocol for the various types of skeletal orthodontic deformations has been promoted through a specialized scientific journal.

Scientific publications and presentations:

- Mariyanov M, Dilkova N, Petrunov VI, et al. Photographic documentation in orthodontic practice – extraoral images, *Orthodontic Review*, 2017;19(2):11-20
- Mariyanov M, Dilkova N, Petrunov VI, et al. Photographic documentation in orthodontic practice – intraoral images, *Orthodontic review*. 2018;1

Contract D-98/02.05.2017 Investigation of HLA genes, HLA molecules and other factors in patients with oral squamous cell carcinoma

Research team: Assoc. prof. Dimitar Todorov Yovchev, MD, PhD

- Assoc. Prof. Elitsa Deliverska- Aleksandrova, PhD, DMD
- Prof. Milena Shivarova, PhD, MD
- Prof. Radomir Ugrinov, PhD, DMD, DSci
- Prof. Elisaveta Naumova, PhD, MD, DSci
- Assist. Prof. Hristo Stoyanov, PhD, DMD
- Assist. Prof. Lutchezar Petkov, DMD
- Velizar Shivarov, PhD, MD -University Hospital “Sofamed”
- Bushra Al- Hadra, PhD student
- Tsvetelin Ivanov Lukanov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental medicine

RESULTS: Major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) is a ligand of Natural killer group 2, member D (NKG2D) receptor. Recent studies have shown that MICA is up-regulated in tumors from the epithelial origin, playing a key role in immunological surveillance and different alleles are associated with diseases related to NK activity. The aim of our study was to analyze the role of MICA allelic polymorphism investigated by DNA sequencing and correlation with serum levels of sMIC molecules as possible biomarkers for oral squamous cell carcinoma (OSSC). Sixty-nine patients with histologically proven OSSC were included in the study. The control group included healthy subjects from the Bulgarian population. MICA genotyping was performed by DNA sequencing method implemented within

the project. ELISA method (MICA Human ELISA Kit (Invitrogen)) was implemented to analyze serum levels of sMICA. Our results showed statistically significant predisposing association for MICA*008 allele ($P < 0.05$, OR-2.73), encoding the truncated protein. Despite increased mean levels of sMICA in patients (73,8 pg/ml) compared to the control group (47,2 pg/ml), a statistically significant correlation was not observed. Our results show a statistically significant correlation between alleles encoding truncated proteins, and corresponding genotypes and increased levels of serum sMICA. Although our data are preliminary considering the small number of patients analyzed, the associations observed support the model that alleles encoding truncated, ectopic and soluble MICA molecules play an important role in OSSC by downregulation of NKG2D on NK and CD8+ T cells leading to aberrant immunological surveillance.

Scientific publications and presentations:

- Al Hadra B, Ivanova M, Deliverska E, et al. Role and Characteristics of MICA in Cases of Oral Squamous Cell Carcinoma. J Zdrave i Nauka 2017, Jun:2-6
- Al Hadra B, E Deliverska, H Stoianov, et al. Investigation of HLA genes, HLA molecules and other factors in patients with oral squamous cell carcinoma. J of IMAB, 2018,24(3):2133–41
- Al Hadra B, Deliverska E, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. 31st EFI & 25th DGI Joint Meeting, 30.05-03.06.2017, Mannheim/Heidelberg
- Al Hadra B, Deliverska E, Stoianov H, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. First young scientists seminar on genetics. 24 Nov 2017, Sofia.
- Al Hadra B, Ali S, Deliverska E, et al. Mica associations with oral squamous cell carcinoma. ICMS Int Congress, 10-13 May 2018, Sofia, Bulgaria
- Al Hadra B, T Lukanov, E Deliverska, et al. MICA associations with oral squamous cell carcinoma. V National congress of immunology. 25-28 Oct 2018, Plovdiv

Contract D-99/02.05.2017 Effectiveness of periodontal plastic microsurgery for the treatment of root dentine sensitivity

Research team: Assoc. prof. Elitsa Georgieva Deliverska- Aleksandrova, PhD, DMD

- Assist. prof. Denislav Emilov, DDS

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental medicine, Dept. of Oral and Maxillofacial surgery, Sofia 1431, 1 Georgi Sofiyski Blvd.

RESULTS: Microsurgery has made significant advances in periodontal surgery in recent years and is most commonly associated with plastic-aesthetic periodontal surgery. The aim of the study is to evaluate the effectiveness of the root coverage by microsurgical techniques (periodontal plastic microsurgery) in the reduction of RDS in Miller Class I and Miller Class II gingival recessions. 30 patients with Miller Class I and Miller Class II gingival recessions with RDS were selected. There are no restorations and defects on the root surface. Half of the patients selected on the accepted criteria were treated with periodontal plastic microsurgery (subepithelial connective tissue graft and coronary flap). RDS was evaluated before microsurgery and 2 months after surgery. The control group included 15 selected patients on the same criteria and complaints, and a conventional anti-sensitizing agent-gel (Sensigel) was administered. The results show statistical significance in favor of microsurgical treatment in the treatment of

patients with gingival recession and the presence of severe root sensitivity ($P = 0.043$). Although due to the relatively small number of patients surveyed, the results of the study may be considered preliminary, they support data from the literature that periodontal plastic microsurgery may be perceived as a minimally invasive method for treating RDS in Miller Class I and Miller Class II gingival recessions.

Scientific publications and presentations:

- Emilov D, Deliverska E. Surgical treatment of gingival recession with soft tissue graft procedure. *J of IMAB*, 2018 Jul-Sep, 24 (3), 2149-59
- Deliverska E, Emilov D, Al-nasrawi D. Gingival augmentation in a patient with insufficient attached gingiva – a case report. ICMS-10-13 May 2018
- Emilov D, Deliverska E. Treatment of gingival recession with hypersensitivity using free soft-tissue graft procedures. IMAB 13-16 May 2018

Contract D-100/02.05.2017 Effectiveness of photodynamic therapy compared to chlorhexidine chip (Periochip®) in the treatment of periodontal pocket

Research team: Prof. Christna Lazarova Popova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Kamen Kotsilkov, MD, PhD
- Assist. Prof. Diana Yaneva, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Periodontology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: The purpose of the present scientific study is to compare the clinical and microbiological effectiveness of two different topical antimicrobial agents applied after the initial mechanical therapy of deep periodontal pockets - Periochip and photodynamic therapy and to assess their impact on the early pocket recolonization. The patients participating in the project were divided into two groups of 10 people. Each of them was having at least one periodontal pocket ≥ 7 mm and ≤ 10 mm in two different quadrants. One pocket of each patient was treated with an additional antimicrobial agent, and the other pocket was controllable. All patients received a complete periodontal (clinical and microbiological) diagnosis and non-surgical periodontal therapy was performed. The analysis of clinical results showed that no differences in the probing pocket depth and clinical attachment loss were demonstrated in the adjunctive use of the antimicrobials therapy at early detection of the result. However, this adjunctive therapy is associated with better microbiological results than non-surgical therapy alone. Comparing of both types of additional antimicrobial therapy showed a greater reduction in probing pocket depth in the group treated with Periochip (average 1.9 mm) than in the group treated with photodynamic therapy (mean 0.7 mm). The two groups showed an identical difference in clinical attachment gain, averaging 0.2 mm and 0.3 mm, respectively. The microbiological results indicate that the group treated with chlorhexidine chip showed a reduction in highly pathogenic red complexes (*P.g.*, *T.d.*), whereas the other group demonstrated a reduction in the moderately pathogenic agent of the *C.g.* The results obtained contribute to a better understanding of the microbiology of severe periodontitis as well as the effects of additional topical antimicrobial therapy, therefore have theoretical significance for the diagnosis and therapy of periodontitis. The results shown in a limited number of patients due to limited funding indicate that further

studies on a larger number of patients are needed for a longer follow-up period for a stronger conclusion about the adjunctive antimicrobial therapy of the pocket for periodontitis.

Scientific publications and presentations:

- Yaneva D. H Popova, K Kotsilkov. Adjunctive antimicrobial therapy of the periodontal pocket”. Problems of dental medicine. 2018;44(1).

Contract D-101/2017 Presence of il-8 gene polymorphism and il-8 serum levels in patients with chronic periodontitis

Research team: Assoc. prof. Antoaneta Miteva Mlachkova, MD

- Prof. Christina Popova, MD, PhD
- Assist. Prof Velitchka Dosseva-Panova
- Assist. Prof. Denislav Emilov
- Maja Kicheva, PhD - Progen Ltd

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Periodontology, 1 George Sofiiski str. 1431 Sofia

RESULTS: The aim of the current investigation is to establish the presence of IL-8 gene polymorphism and serum levels to IL-8 in patients with chronic periodontitis. The results of this study are statistically processed and represented at tables and graphics. In the recent study 35 patients (24 females and 11 males) are included with diagnosis moderate to severe periodontitis. Periodontal important parameters such as PD, CAL, and bone loss are included. The level of IL-8 in the patient’s serum is tested by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The presence of IL-8 polymorphism in loci rs4073 (-251A/T) and rs2227307 (-396T/G) is established by PCR. The analysis of the current assay established statistically significant correlation between: HI and PBI–severity and HI and BOP; significant correlation between PBI severity and PD average and bone loss; strong correlation between BOP and bone loss; significant correlation between PD 3-5mm and PD \geq 7mm and CAL average, also strong correlation between PD \geq 7mm and bone loss. The investigation about the phenotypic distribution has shown 6 predominant genotypes of IL-8 polymorphism: rs4073 (-251A/T) and rs2227307 (-396T/G): GT/AT; TT/TT; TT/AT; GG/AA; GG/TT and TT/AA. The highest percent is the GT/ AT – 65.71 % genotype, and the TT/TT - 22.86% genotype. The results have shown that the biggest interrelationship observed is between the presence of GT/AT genotype and TT/TT genotype and distribution of PD 5-7mm and PD \geq 7mm ($p < 0.09$). It’s been established that the distribution of BOP is higher in male patients ($p < 0.04$). The higher distribution of shallow pockets PD $<$ 3mm is encountered in female patients ($p < 0.04$). The bigger distribution of deep pockets PD $>$ 7mm is found in male patients ($p < 0.02$). In the recent study have shown that the significance of the presence of IL-8 polymorphism and the presence of serum levels of IL-8 in patients with chronic periodontitis can not establish a significant correlation with the investigated clinical parameters that are connected to the severity of periodontitis.

Scientific publications and presentations:

- Mlachkova A, Dosseva-Panova V, Popova C. Presence of IL- 8 gene polymorphisms and IL- 8 serum levels in patients with chronic periodontitis - a literature review. Folia Medica 2018

Contract D-102/02.05.2017 Comparative in vitro assessment of degree removal smear layer and decontamination and the ability of creation of endodontic monoblock with two different irrigating protocols

Research team: Prof. Radosveta Ivanova Vassileva, DMD, PhD

- Assoc. Prof. Angela Gusiyska, DMD, PhD
- Elvira Tsoleva, MD
- Assoc. Prof. Raina Gergova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine

RESULTS: Chitosan has high antibacterial properties, chelating ability, biocompatibility and biodegradability. Sodium hypochlorite (NaOCl) is considered „the gold standard” irrigant solution. The aim of this in vitro study was to assess the antibacterial and conditioning effectiveness of chitosan-citrate 0,6% as an irrigant and to compare with NaOCl 2,0%. Thirty extracted teeth were used for the purpose of the *in vitro* antibacterial assessment. Group I (n=15) – after inoculation with *E.faecalis* disinfection with NaOCl 2,0%. Group II (n=15) - after inoculation with *E.faecalis* disinfection with chitosan-citrate 0,6%. Teeth were evaluated the colony-forming units (CFU/mL) and SEM analyzed. Twenty extracted teeth were used for the *in vitro* conditioning assessment. Group I (n=5) – irrigation with classical protocol (NaOCl 2,0%, EDTA 15%, distilled water) and root-canal obturation with AH Plus (*Dentsply, Maillefer*, Switzerland), Group II (n=5) – irrigation with modified protocol (NaOCl 2,0%, chitosan-citrate 0,6%, distilled water) and root-canal obturation with AH Plus, Group III (n=5) - irrigation with classical protocol and root-canal obturation with TotalFill BC (*FKG Dentaire SA*, Switzerland), Group IV (n=5) - irrigation with modified protocol and root-canal obturation with TotalFill BC. Teeth were SEM and light microscope observed. The assessment of CFU/mL showed significant reduction of the survival rate of *E. faecalis*. SEM after disinfection with chitosan-citrate 0,6% illustrated minimum bacterial biofilm. All teeth irrigated with modified protocol included chitosan-citrate solution showed SEM less apical microleakage (Mean in Group II and IV - 7.94 μm and 4.33 μm) than these irrigated with conventional protocol (Mean in Group I and III – 12,51 μm and 11,96 μm). There is not presence of statistically significant difference ($p < 0.05$) between teeth obturated with AH Plus and TotalFill BC. Chitosan-citrate 0,6% showed high antibacterial and conditioning effectiveness and enabled removal of bacterial biofilm.

Scientific publications and presentations:

- Gyulbenkiyan E, Gusiyska A, Vassileva R, et al. Evaluation of antibacterial properties of chitosan-citrate solution – an *in vitro* study. Int J Recent Sci Res. 2018, 9(3):25237-40.
- Gyulbenkiyan E, Gusiyska A, Vassileva R, et al. Evaluation of antibacterial properties of chitosan-citrate solution – an *in vitro* study. 10th Balkan Congress of Microbiology. Microbiologia Balkanica 2017, Sofia, Bulgaria, 16-18 Nov 2017

Contract D-103/02.05.2017 Digital protocol for the analysis and treatment of functional and aesthetic problems in patients with cleft, lip and/or palate

Research team: Assoc. Prof. Dimitar Andonov Filchev, PhD

- Assist. Prof. Vyara Velikova
- Radost Velikova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Prosthetic Dentistry, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: Prosthetic rehabilitation and recovery in patients with cleft lip and palate are dependent on the severity of functional and anatomical changes. For a simple and complete assessment of soft and hard tissue in patients with clefts, we created a digital checklist (digital questionnaire), which supports decision-making on the type of prosthetic treatment and the preparation of an individual smile recovery plan-the main subject of the project. It is an internet-based platform, which includes a menu with several subdivisions/fields: Photos; Face analysis; Dentolabial analysis; Dental analysis; Phonetic analysis. It provides the opportunity to complete and save a file for each patient, to monitor the outcome of the treatment. A prosthetic classification of types of defects has been developed in patients with congenital anomalies according to which different types for appropriate treatment are offered. The established prosthetic classification of dental defects aims to facilitate the creation of a common classification for prosthetic treatment and to facilitate the choice of treatment for patients with cleft lip and palate. From the ten patients treated, were presented in clinical cases, which are describing the most common defects for the prosthesis. The prosthetic treatment of the participants in the project are: fixed maryland bridge and crowns, ceramic veneers and crowns from Lithium Disilicate ceramics. The methodology includes taking a case history, signing a declaration of informed consent for participation in the survey, paraclinical examinations, and photos which are filled in the digital questionnaire. Upper and lower teeth are scanned with an intraoral chamber; Introduction of scanned information into a software program for smile digitalization and designing of a digital smile is made; a preliminary impression of the upper and lower jaws with C-silicone and whole metal trays are taken. All this is followed by face bow registration and mounting the models into an articulator. Preparation of a wax modeling on the digital smile design in the frontal area and in the distal section for balancing of the occlusal contacts in the articulator. Visualization of the wax modeling, by making of a silicon index and composite material for temporary constructions – mockup.

Contract D-109/02.05.2017 Intraoperative radiotherapy assessment (IORT) in the treatment of breast carcinoma

Research team: Assoc. Prof. Svilen Ivanov Maslyankov, MD, PhD

- Prof. Georgi Todorov, MD, PhD
- Assist. Prof. Mariela Vasileva- Slaveva, MD, PhD
- Assist. Prof. Vasil Palvov, MD, PhD
- Assist. Prof. Iliya Fidoshev, MD
- Assist. Prof. Petar Gribnev, MD
- Niya Petrova, MD
- Assist. Prof. Desislava Kostova-Levterova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Surgery, University Hospital “Alexandrovska”, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: Treatment of breast carcinoma requires a complex approach. It includes at least biopsy, operative intervention and postoperative radiotherapy. The use of intraoperative radiation therapy (IORT) achieves minimal involvement of surrounding tissues and shorter treatment times with comparable long term results. This study includes 9 patients with early-stage breast cancer selected in accordance with the ASTRO (American Radiation Oncology) criteria of 2016. Diagnostic and curative approaches include: thin needle biopsy, Sentinel Lymph Node Biopsy (SLNB) and IORT with Axxent XP 1100, Xofigo, inc. The surgical team was specifically trained for the procedure. After obtaining an informed consent, patients were scheduled for elective surgery. The diagnosis was made preoperatively. The type and receptor status of the carcinoma was defined. The Multidisciplinary oncology team (MDT) at the hospital makes an individual decision to perform an IORT for each patient. The procedure begins with determining the status of the SLNs, pre-tagged with ^{99m}Tc -MIBI PRL. They are identified and sent for a frozen section examination. In cases in which the SLNs are negative, the procedure is completed with excisional biopsy with free margins. The average tumor size is 16 mm (8 - 24 mm). All three sizes of applicators are used: 4 sizes 3/4cm, 4 - 4/5 cm and 1 - 5 / 6cm. The average irradiation time is 11.86 minutes (8.38-18.02). Patients were followed up to one year postoperatively. No early and late complications related to the application of IORT have been observed. No local and systemic evidence of progression of the underlying disease was reported. An excellent cosmetic result has been verified. The application of IORT is a good option for women diagnosed with early-stage breast carcinoma. The method attracts the attention of patients due to their considerable convenience, short treatment times and excellent cosmetic results. Further studies are needed to refine the selection of patients for IORT, which will ultimately determine the role of this method in the treatment of breast carcinoma.

Scientific publications and presentations:

- Zahariev Z, D Kostova-Lefterova, S Masliankov, et al. Intraoperative Electronic Brachytherapy in Patients with Breast Cancer. XVI Congress of Surgery, Oct 2018

Contract D-110/02.05.2017 Research and evaluation of the diagnostic and prognostic role of acute phase proteins IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-9 and procalcitonin as predictors of early insufficiency of anastomosis after anterior resection of the rectum

Research team: Prof. Dimitar Ivanov Bulanov, MD, PhD

- Assoc. Prof. Dimitar Bulanov, PhD
- Lilia Simonova, MD
- Assist. Prof. Dragomir Dardanov, PhD
- Assist. Prof. Evgeni Zhivkov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Valentin Popov, PhD
- Assist. Prof. Julieta Hristova-Dimitrova, PhD

Organization unit: Medical University - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of General and Operative Surgery, University Hospital „Aleksandrovska“

RESULTS: The number of patients we conducted our studies was reduced from 60 to 20 patients, according to the amount of MU. We examined IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-9 and Procalcitonin from venous blood and drainage secretion taken at 2 and 5 POD. Increasing Procalcitonin to 2d blood of the patient with one new unit (20 old units) leads to an increase in

the risk of Insufficiency from 1 to 1.037 - about 4%. The increase of Procalcitonin in 5d blood of the patient with one new unit (20 old units) results in an increase in the risk of Insufficiency from 1 to 1.053 = 5.3%. The increase of TNF- α in 5d-dren with one new unit (20 old units) leads to an increase in the risk of Insufficiency from 1 to 1,088 = 9%. The maximum value of TNF- α 2d blood, Sensitivity + Specificity is 1.75 and is reached at a value of TNF- α 2 μ blood 0.0335. Therefore, values less than or equal to 0.0335 indicate Absence with a sensitivity of 100% and a specificity of 75%. The maximum value of TNF- α 5d dren, Sensitivity + Specificity is 1,765 and is reached at a TNF- α value of 5 μ dren 29,09. Consequently, values greater than or equal to 29.09 refer to Insufficiency with a sensitivity of 100% and a specificity of 76.5%. The maximum value of IL-6 2d blood Sensitivity + Specificity is 1,857 and is reached at a value of IL-6 2e blood approximately 6.31. Therefore, values less than or equal to 6.31 indicate Insufficiency with a sensitivity of 100% and a specificity of 85.7%. Of the acute phase proteins in our study three of them have significance for the establishment of an early insufficiency of the anastomosis after anterior resection of the rectum. Procalcitonin - examined in the patient's blood on 2 and 5 postoperative days. TNF- α - examined in the patient's blood of 2 POD and examined from 5 POD drenched material. IL-6 examined in the patient's blood of 2 POD is forthcoming

Contract D-111/02.05.2017 Investigating diagnostic and prognostic value of fibronectin in patients with solid tumors

Research team: Assist. Prof. Vasil Marinov Pavlov, MD, PhD

- Mariela Vasileva-Slaveva, MD, PhD
- Prof. Georgi Todorov, MD, PhD
- Assoc. prof. Svilen Masliankov, MD, PhD
- Assist. prof. Angel Arabadjiev, MD, PhD student
- Assoc. prof. Theophil Sedloev, MD, PhD
- Slaviana Usheva, MD, PhD student
- Assist. prof. Alexandrina Vlahova, MD
- Assist. prof. Antoaneta Mladenova, MD, PhD
- Assist. prof. Julieta Hristova-Dimitrova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine

RESULTS: This is a prospective case-control study investigating the diagnostic and prognostic value of serum levels of fibronectin (FN) in patients with colon, breast and gastric cancer. Serum levels of fibronectin are investigated with ELISA method (enzyme-linked immunosorbent assay). The statistical methods used are the nonparametric tests: Fisher exact test, Wilcoxon rank sum test and ROC curve analysis. Up to 02.11.2018 ninety three samples are collected. The serum levels of FN are investigated in sixty eight. 32 are from patients with colon cancer, 26 from breast cancer patients, 5 from gastric cancer patients and 5 healthy controls. Statistically significant association was found between the preoperative radiotherapy and FN levels, which shows that the interpretation of the test results must take into account the preoperative therapy. Beside this statistically significant association was found with the presence of lymph node metastases in colon cancer patients, independently of preoperative radiotherapy. This result confirm our hypothesis that FN can be used as markers for lymph node metastases, as it is a product of cells gone through epithelial mesenchymal transition. There is no statistically

significant association between the levels of FN and presence of metastases or other tumor characteristics in breast cancer patients. To evaluate the diagnostic value of FN, analysis of bigger healthy controls sample collection is necessary.

Contract D-112/02.05. 2017 Bio image examinations of cell physiology of primary human cell cultures, isolated from *in vivo* intraoperative treated with trypan blue anterior lens capsules of patients with age-related cataract and congenital cataract

Research team: Prof. Iva Todorova Petkova, MD, PhD

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Ivan Tanev, MD, PhD
- Assist. Prof. Antonia Isaeva, PhD
- Viara ShoumnaIieva-Ivanova, MD
- Assist. Prof. Violeta Dimitrova, PhD student
- Vasil Haykin, MD, PhD student

Organization unit: University Hospital “Alexandrovska”, 1 Georgi Sofiiski Str., 1431 Sofia

RESULTS: In the current study, the primary LENS cultures from *in vivo trypan blue*-stained and non-stained anterior capsules, collected from the capsulorhexis procedure during cataract surgery of 8 ARC (age-related cataract) patients and 8 type 2 diabetic cataract patients (all between 55 and 75-year old), were established for the first time. An initial outgrowth of leader cells was observed in all capsules cultured, but this outgrowth occurred after a latent period of 6 days (mean=5,875, n=8) and 9 days (mean=8,875, n=8) for capsules from ARC patients and type 2 diabetic cataract patients, respectively. No difference in the latent period of *in vivo trypan blue*-stained and non-stained capsules from every type cataractous patients was detected. The cell population doubling time of the cultures, isolated from the two type cataractous patients, has been found to be different– the primary LENSs, isolated from type 2 diabetic cataract patients were reaching 70% cell confluence for a week longer culturing period compared to LENSs, isolated from ARC patients. The elongated time of LENSs from type 2 diabetic cataract patients was a result of their lower motility and proliferative rate compared to those detected in LENSs from ARC patients. BrdU-labeled newly synthesized DNA and FOXM1 expression was found in 55,76% and 33,45% of cells into LENSs cultures, isolated from ARC patients and cultures from type 2 diabetic cataract patients, respectively. The different motility and proliferative rate of the LENSs from the two type cataractous patients affects their clonogenic potential. LENSs from ARC patients were 3 times more potent than LENSs from type 2 diabetic cataract patients. No difference in proliferative rate and clonogenic potential of LENSs from *in vivo trypan blue*-stained and non-stained capsules from every type cataractous patients was detected. Summarized, our original results suggest that the main cell culture’s characteristics of primary LENSs are reflected by the type of cataract *in vivo*. Therefore, *ex vivo* cultures of the lens capsule explants from Bulgarian cataractous patients can be used in different fields of clinical and scientific practice.

Contract D-113/05.02.2017 A predictive model for evaluation of pre-transplantation cross-match and antibody mediated reactivity in kidney transplantation

Research team: Prof. Elisaveta Yordanova Naumova, MD, DSci

- Prof. Elisaveta Naumova, MD, PhD, DSci
- Prof. Anastasiya Mihaylova, PhD
- Assoc. Prof. Milena Ivanova-Schivarova, PhD
- Petya Stefanova Yankova, MD
- Assoc. Prof. Todor Kundurzhiev, PhD
- Atanaska Georgieva, PhD
- Tzvetelin Lukanov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, University Hospital “Alexandrovska”, Dept. of Clinical Immunology and Stem Cell Bank, 1 St. George Sofiiski Str., 1431 Sofia

RESULTS: The importance of cross-matching to determine compatibility between a donor and recipient of kidney transplants (KT) is indisputable. Solid phase assays for human leukocyte antigen (HLA) antibody detection allow us to determine the cross-matching reactivity according to the alloantibody profile of the recipient and the antigen incompatibility of the donor (virtual crossmatch v-XM). The aim of our work was to evaluate the humoral alloreactivity in patients awaiting kidney transplantation and to develop a method for predicting positive pre-transplant crossmatch and risk of antibody-mediated immune response in kidney transplantation. Alloantibodies analysis showed: Predominance of anti-HLA class I +II antibodies (50%) in allosensitized patients (n=109), followed by anti-HLA class I antibodies (33%), and anti-HLA class II antibodies (17%); A significant correlation between two types of sensitization and a presence of antibodies was not demonstrated; The majority of anti-HLA-A locus antibodies were directed against HLA-A2 (30,3%), A23 and A25 (33,9%), and A24(40,4%). The strongest immune response was to HLA-A2; The most common HLA-B serotypes were HLA-B49(42,2%); B57 and B58(39,4%); B76(36,7%), B13(37,6%), B51, B52 and B77(35,8%); B53(34,9%), B27(33,9%), B44 (33%)%; B7, B47 and B62(32,1%); Anti-HLA-C locus antibodies were weaker and not that common; Anti-HLA-DR antibodies were mostly directed against HLA-DR4 (32,1%), DR7 and DR9(28,4%); Anti-HLA-DQ7, DQ8 and DQ9 (HLA-DQB1*03) were the most common antibodies (48,6%) against DQB but there were also found antibodies against DQA; Anti-HLA-DPB1 antibodies were mostly against HLA-DPB1*03 and DPB1*05 allele groups. Based on our analysis of HLA distribution in the healthy control group from the Bulgarian population (n=204) and antibodies in patients, we showed that recipients with anti-HLA-A2 antibodies are most likely to have antigen incompatibility. Our evaluation of donor specific anti-HLA antibody (DSA) showed that the DSA results don't always coincide with the results of the cell-based crossmatch and alloantibody profile. The Virtual cross-match could be a useful predictive tool, but unexpected T(+)/B(+), T(+)/B(-) reactions due to the presense of DSA could be observed. Unexpected T(-)/B(+) cross-match is most commonly due to autoantibodies.

Scientific publications and presentations:

- Yankova P, Mihaylova A, Ivanova M, et al. Positive flow cytometry crossmatch in kidney recipients initially negative for donor-specific antibodies. Nephrology, dialysis, and transplantation 2018
- Mihaylova A, Yankova P, Antonova A, et al. Positive T-cell and negative B-cell flow cytometry crossmatch due to HLA-B donor-specific antibodies. 4 The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: 43rd Annual Meeting 11-15 Sep 2017, USA
- Mihaylova A, Yankova P, Antonova A, et al. Unexpected flow cytometry crossmatch reactivity in patients awaiting kidney transplant, 32 Eur Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), May 9-12, 2018

Contract D-114/02.05.2017 Micro- and macrovascular changes in nonalcoholic fatty liver disease with or without carbohydrate disturbances

Research team: Prof. Zdravko Asenov Kamenov, MD, PhD, DMedSci

- Prof. Ludmila Vladimirova, MD, PhD, DSci
- Prof. Asen Alexiev MD, PhD, DSci
- Prof. Radina Ivanova-Boyanova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Raya Ivanova MD, PhD
- Assist. Vera Karamfilova, MD
- Assist. Antoaneta Gateva, MD, PhD
- Assist. Cvetelina Velicova, MD, PhD
- Assist. Nadejda Milcheva MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, University Hospital “Alexandrovska”, Clinic of Endocrinology, 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

RESULTS: In the study were included 79 patients with ultrasound established liver steatosis, aged 50,95±11,11 years old, divided into 2 groups – group 1 with obesity without carbohydrate disturbances (n=41), and group 2 with obesity and prediabetes (n=38), that were similar in age, antropometric indices and the presence of classical cardiovascular risk factors. We found similar levels of the markers for microvascular and macrovascular complications in both groups. RBP-4 is with increased levels in patients with NAFLD and prediabetes, as well as in those with metabolic syndrome and NAFLD, compared to patients with obesity and NAFLD without metabolic syndrome and carbohydrate disturbances. At levels of RBP4 ≥ 61 , as opposed to those at lower levels, the risk of developing carbohydrate disturbances is 3,5 times higher. Lumican is with increased expressions in patient with NAFLD, obesity and prediabetes compared to patients with NAFLD and obesity, without carbohydrate disturbances. At levels of Lumican $\geq 0,07$, compared to those at lower levels, the risk for developing carbohydrate disturbances is 3,9 times higher. Chemerin is not expressed differently in patients with NAFLD, obesity and prediabetes, as well as in those with NAFLD and obesity without carbohydrate disturbances, but it correlates with the index of liver steatosis. There was no correlation between the studied markers and the indices of micro- and macrovascular risk.

Contract D-116/02.05.2017 Surgical reconstruction of the ocular surface in patients with limbal stem cell deficiency by transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells

Research team: Assoc. Prof. Ivan Vesselinov Tanev, MD, PhD

- Rozaliya Dimitrova, MD, PhD student
- Yani Zdravkov, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Ophthalmology, University Hospital “Alexandrovska”, Clinic of Ophthalmology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: Limbal stem cell deficiency is the basis of a number of ocular surface diseases. The aim of the study was to assess the results of transplantation of ex vivo expanded limbal stem

cells in patients with limbal stem cell deficiency. Methods used in the study include routine ophthalmologic examination, corneal sensitivity testing, anterior segment optical coherence tomography (OCT), point-of-care ocular surface inflammation test, minimally-invasive limbal biopsy, phase-contrast microscopy, impression cytology. Patients with severe unilateral partial limbal stem cell deficiency were included in the study. It was demonstrated that neurotrophic keratopathy is associated with limbal stem cell deficiency due to which the condition was included as an indication for transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells. Anterior segment OCT preoperatively demonstrated sectoral deepithelialization, stromal hyperreflectivity, and corneal edema. Postoperatively it showed complete epithelialization of the corneal surface and forming of scar tissue in the stroma, which prevented further melting and in the course of convalescence became more transparent. Using an innovative modified 3D Macula Drusen protocol the area and volume of the formed cicatrix were estimated. A clear therapeutic algorithm was defined and the methodology of the limbal biopsy and ocular surface reconstruction with an amniotic membrane in a two-step approach were established. The protocol for ex vivo expansion of limbal stem cells used in the study is extremely effective and meets all current requirements for biological safety since it does not contain xenobiotic products and simultaneously provides maximal clonal expansion and retains undifferentiated phenotype of the rendered cells. A statistically significant improvement in visual acuity after the intervention was found ($p=0.009$). Most significant factors for the success of the procedure were preoperative visual acuity and patient age. No adverse events were registered in the course of the study. Success criteria defined as improved visual acuity, stable epithelialization of the ocular surface, achieving transparency and reduction of neovascularization were met in all of the patients.

Scientific publications and presentations:

- Hristova R, Tanev I, Markov G et al. Regenerative therapy for post-herpetic neurotrophic ulcer, 36th Congress of the Eur Society of Cataract and Refractive Surgeons (ESCRS), Vienna, Austria, 22-26 Sep 2018
- Hristova R, Tanev I, Hristova M et al. Topical Mitomycin C as Treatment for Ocular Surface Squamous Neoplasia (Carcinoma in situ) following systemic chemotherapy for Non-Hodgkin Lymphoma, 9th EuCornea Congress, Vienna, Austria, 21-22 Sep 2018
- Hristova R, Tanev I, Yankova E et al. Treatment of Mitomycin-induced limbal stem cell deficiency – a case report, XII Congress of the Bulgarian Society of Ophthalmology, Sofia, 2017

Contract D-117/02.05.2017 Investigation of the effect of cell cultures, isolated from Glioblastoma multiforme on Tregs, Th17, and monocytes in the composition of peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy donors

Research team: Assoc. Prof. Dobroslav Stanimirov Kyurkchiev, MD, DSci

- Assist. Prof. Ekaterina Ivanova-Todorova, MD, PhD
- Prof. Sevdalin Nachev, MD, Dsci
- Kalina Tumangelova-Yuzeir, PhD
- Tsvetelina Velikova, MD, PhD
- Emanuil Naydenov, MD
- Ekaterina Kurteva, MD, PhD student

Organization unit: MU- Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, UH “St. Ivan Rilski”

RESULTS: Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive and common tumors of the central nervous system. His treatment by conventional methods including radio and chemotherapy has failed. GBM is believed to perform immunosuppression both locally and systemically. The purpose of this study is to isolate and cultivate GBM cells, also to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors, and then: 1. PBMCs to be cultured with GBM-isolated cell cultures; 2. PBMCs be cultured with supernatants from GBM cell cultures; 3. To investigate the effect of the co-cultivation and the supernatant of GBM cell cultures on the percentage of monocytes, T regulatory cells (Tregs) and Th17 cells in the composition of PBMCs derived from healthy donors. 4. To investigate the presence of PD-1L on GBM cell cultures and PD-1 on the studied leukocyte populations. Cell culturing, Flow cytometric analysis, Statistical analysis. Cell cultures isolated from GBM have been found to exert influence on various leukocyte populations in the PBMC composition isolated from healthy donors by both secretory factors and cellular contact. The results for Tregs showed an increase number of the both subpopulations studied - CD4 + CD25-FoxP3 +, CD4 + CD25 + FoxP3 + as well as in general CD4 + FoxP3 +. The effect was described both in supernatant culture and co-cultivation with GBM cell cultures. The Th17 investigation presented a decrease percentage in the lymphocyte population under the action of secretory factors. Monocytes showed increased expression of CD14 and decreased HLA-DR observed in both experimental models. No difference was found in the expression of the co-stimulatory molecule B7. There was strong expression of PD-L1 from cell cultures from GBM. The results obtained confirm data on immunomodulation performed by GBM on different leukocyte populations.

Contract D-118/02.05.2017 Serum biomarkers for disease activity and prognosis in patients with systemic sclerosis with pulmonary involvement

Research team: Assoc. Prof. Simeon Valentinov Monov, MD, PhD

- Rositsa Dacheva, MD
- Prof. Martha Baleva, MD, DSci
- Assist. Prof. Milena Nikolova, MD, PhD
- Assist. Prof. Ruska Shumnalieva, MD, PhD
- Prof. Dobroslav Kyurkchiev, MD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, University hospital “St. Iv. Rilski”, 13 Urvich str, 1612, Sofia

RESULTS: The aim of the conducted research was to determine the role of KI-6 and CCL18 in the development of systemic sclerosis and the pulmonary complications related with the disease, to assess whether these markers can be used as a biomarker of active disease and prognosis for activation of the disease in Bulgarian patients. Serum levels of KI-6 and CCL18 were examined in 35 patients with systemic sclerosis and in 15 healthy controls. CCL18 were not discovered either in the serums of the patients or these of the healthy controls. KI-6 was observed in the serum of one of the healthy controls. In the conducted result no statistically significant difference was observed between the KL-6 and CCL18 levels in the healthy control group and the group

with patients with systemic sclerosis. There was no correlation between the levels of the biomarkers and the clinical manifestation.

Contract D-119/02.05.2017 Early diagnosis, screening, and follow-up of patients with chronic diarrhea and microscopic colitis by measuring fecal markers

Research team: Assc. Prof. Plamen Penchev, MD, PhD

- Ivan Lyutakov, MD, PhD student
- Assoc. Prof. Rositsa Vacheva-Dobrevska, MD, PhD
- Boryana Asenova
- Milena Chetirska

Organization unit: Dept. of Gastroenterology at University Hospital “Tsaritsa Yoanna – ISUL”, Sofia. 8 “Byalo more” Str., 1527 Sofia

RESULTS: Fecal calprotectin (FC) is used as a marker for intestinal inflammation in inflammatory bowel disease (IBD) but there is no reliable marker for microscopic colitis (MC) or better maker for distinguishing from irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D). In some studies is demonstrated that, mucosal inflammation in MC is done by eosinophil activation, but there is no enhanced neutrophil activity. The AIM: To evaluate the diagnostic accuracy of fecal eosinophil-derived neurotoxin/eosinophil protein x (EDN/EPX) and FC in patients with chronic diarrhoea. In this prospective study we enrolled 40 adult patients with suspected chronic diarrhea who underwent standard laboratory test, colonoscopy, fecal EDN/EPX and FC. All patients underwent endoscopy and FC measurement as a reference standard of disease activity. We divided the patients into 5 groups: 14 patients with active IBD, 5 patients with IBD in remission, 5 patients with IBD after surgery, 11 patients with IBS-D and 5 patients with MC. Fecal EDN/EPX were measured using ELISA test and FC with quantitative immunochromatographic. From these 40 patients included in the analysis, elevated levels of EDN/EPX is found in 19 (47,5%) and lower levels in 21 (52,5%) and age range between 23 and 80 years as median 51.50 and mean 49,25 years. The sensitivity and specificity of EDN/EPX and FC, and also ROC/AUC analysis shows EDN/EPX (ng/ml).636; FC $\mu\text{g/g}$.924 and CRP (mg/dl) .670 ($p=0.04$). EDN/EPX and FCP could be used for identifying patients with active IBD but low specific for MC and IBS-D and they could possibly be used as a biomarkers for differentiating IBD from MC and IBS-D. Combination of EDN/EPX and FCP can be used as a surrogate markers for non-invasive disease activity evaluation in patients with active IBD. Further bigger studies are needed to establish the efficacy of EDN/EPX for MC and IBS-D.

Scientific publications and presentations:

- Lyutakov I, Penchev P, Kyoseva D. Diagnostic algorithm and treatment for microscopic colitis: A Review. Int J Adv Res. 2017;5(10):616-29.

Contract D-120/02.05.2017 Screening and diagnosis of autoimmune pancreatitis and concomitant pancreatic exocrine function

Research team: Prof. Borislav Georgiev Vladimirov, MD, PhD

- Mila Kovacheva-Slavova, MD, PhD
- Sylvie Mitova-Siminkovitch, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, UMBAL “Tsaritsa Ioanna-ISUL”, Dept. of Gastroenterology, 8 Byalo more Str., 1527 Sofia

RESULTS: Autoimmune pancreatitis (AIP) is a relatively newly recognized disease and 2 different types. AIP is associated with IgG4-related disease and inflammatory bowel disease (IBD). However, diagnosis and treatment approach remains a clinical challenge. The aim of the present study is to conduct screening and proper diagnosis of AIP in patients with suspected disease, assessment of pancreatic exocrine and endocrine function. AIP screening is performed according to diagnostic criteria including morphological changes (US, CT/MRCP), serology (immunoglobulins A, M, G, and IgG4), response to steroids, multi-organ involvement and IBD. Pancreatic exocrine insufficiency (PEI) was evaluated by fecal elastase-1. Endogenous dysfunction was assessed by glucose and HbA1c. The study included 130 patients at a mean age of 45.72±15.91 years, 48.47% were men. Diagnostic distribution was as follows: 25.39% with chronic or acute pancreatitis with unclear etiology (CP/AP), 52.31% with IBD, 4.62% with observed pancreatic cancer and 17.63% with other autoimmune diseases. 33 patients reported the concomitant systemic autoimmune disease. The mean IgG4 levels were 38.545±173.625 mcg / dL and did not differ significantly from diagnosis, gender, age, CRP levels. The presence of concomitant autoimmune disease, as well as diabetes mellitus and pre-diabetes, significantly increased IgG4 levels, p=0.044, p=0.05. During the screening 8 patients (6.15%) at a mean age of 37.13±10.14 years had typical AIP morphological changes. Of these, two women with CP met the AIP type 1 criteria. AIP type 2 was diagnosed in two women with ulcerative colitis. Steroid therapy with effect was launched. PEI was found in 19.18% of the study subjects (1 patient with AIP) with significantly lower levels in CP/AP patients. PEI does not depend on gender, age, IgG4 levels. Optimal blood sugar levels were present in 90 patients. AIP is a rare but increasingly recognized clinical entity. A long-term follow-up strategy is mandatory to prevent future relapses and complications.

Scientific publications and presentations:

- Kovacheva-Slavova M, Siminkovitch S, Penchev P, et al. Autoimmune pancreatitis and inflammatory bowel disease- a riddle unwrapped, Pancreas Spring Meeting, Goettingen 11-12 May 2017
- Kovacheva-Slavova M, Siminkovitch S, Genov J, et al. Pancreatic enzyme replacement therapy in patients with pancreatic exocrine insufficiency. IAP/LAPSG Joint Meeting, Buenos Aires. Argentina, Sep 28-30, 2017
- Kovacheva-Slavova M, Siminkovitch S, Genov J, et al. Nutritional deficiency in asymptomatic patients with chronic pancreatitis and pancreatic exocrine insufficiency IV National Congress for Young Gastroenterologists, Sofia, 23-24 Mar 2018

Contract D-121/02.05.2017 Investigation of the percentage of Th17 cells and their related cytokines during treatment with beta interferons and fingolimod in patients with multiple sclerosis in order to evaluate the therapeutic response

Research team: Acad. prof. Ivan Gospodinov Milanov, MD, PhD, DSc

- Prof. Dobroslav Kyurkchiev, MD, PhD, DSci

- Marina Borisova, PhD student
- Ekaterina Kurteva, PhD student
- Tsvetelina Velikova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Neurology, MHATNP "St.Naum", EAD, Sofia, 1 St. Louben Roussev Str., 1113 Sofia

RESULTS: We enrolled 27 patients with a relapse-remitting MS and 10 healthy controls. The patients were with an average age of 34.58 ± 9.85 . The patients' disease duration was 3.6 years \pm 1.2 years. We selected patients who started treatment with interferon β 1a (Avonex, Rebif), interferon β 1b (Extavia) and fingolimod (Gilenya). The distribution by a group of the patients was: 5 fingolimod (Gilenya) and 22 patients treated with beta-interferons. A flow cytometric study of the percentage of Th17 cells in peripheral blood was performed. Patients and healthy sera were tested for the presence of IL-6, IL-17A, IL-23, TGF- β 1 by ELISA. The relationship between the results of the immunological parameters studied, disease activity and response to treatment was made. The percentage of Th17 lymphocytes before initiation of treatment did not differ significantly between MS patients and healthy controls. On the sixth month of treatment, we observed an increase and on the 12th month, the percentage of Th17 cells decreased to baseline ($p > 0.05$). We found a significant increase in IL-6 levels in all MS patients before treatment initiation and in the 6th month of treatment compared to healthy subjects ($p = 0.035$). We found borderline elevations of TGF β 1 in all MS patients compared to healthy controls ($p = 0.071$). Our team did not find peripheral blood IL-17A secretion in either MS patients or healthy controls. We found a trend towards a reduction in immunologic levels of TGF β 1, IL-6, IL-23 and Th17 cells during therapy and a tendency to increase their levels in patients who are in a seizure or have had a seizure of the disease for the observation period. Our data is in line with the literature on the involvement of Th17 lymphocytes in MS.

Contract D-122/02.05.2017 Serum leptin level in boys with pubertal gynecomastia

Research team: Assoc. Prof. Elissaveta Milkova Stefanova, MD, PhD

- Assist. prof. Zdravka Todorova, MD
- Desislava Yordanova, MD
- Assist. prof. Adelina Cakova, MD, PhD

Organization unit: Specialized Hospital for Active Treatment of Children "Prof. Ivan Mitev", MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pediatrics, 11 "Akad. I. Geshov" Blvd, 1606 Sofia

RESULTS: Leptin, the product of the ob gene, is a protein molecule secreted predominantly by the adipose tissue. Above all, the leptin molecule is a signal to the central nervous system about the body's energy reserves. Leptin receptors are also found in many peripheral tissues, and many peripheral actions are known today including pubertal development, gonadal function and the levels of sex hormones. The aim of the present study is to compare the serum leptin level in boys with pubertal gynecomastia and control group, corresponding to age, stage of pubertal development and anthropometric indicators. For this purpose, 57 boys with gynecomastia, with normal weight or overweight and obese and non-gynecomastia control groups of 60 boys who were age-related. Pubertal development and anthropometric measurements were made. The following indicators were measured, analyzed and compared: SDS_h, SDS_w, SDS_{BMI}, and waist/height ratio. All of the boys were taken a venous blood sample in the morning at fasting

state at 07:30 and 08:30, from which serum was separated. The latter was stored at (-20) ° C until the time of the study. Results: When comparing the mean serum leptin level between the adolescents with and without gynecomastia, no statistically significant difference was found in normal-weight boys and those with obesity. Also, no statistically significant difference in leptin level was found between the groups with gynecomastia and without who were in 2nd or 3rd grade of puberty development, regardless of the weight and BMI and also in normal-weight boys in the 4th -5th stage with or without pubertal gynecomastia. Only boys in 4th or 5th grade of pubertal development with obesity and gynecomastia have a significantly higher level of leptin compared to age, weight, and puberty matched controls without gynecomastia. From the results obtained, it can be concluded that leptin is probably not significantly related to the onset and development of glandular breast tissue in boys, although significantly increased at the beginning of puberty but could have a role in the persistence of pubertal gynecomastia at the end of puberty and adulthood, as only in the group with persistent adolescent gynecomastia in obese boys there is a high level of retention.

Contract D-123/02.05.2017 Analysis of genetic polymorphisms related to the therapeutic response to methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis patients

Research team: Prof. Stefan Nedev Stefanov, MD, PhD

- Assist. Prof. Margarita Ganeva, MD, PhD
- Assoc. Prof. Albena Telcharova Mihaylovska, MD, PhD
- Prof. Radka Kaneva, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pediatrics, University Children's Hospital "Prof. Ivan Mitev", 11 Ivan Evstratiev Geshov Boulevard, 1612 Sofia

RESULTS: 43 Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) patients (23 girls and 20 boys) were included. The diagnosis of JIA was based on ILAR (International League of Associations for Rheumatology) criteria. The mean age of the patients is 8.61 years (2.16-15.66 years), the mean age of onset of the disease is 4.94 years (1-15 years). The mean age of onset of Methotrexate (MTX) therapy is 5.81 years (2-15.08 years). All patients underwent methotrexate therapy at a mean dose of 7.8 mg. The patients were divided into two groups - those who had MTX alone and an optimal response (n = 24) to MTX treatment and those treated with both a biological agent and MTX and a poor response to MTX (n = 19). When a chi-square analysis was performed to compare the distribution of alleles between children with good response and those with poor drug response, we found no significant difference in the distribution of alleles frequencies of the investigated polymorphisms in both the good and the poor drug response groups (MTRR rs1801394 A> G x 2 = 0.14; df = 1; p> 0.05; SLC46A1 rs2239907 C> TCx2 = 1.19; df = 1; p> 0.05 ABCC1rs35592 T> Cx2 = 2.08; df = 1; p> 0.05; ABCB1 rs1045642 G> A x 2 = 3.25; df = 1; p> 0.05;). This finding should be verified (confirmed or rejected) in an extended study of significantly larger groups of individuals. The identification of polymorphic variants associated with the drug response needs a wider study. This would lead to the early detection of children with a poor or absent response to ongoing MTX therapy.

Contract D-124/02.05.2017 Parvovirus B19 infection associated with anemic syndrome in risk pregnancy

Research team: Prof. Borislav Marinov Marinov, MD, PhD

- Assist. Prof. Stefka Ivanova, PhD - NCIPD
- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Silviya Voleva - NCIPD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of University Obstetrics and Gynecology Hospital “Maichin Dom”

RESULTS: We aimed to evaluate the role of Parvovirus B19 infection in the development of anemic syndrome during pregnancy. 55 blood samples of pregnant females with anemia were measured; the patients were diagnosed in University hospital “Maichin Dom”, Sofia. The age of females was from 16 to 44 years. Immunoenzyme (ELISA IgM/IgG) and molecular (PCR) methods were used. Iron homeostasis was evaluated by CLIA, AAS, NEPH methods. Quantification of serum hepcidin concentration was performed by immunoenzyme (ELISA) method. Acute B19V infection (presence of specific IgM in high levels) was found in 7/55 (12.73%) pregnant women. Laboratory markers, along with a combination of anamnesis, including contact with infected children with the fever-rash syndrome, leaned toward the possible etiological role of B19V in lowering of iron during pregnancy. In 28/55 (50.91%) from the included group of females was proved B19V-IgG seropositivity. In 10/55 (18.18%) from patients was established the presence of B19V-DNA, i.e. in 3/55 (5.45%) confirmation of B19V infection was based on PCR analysis. This might be explained by fast transient B19V-IgM response or possible virus replication in organism blood depots. Total in 12.73% from included patients specific IgM antibodies and the presence of virus nucleic acid was positive and present proof of recent infection. In ten (18,18%) positive B19V infection pregnant women were found statistically increased serum hepcidin level ($65.3 \pm 5.7 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. In other included patients anemia was evaluated as iron-deficiency according to low hepcidin concentration $2.54 \pm 0.4 \mu\text{g/l}$, compared to $25.9 \pm 2.8 \mu\text{g/l}$ control group of pregnant women without anemia. Evaluation of frequency and degree of parvovirus B19 in anemic syndrome development during pregnancy and quantification of serum hepcidin levels might contribute for an etiological explanation of anemia during pregnancy. On the other hand, increased hepcidin concentrations are contraindications for iron supplementation in case of inflammation or infection during pregnancy.

Scientific publications and presentations:

- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Parvovirus b19 infection associated with anemic syndrome in patients with risk pregnancies. *Med Rev* 2017;53:5-11
- Voleva S, Pavlova A, Genova-Kalou P, et al. Infectious agents during pregnancy – a preliminary study. *Problems Infect Parasit Dis.* 2017;45(2):42-6.
- Voleva S, Manolov V, Angelova S, et al. Parvovirus B19 changes iron homeostasis during pathological pregnancy. *Clinical Practice (Therapy)* 2018;15:481-7
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. anemic syndrome associated to parvovirus b19 infection in pathology pregnancy women. *Science & Research*, 2017;1:1
- Voleva S, Manolov V, Marinov B, et al. Investigation Of Parovivrous B19 In The Development Of Anemic Syndrome And Determination Of Serum Heppidine In Women With Pathological And Risk. *Pregnancy Obstet Gynecol.* 2017;56:9-10

- Voleva S, Manolov V, Ivanova S, et al. Role of parvovirus B19 in anemic syndrome during abnormal pregnancy. IFCC WorldLab 2017. 23rd Int Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Durban, South Africa, 22-25 Oct 2017
- Voleva S, Manolov V, Ivanova S, et al. Engagement of parvovirus B19 in the development of anemic syndrome in women with an abnormal pregnancy. 20th ESCV 2017 Annual Meeting, Italy, 13-16 Sep 2017
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Parvovirus B19 as a causative pathogen in a pathological pregnancy during 2015-2016 year in Bulgaria. ICMS. Sofia, Bulgaria, 11.05.-14.05.2017, pp 332
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Anemic syndrome associated with parvovirus B19 in pathology pregnancy women. 28th Int Conference, St. Zagora, Bulgaria, 1-2.06.2017pp 33-34
- Voleva S, Ivanova S, Manolov V, et al. Anemia during pregnancy associated with Parvovirus B19 infections. 20th Jubilee Gynecologists Conference. Borovetz, 16-18.03.2017
- Voleva S, Ivanova St., Angelova Sv., Marinov B., Shishkov St. Seroprevalence of parvovirus B19 in pathological pregnancy women. XV National congress of clinical microbiology and infections, 17-19.05.2017, Sofia, Bulgaria
- Voleva S, Manolov V, Vasilev V, et al. Hepcidin in pregnant women with parvovirus B19 infection. Xth National Congress for Clinical Laboratory. Borovetz, Bulgaria, 7-9.09.2017
- Voleva S, Manolov V, Marinov B, et al. Investigation Of Parovivrous B19 In The Development Of Anemic Syndrome And Determination Of Serum Heppidine In Women With Pathological And Risk Pregnancy. XIV National Congress Of Obstetrics And Gynecology, Plovdiv, Bulgaria, 26-29.10.2017

Contract D-125/02.05.2017 Role of some stress hormones for the onset of metabolic disturbances in patients with obesity

Research team: Assist. Prof. Ralitsa Robeva, MD, PhD

- Assoc. Prof. Atanaska Elenkova, MD, PhD
- Prof. Georgi Georgiev, MD, PhD
- Bojka Milcheva
- Semra Mustafa

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, USHATE “Acad. Iv. Penchev”, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: Metabolic syndrome (MS) represents a cluster of interrelated risk factors such as obesity, carbohydrate disturbances, arterial hypertension, dyslipidemia, procoagulant state as well as subclinical inflammation that could significantly increase the risk of atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus (DM2). Obesity is a major component in MS patients, but not all obese individuals develop MS or DM2. It has been suggested that the accumulation of different stressors in modern society along with the personal inability to cope with them might benefit the progress of obesity and the onset of metabolic disturbances. Therefore, the objective of the present project was to clarify the role of different hormones related to the internal stress defense

in basic and dynamic conditions for the occurrence of metabolic disorders in obese patients. The study also aims to investigate the associations between the various stress hormones such as cortisol, catecholamine and serotonin metabolites in patients with MS. A total of 80 overweight and obese patients were recruited, divided into three groups: patients without MS, patients with MS, as well as patients with MS and type 2 diabetes mellitus. Several metabolic and hormonal indices were investigated in all patients. The results showed that obesity was negatively related to the levels of free urine cortisol, morning cortisol as well as serotonin metabolites. The serotonin metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid showed a positive association with the levels of the catecholamine metabolites. Low levels of urinary metanephrines were associated with an increased risk of carbohydrate disturbances in obese women. The patients with type 2 diabetes mellitus showed elevated levels of the urinary normetanephrine, whereas in women without carbohydrate disturbances the urinary normetanephrine concentrations could influence the lipid profile and the blood glucose levels after a glucose load. These data have shown that the depletion of major hormonal mechanisms related to the stress adaptation in chronic obesity as well as the activation of the sympathetic nervous system with increased noradrenaline production might be important risk factors for the occurrence of carbohydrate complications and metabolic syndrome in women.

Scientific publications and presentations:

- Robeva R, Milcheva B, Elenkova A, et al. Neuro-endocrine alterations in metabolic syndrome. *Endocrinologia*. 2017;22(4):173-8.

Contract D-126/02.05.2017 Association of some interleukins with the clinical activity of thyroid-associated ophthalmopathy and their potential role for the therapeutic approach

Research team: Assist. prof. Alexander Dimotrov Shinkov PhD

- Prof. Roussanka Kovatcheva PhD, MU
- Prof. Georgi Georgiev PhD
- Assist. prof. Ralica Ivanova
- Maria Stoyanova, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology

RESULTS: Objectives: To assess the clinical efficacy of a glucocorticoid regimen for the treatment of thyroid-associated ophthalmopathy (TAO), compare interleukin-8 and interleukin-10 levels in patients with TAO, healthy individuals and patients with Graves' disease without TAO (GD); follow the interleukins during TAO treatment and assess their association with clinical activity score (CAS) and treatment response. 31 TAO patients, 30 healthy individuals, and 30 GD patients were enrolled. Thyroid function was assessed and plasma IL-8 and IL-10 were measured. TSH-R-Ab levels, CAS, ophthalmologic status and disease-specific quality of life were assessed in TAO subjects. Methylprednisolone was administered as three intravenous infusions of 500 mg (pulse) in three consecutive months, with 125 mg intramuscularly every week between pulses to 5500 mg total. Ophthalmological status, CAS, IL-8, and IL-10 levels were assessed at baseline, after pulse one and at treatment end, and TSH-R-Ab, quality of life and treatment response – at baseline and at treatment end. TAO severity and CAS decreased with treatment (41%, 31-51, $p = 0.006$). A full response was observed in 42% of the patients, partial

in 45%, and no response in 13%. The quality of life scores increased (all $p < 0.05$) and their change correlated negatively with the TSH-R-Ab change. Baseline IL-8 was highest in GD and lowest in healthy controls ($p = 0.044$); IL-10 was highest in healthy controls and lowest in TAO patients ($p = 0.024$). IL-8 was highest in non-responders, but the small number did not allow statistical evaluation. The relative changes in IL-8 and IL-10 after pulse one were -10.3%, and -13.5%, both $p < 0.001$. None of the markers correlated with smoking, age or disease duration. Conclusions: The applied glucocorticoid regimen demonstrated high efficacy. IL-8 and IL-10 levels changed over the course of treatment, but further investigation is needed to assess theirs in clinical applicability.

Contract D-127/02.05.2017 Vitamin D in the spectrum of prediabetes and cardio-vascular autonomic dysfunction

Research team: Assist. Prof. Nevena Iankova Chakarova, MD

- Prof. Tsvetalina Tankova, MD, DMSc
- Prof. Georgi Georgiev, MD, PhD
- Assoc. Prof. Iliana Borisova, MD, PhD
- Ass. Prof. Greta Grozeva-Damyanova, MD, PhD
- Ass. Prof. Roumyana Dimova-Draganova, MD, PhD
- Ani Tododrova, MD, PhD student
- Mina Serdarova, MD, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Dept. of Diabetology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: Aim – present study evaluates vitamin D status in subjects with normal glucose tolerance (NGT) and prediabetes (impaired fasting glucose (IFG), impaired glucose tolerance (IGT) and the combination of impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance (IFG+IGT)) and the relationship with cardiovascular autonomic function and some cardiometabolic risk factors. A total of 174 subjects with a mean age of 49.1 ± 12.9 years, and mean BMI 30.2 ± 6.2 kg/m² were enrolled. Participants were divided into 2 groups according to glucose tolerance: 48 with NGT and 126 with prediabetes, who were subdivided into subgroups according to prediabetes category: 50 with IFG, 25 with IGT, and 51 with IFG+IGT. Glucose tolerance was assessed by standard OGTT. Anthropometric indices – height, weight, waist circumference, BMI was calculated, blood pressure (BP), plasma glucose and immunoreactive insulin at fasting and 120 minutes, HOMA-IR и HOMA-beta were calculated, HbA1c, lipids, creatinine, hsCRP, parathormone, 25OH vitamin D, vitamin D binding protein (DBP), calculated free vitamin D, total fat and visceral fat mass, tissue accumulation of advanced glycated end products (AGEs), cardiovascular autonomic function (CAF). There was a high prevalence of vitamin D deficit in the studied cohort – 40.8%, independently of glucose tolerance. No differences in vitamin D status were reported between groups with varying degrees of glucose intolerance, with significantly increased parathormone in prediabetes. Individuals with vitamin D deficiency have higher BMI, visceral and total fat mass, and resting heart rate (rHR). DBP is lower in impaired (CAF) and metabolic syndrome and correlates negatively with age and visceral fat accumulation; and positively with HDL-cholesterol and parasympathetic power. Waist circumference and parasympathetic activity during deep breathing determine 9% and the

component fat mass variable 8% of the DBP variability. 25OH vitamin D correlates reciprocally with visceral and total fat mass, systolic and diastolic BP and AGEs. Visceral adipose tissue determines 4% of the variability in 25OH vitamin D. rHR and AGEs account for 7% of the variability of free vitamin D. High prevalence of vitamin D deficiency was observed in prediabetes and impaired CAF. Vitamin D status correlates with BP, lipids, visceral obesity, AGEs, rHR and parasympathetic function.

Scientific publications and presentations:

- Tankova T, Kirilov G, Chakarova N, et al. Parameters of vitamin D status in subjects with prediabetes. Endokrinologia, in press.

Contract D-128/02.05.2017 Diagnostic algorithm and some markers for cardiovascular risk in primary aldosteronism

Research team: Joanna Alexandrova Matrozova, MD, PhD

- Vladimir Vasilev, MD, PhD
- Silvia Vandeva, MD, PhD
- Rosen Russev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, University Hospital of Endocrinology “Akad. Ivan Pentchev”, 2 Zdrave St, 1303 Sofia

RESULTS: Primary aldosteronism (PA) is the most common form of endocrine hypertension. Until now, the methods that are used for the diagnosis of PA are suboptimal in regard to the accuracy, safety, and cost-efficiency ratio. Increased cardiovascular risk has been found in patients with PA, as studies have demonstrated some cardiovascular markers to be useful in this field. Among them, matrix-metalloproteinase-9 (MM9) and galectin-3 are some of the least studied in the literature. To investigate a new method for PA diagnosis (dexamethasone/captopril/valsartan test –DCVT- test). To investigate the levels of MM9 and galectin-3 in patients with PA, controls with essential hypertension (EH) and healthy subjects. Hormonal measurements were elaborated using the radioimmunoassay. Galectin-3 and MM9 were investigated in serum samples using ELISA method. We found high sensitivity and specificity of the DCVT- method (sensitivity 87.50%, specificity 83.19%) with excellent tolerance of the test. There was no difference in the levels of MM9 between patients with PA and EH (279.29 ± 109.63 vs 269.22 ± 1118.81 ng/ml, $p=0.865$), as well as between PA and healthy subjects (279.29 ± 109.63 vs 279.68 ng/ml, $p=0.995$). We didn't find any statistical significance between the galectin-3 levels in patients with PA and EH (31.43 ± 8.43 vs 29.71 ± 3.87) or between PA and healthy subjects (31.43 ± 8.43 vs 27.81 ± 2.33). We found high sensitivity and specificity regarding the accuracy of the DCVT- test, which gives us reason to recommend it as an additional diagnostic method for PA. The scientific and practical significance for MM9 and galectin-3 in the clarification of cardiovascular risk in PA was not confirmed. Studies should investigate some more sensitive markers in this field.

Contract D-129/02.05.2017 Inflammatory biomarkers in patients with asthma-COPD overlap syndrome

Research team: Assoc. Prof. Vania Milosheva Youroukova, MD

- Assist. prof. Miroslav Mihaylov, MD, PhD student
- Assist. prof. Dora Marinova, MD, PhD
- Assist. prof. Denitza Dimitrova, MD, PhD student
- Assist. prof. Giulieta Hristova, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, CC for Pulmonary Diseases, University Hospital for pulmonary diseases “St Sofia”, 19 Acad Ivan Geshov blvd, 1431 Sofia

RESULTS: To investigate plasma levels of NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-17) and their association with the pulmonary function, bronchodilator response and peripheral eosinophilia of patients with asthma (A), Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma-COPD overlap (ACO). We studied 81 patients with broncho-obstructive diseases out of exacerbation: A (n=26), COPD (n=25) and ACO (n=30). We determined the plasma levels of NGAL, IL-5, IL-6, IL-17, IgE (ELISA) and blood eosinophils (Eo). We measured respiratory function and bronchodilator responsiveness by standard spirometry. NGAL levels were significantly increased in ACO (NGAL=158.6ng/ml) compared to COPD (125.1ng/ml) and A (53.5ng/ml) ($p<0.05$). There was no relationship between NGAL and airway limitation for A, COPD and ACO (preFEV1/FVC) ($p>0.05$). Elevated NGAL levels were associated with a positive bronchodilator response (post FEV1/FVC $<70\%$ and FEV1 $\geq 15\%$ and ≥ 400 ml or $\geq 12\%$ and ≥ 200 ml) ($p<0.05$) and Eo (Eo $\geq 300/\mu$ l) ($p<0.05$) in ACO. Similarly, IL-6 levels were significantly increased in ACO (IL-6=26.94 pg/ml) compared to COPD (IL-6= 3.25 pg/ml) and A (IL-6= 1.41 pg/ml) ($p<0.05$). Elevated levels of IL-6 corresponded to high levels of NGAL in ACO ($p<0.05$). IL-5 levels were significantly increased in A (IL-5=4.48 pg/ml) as compared to COPD (IL-5=2.62 pg/ml) and ACO (IL-5=2.53 pg/ml) ($p<0.05$), and were not associated with NGAL levels. Similarly, IL-17 levels were significantly higher in A (IL-17=21.90 pg/ml) as compared to COPD (IL-17=6.94 pg/ml) and ACO (IL-17= 6.94 pg/ml) ($p<0.05$). Interestingly, high NGAL and IL-6 levels were associated with increased number of exacerbations in ACO. Plasma levels of NGAL and IL-6 are significantly increased in ACO and are associated with blood eosinophilia and increased number of exacerbations. These results suggest that NGAL and IL-6 might be a useful biomarker and a promising candidate for differentiation patients with ACO from COPD and A, and plasma levels of IL-5 and IL-17 can be useful for differentiation patients with A from COPD and ACO.

Scientific publications and presentations:

- Mihaylov M, Youroukova V, Hristova J, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)-a potential biomarker for ACO differentiation from Asthma and COPD. *Toracic Medicine* 2018;1(Suppl. 1)
- Mihaylov M, Youroukova V, Hristova J, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)-potential biomarker for ACO (Asthma- COPD overlap) Differentiation from Asthma and COPD. 7th congress of the Bulgarian Society of Pulmonary Diseases, in Golden Sand, 18-21.10.2018

Contract D-130/02.05.2017 Characteristics of HBV genotype and drug resistance in HIV/HBV co-infected patients

Research team: Assoc. Prof. Ivailo Ivanov Elenkov, MD, PhD

- Andon Timchev, MD

- Tencho Tenev, MD
- Assist. Prof. Elitsa Golkocheva-Markova, PhD
- Diliansa Trandeva-Bankova
- Assoc. Prof. Ivailo Alexiev, PhD
- Asja Kostadinova
- Reneta Dimitrova, PhD student
- Anna Gancheva

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Infectious Diseases, Parasitology and Tropical Medicine, Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases "Prof. Ivan Kirov"

RESULTS: Evolution of the HBV serological markers or the presence of HBV infection in newly registered Bulgarian HIV-positive patients are limited. The objectives of the present research are: HBV serological profile tracing in HIV / HBV coinfecting patients; study of the genotype diversity of HBV in HIV/HBV co-infected; identification of the most frequently occurring HBV drug mutants. For achievement of the project aims blood serum samples from HIV positive patients were tested for the presence of HBV markers - HBsAg, anti-HBsAg, anti-HBc IgM and IgG, HBeAg and anti-HBe, by using of immunoenzyme methods (ELISA). Hepatitis B viral concentration was measured by real-time PCR. Hepatitis B genotypes were assessed by nested PCR and drug resistant mutations – by sequencing. One hundred ninety-one HIV-positive patients (newly diagnosed and on different treated regimens) were tested, of whom 172 (90%) were negative for HBsAg and 19 (10%) were positive. All serum samples positive for HBsAg were tested by real-time PCR and 17 (89%) of them giving a positive result for the presence of HBV DNA. In 2 (11%) of 19 newly registered HIV-positive were positive for serological markers typical of acute HBV infection and viral DNA (HBsAg + / HBcIgM + / HBeAg + / HBV DNA +). The anti-HBc IgM antibodies (HBsAg + / HBcIgM + / HBV DNA +) were detected only in 5 (29%), and 12 (71%) were negative. The same results were obtained and for HBeAg. In the HBV infection marker study, the presence of anti-HBc total were detected in 69 (40%) HIV positive HBsAg negative subjects, from whom 2 (13%) were positive for the presence of HBV DNA. In 41 (52%) HIV positive patients the presence of anti-HBs, a marker for resolved HBV infection, was detected. The prevalence of HBV genotype D was established among HIV/HBV co-infected.

Scientific publications and presentations:

- Golkocheva-Markova E, Trandeva-Bankova D, Tenev T, et. al. Past Hepatitis B virus infection in HIV-positive. National Scientific Conference for HIV and Co-infections. 1-2 Dec 2017, Sofia
- Golkocheva-Markova E, Timchev A, Trandeva-Bankova D, et. al. Evolution of serological markers for viral hepatitis in newly registered HIV/AIDS positive patients. 16th National Congress on Clinical Microbiology and Infections of the Bulgarian Microbiology Association, 10-12 May 2018, Sofia

MEDICO-SOCIAL AREA “GRANT’ 2016”

Contract 39/2016 Study of the impact of included and excluded medicinal products from Positive drug list on access and public expenditures

Research team: Assoc. prof. Alexandra Tzvetanova Savova, PhD

- Assoc. prof. Manoela Manova - Ovcharova, PhD
- Prof. Nikolay Danchev, PhD
- Boryana Videva-Zidarova – NCPR
- Maria Vasileva – NCPR
- Assist. Prof. Zornitza Spasova-Mitkova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of pharmacy, Dept. Organization and economy of pharmacy

RESULTS: The goal of the study is to analyze changes in the reference value per Defined Daily Dosage (DDD) for all therapeutic groups in Annex 1 and Annex 2 in which are included new products, or one or more medicinal products are excluded for the period 01.01.2015 - 31.12.2015 year. The reasons leading to the corresponding changes in the reference value per DDD have been observed also. Following the inclusion of medicinal products in the Positive Drug List (PDL), various changes have been observed. The main reason for decreasing of reference value per DDD is change of the price of medicines within the group (72,22% in Annex 1 and 57,14% in Annex 2) in 2015, result from price revision. Another reason is inclusion of new trademarks (27,78% in Annex 1 and 42,86% in Annex 2) in PDL at lower prices (e.g. a reference product). Within the groups of excluded medicines different changes were observed. The number of products with increased reference value is smaller. We found that basic leading reasons for price reduction are changes in price of the products within the groups, the second leading reason is the inclusion of medicines at lower prices. The first generic medicine is included in both Annex 1 and Annex 2 in 7 INN groups. The final result is a decrease in reference value per DDD. In 2015 the number of included products in PDL is higher than the excluded ones. On total number of the medicines of which the reference value per DDD is reduced is higher than the number of medicines with unchanged reference value. As a whole the results from the study shows that in both groups included and excluded medicines, the leading factor for the decrease of reference value per DDD in 2015 is change of price of the medicine within the group. The results confirm that dynamic changes in PDL and prices of medicines are various and contradictory, but in general this leads to increased availability and affordability to reimbursed medicinal products.

Scientific publications and presentations:

- Mitkova Z, Manova M, Vasileva M, et al. Influence of regulatory measures and market policy for reimbursed medicinal products on the value, paid with public funds in Bulgaria in 2015. *World J Pharm Pharmaceut Sci.* 2017;6(6):19-31
- Savova A, Z Mitkova, B Zidarova, et al. Analysis of the changes in reference value, paid with public funds after exclusion of medicinal products from positive drug list. VIth Congress of Pharmacy. Sandanski, Bulgaria. Oct 13-16, 2016.

Contract 42/2016 Study of quality of life, ambulatory therapy of patients with rare diseases in Bulgaria as well as their access to treatment and to pharmaceutical care

Research team: Assist. Prof. Maria Stefanova Kamusheva, PhD

- Assoc. Prof. Miglena Kirilova-Doneva, PhD
- Assoc. Prof. Alexandra Savova, PhD
- Assist. Prof. Maria Dimitrova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Organization and economics of pharmacy

RESULTS: A seven-step pharmaceutical care plan for cystic fibrosis patients has been developed. The application of pharmaceutical care (PC) would help to improve the quality of life and postpone the complications which should lead to savings. The conducted pilot study among 35 patients with rare diseases (RDs) demonstrates adequate access to treatment and satisfaction with pharmaceutical services. The level of trust in master-pharmacists remains low, which determines the need to inform the public about the crucial role of pharmacists and application of evidence for the benefits associated with PC. The Master Pharmacists' opinion on the implementation of PC for patients with RDs in Bulgaria was evaluated. Master Pharmacists are the most accessible healthcare professionals who have the knowledge and willingness to participate in the care for patients with RDs. The possibilities for PC implementation are conduction of training among pharmacists and optimization of their work. The quality of life of patients with acromegaly and Cushing's syndrome is assessed. Lower values for vitality, energy or fatigue and general health status are found in Cushing's syndrome patients. The pharmacotherapy costs are high, and this raises serious questions about pharmacies' ability to provide the necessary quantities on a regular basis. The cost of one-year Schnitzler's syndrome is valued. Costs are not high, but treatment is only symptomatic, which leads to an increased risk of complications. Bulgarian patients with Schnitzler's syndrome have no physical and financial access to Anakinra. The analysis of cost for treatment for mucopolysaccharidosis II defines significantly low financial burden. No significant increase is expected in the next 3 years. The analysis of the use of medical devices for rare diseases in Bulgaria shows that NHIF pays medical devices only for patients with epidermolysis bullosa. Direct costs are relatively low, with expectations for a slight increase over the next three years.

Scientific publications and presentations:

- Kamusheva M, Donev S, Kirilova-Doneva M, et al. Pharmacotherapy costs for Schnitzler syndrome in Bulgaria. *J Rare diseases & orphan drugs*, 2017;8(1): 3-6.
- Kirilova-Doneva M, Kamusheva M, Petrova G, et al. A new case of Syndrome of Schnitzler – case study. *Acta Med Bulg* 2018;(2):58-62.
- Kamusheva M, Petkova V, Dimitrova M, et al. Development of pharmaceutical care plan for patients with cystic fibrosis, 7th National Conference for Rare Diseases and Orphan Drugs, Plovdiv, Bulgaria, 09-10 Sept 2016.
- Kamusheva M, Donev S, Kirilova-Doneva M, et al. Cost for treatment of Schnitzler syndrome in Bulgaria, 7th National Conference for Rare Diseases and Orphan Drugs. Plovdiv, Bulgaria. 09-10 Sep 2016.
- Kamusheva M, Doneva M, Dimitrova M, et al. Cost analysis of therapy with Idursulfase for Hunter syndrome in Bulgaria, ISPOR 19th Annual Eur Congress. Vienna, Austria. 30.10.- 02.11.2016. A586.

- Kamusheva M, Doneva M, Dimitrova M, et al. Cost analysis for medical devices for rare diseases in Bulgaria – a case with epidermolysis bullosa. ISPOR 22nd Annual Int Meeting. Boston, USA, May 20-24, 2017.

Contract 43/2016 Study of safety and efficacy of medicinal products for rare diseases – systemic review and metaanalysis

Research team: Assoc. Prof. Konstantin Vasilev Mitov, PhD

- Assoc. Prof. Assena Stoimenova, PhD,
- Assoc. Prof. Miglena Kirilova-Doneva, PhD
- Assist. Prof. Maria Kamusheva, PhD
- Assist. Prof. Maria Dimitrova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of of Pharmacy, Dept. of Organization and economics of pharmacy

RESULTS: Positive drug list (PDL) Annex 1 was compared with the List of medicinal products for rare diseases (MPRDs) in Europe. The direct costs of therapy paid by the National health insurance fund (NHIF) for every INN was collected during 2013, 2014, and 2015 and were extrapolated for the next 3 years. In the Bulgarian PDL Annex 1 were included 7 out of 85 (8,2%) form Part I and 21 out of 132 (15,9%) MPRDs from Part II of EMA lists. The total costs for all MPRDs were 122 003 521 euros (6,2% of budget for PDL Annex 1). The expected cost changes for the next 3 years are approximately 60, 70 and 80 million euro, respectively. The access to MPRDs in Bulgaria is limited as number of reimbursed products. The direct costs for MPRDs paid by NHIF are high for the Bulgarian healthcare system and the expectations are for cost increasing in the near future. Inclusion of generic MPRDs could lead to cost containment due to existing internal reference pricing in Bulgaria. Literature search for identification of all published clinical trials with orphan medicines Idursulfase, Sapropterin and Pasireotide was performed. A set of statistical methods were used to perform meta-analysis and comparison of proportions. Fixed effect was used in patients treated with Idursulfase who experienced urticaria ($P = .3459$, 6.81%) and serious adverse drug reactions (ADRs) ($P=.0619$, 21.27%) and in patients treated with Sapropterin who experienced ADRs ($P = .2264$, 29,237%). Random effect was taken into account for Pasireotide effectiveness data and the percent of patients with controlled levels of urinary free cortisol (UFC) was 44.81%. The results from the heterogeneity test shows that random effect for the percent of Pasireotide treated patients with nausea ($P=.2675$, 51,936%), hyperglycemia ($P=.0504$, 43.268%) and diarrhea ($P= .3221$, 58,299%) must be applied.

Scientific publications and presentations:

- Kamusheva M, Doneva M, Dimitrova M, et al. Annual cost analysis for medicinal products for rare diseases in Bulgaria. ISPOR 19th Annual Eur Congress. Vienna, Austria. 30.10. - 02.11.2016. A600.
- Kamusheva M, Mitov K, Doneva M et al. Efficacy and safety of reimbursed orphan medicines in Bulgaria – systematic review and meta-analysis (Part I). J Pharmaceut Res Int 2017;1795):1-14.

Contract 59/2016 Creation of a standard model for manipulatory technique in practical training in nursing and obstetric care

Research team: Prof. Galina Stamova Tchaneva, DM, PhD

- Assoc. Prof. Maria Dimitrova, DM, PhD
- Assoc. Prof. Pepa Bikova-Ivanova, DM, PhD
- Assoc. Prof. Antoaneta Terzieva, DM, PhD
- Assoc. Prof. Nadka Vasileva, DM, PhD
- Assoc. Prof. Deliana Hadjideleva, DM, PhD
- Antoaneta Dimitrova
- Kristian Gerasimov

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Public Health

RESULTS: The results of lecturers and students survey on practical training in nursing and obstetric care show the need to change the traditional pattern of learning. The developed standard model for manipulatory technique includes the following basic phases: theoretical preparation, control of theoretical preparation, visual presentation of the injection technique by the lecturer, practice of the injection technique by the student and final stage - evaluation, which includes self-assessment of the student and a summary assessment - on the basis of theoretical knowledge and practical skills. The activities and participation of lecturers and students are formulated on the basis of the individual stages of the standard model. The results of the expert assessment of the "Standard Model for Manipulative Techniques" show that all experts define the model as an opportunity to improve the quality and effectiveness of the practical training of the nursing and midwifery students. According to the experts, the model focuses on the main elements of the practical training process and defines the responsibilities of lecturers and students. Testing is also an important prerequisite for good theoretical preparation of students. Experts highly appreciate the use of an electronic platform, in the Moodle case, to store information. In addition, students have uninterrupted access to self-preparation and self-evaluation. There are 10 topics related to drug therapy. Within the project, the teaching team structured the curriculum, the tests and the visual materials on the relevant subjects of the practical training sessions. The established platform for distance learning of the students of the Faculty of Public Health of the MU- Sofia was used to launch the Moodle electronic system. Training and instruction of trainers to work with the system was conducted.

Scientific publications and presentations:

- Dimitrova M, P Bikova, D Hadjideleva, et al. Problems and difficulties of the students in absorbing the injection technique. *Zdrave i nauka* 2017;2
- Chaneva G, M Dimitrova, A Terzieva, et al. Introduction of a model for injection equipment in the training process. *Sestrinsko delo* 2017;2
- Dimitrova M, N Vasileva, S Georgieva, et al. Problems in student training in building skills for injection equipment. *Zdrave i nauka* 2017;2

MEDICO-SOCIAL AREA “GRANT’ 2017”

Contract D-76/02.05.2017 Occupational accidents and shift work. Stress biomarkers in saliva

Research team: Prof. Emil Vlaykov Vodenicharov, MD, PhD

- Assoc. prof. Konstantin Mitov
- Assoc. prof. Bisera Atanasova, PhD
- Anelia Ivanova-Kamenova, MD
- Irena Ivanova, MD, PhD
- Vlayko Vodenicharov, MD
- Slava Joneva, MD
- Diyana Dimitrova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Hygiene, medical ecology and nutrition

RESULTS: Aim - study of stress levels and possible relationships between levels of cortisol and zinc in saliva in shift work. Materials and methods - a total of 40 healthy volunteers (31 men and 9 women), with an average age of 37 ± 9 years were included in the study. All of them were engaged in daytime and night shift work. Two saliva samples were collected for each participant in specialized containers - Salivette. First sample between 9 and 11am and second - 15 -17pm. Each salivary sample was assessed for cortisol and zinc levels. The concentration of cortisol in saliva was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Cortisol Saliva EUROIMMUN, batch E180228AS. Zinc levels in saliva were measured by atomic absorption spectrophotometry of AAnalyst 400, Perkin Elmer. MED CALC program was used for statistical analysis of the data. Results – The following values were reported as mean \pm SD (min-max): cortisol 1 - 3.47 ± 2.47 ng / mL (0.50-8.48) and cortisol 2 - 1.58 ± 1.01 ng / mL (0.3- 4.3); zinc 1 - 1.43 ± 0.57 μ mol / L (0.74-2.81) and zinc 2 - 1.49 ± 0.67 μ mol / L (0.41-3.14). A significant difference in the concentrations of cortisol and zinc in saliva was not found among the sexes. A significant difference was found in the levels of cortisol in saliva between the first and the second samples ($p = 0.003$), with higher values being measured in the morning. Such a difference was not found with zinc ($p = 0.953$). A weak positive correlation was found between the levels of cortisol and zinc between the two saliva samples ($r = 0.383$; $r = 0.446$). In the first measurement of cortisol the number of persons with cortisol in the reference intrusion was 69.2% and in the second one - 92.3%. Conclusion – This study is one of the first to look at the levels of cortisol and zinc in saliva as stress markers among employees engaged in machine building in Bulgaria. The observed poor positive correlation in the values of the parameters between morning and afternoon saliva samples is likely to characterize their physiological rhythm. Similar to blood levels, cortisol values in saliva in the morning are significantly higher. The higher number of subjects with overdose cortisol levels in saliva from the morning sample is probably the result of the factors of the work environment and the presence of shift work.

Scientific publications and presentations:

- Vodenicharov V, Ivanova I, Atanasova B. Occupational stress among welders in Bulgaria, Acta morphologica, 25, 2018; (in press).

- Ivanova I, Vodenicharov V, Atanasova B. Study of salivary levels of zinc in healthy, *Acta morphologica*, 25, 2018; (in press).

Contract D-82/02.05.2017 Evaluation of safety of hernia meshes by investigation of their mechanical compatibility with tissues and quality of life of patients

Research team: Miglena Georgieva Kirilova-Doneva, PhD

- Prof. Genka Petrova-Tashkova, DSci
- Assist. Prof. Maria Kamusheva, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Social Pharmacy and pharmacoconomics

RESULTS: The aim of this project is to evaluate the safety of hernia meshes commonly used in practice by examining their mechanical compatibility with tissues and the quality of life of patients. Tensile and relaxation experiments were used to determine the mechanical properties of MicroVal, Vypro and TiO₂mesh staying in a 70-day buffer solution. Changes in their elasticity and compressibility were determined, and it was found that there was a difference in mechanical properties after being in a buffer environment. MicroVal reduces its elasticity and extends in the L2 direction. TiO₂Mesh is extended by 10-20% according to the direction but there are no significant changes in elasticity, while Vypro II shrinks in both directions and breaks in L2 direction at 7% deformation. The mechanical properties of three standards (Surgimesh®, Surgipro™, TecnoMesh®) and five light meshes (Optilene®, TiO₂Mesh™, Parietex™, Vypro™ II, Ultrapro™) were compared with the mechanical properties of human fascia. The results show that Parietex and Vypro™ II have the most elastic properties. TiO₂Mesh and Ultrapro™ show the closest deformability at 16 N / cm to deformability of the fascia. Only the orthotropy of Vypro™ II approaches the orthotroy of the fascia. The quality of life of 68 patients with implanted light (TiO₂) and standard meshes (MicroVal, Parietex, Surgimesh, Surgipro) was evaluated by an EQ5D questionnaire. The overall physical condition is assessed one day after surgery and three months after surgery. The results show that three months after the surgery, patients have no problems with motor activity, self-care and regular activities, only the presence of pain. 24.5% of patients experience mild pain and 20.3% severe pain. There is no statistically significant difference in the pain level according to the used mesh but in the group where standard meshes were implanted, patients experiencing severe pain were more - 23.53% vs. 16.67%. Patients evaluated their condition after surgery using a 100-point scale. At the end of the survey period, they rated their status as very good - the average score was 82.24.

Scientific publications and presentations:

- Doneva M, Kamusheva M, Petrova D, et al. Methods for evaluation of the quality of life after hernia operation. *Social medicine*. 2017;2-3:37-9.
- Doneva M, Sopotenski S, Gerassimov N et al. Quality of life after conventional hernia operation. *General Medicine*, 2018;2:48-52.
- Doneva M, Pashkouleva D. Comparison Study of the Viscoelastic Properties of Light and Heavy Hernia Meshes. *Innov Biomed Technol Health Care (IBTHC)* 2017;1(1):9-13.
- Doneva M, Pashkouleva D. Practical recommendations for application of hernia meshes. *Series on Biomechanics*. 2017;31(2):34-40.

- Kirilova-Doneva M, Pashkouleva D. Investigation of mechanical compatibility of hernia meshes and human abdominal fascia, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2018;29(2):147-58
- Kirilova-Doneva M, Pashkouleva D, Kamusheva M, et al. Investigation of the long-term viscoelastic mechanical properties of hernia meshes, 44 ESAO congress, Vienna, 6-9.09.2017

Contract D-104/02.05.2017 Investigation of the subjective perception of the quality of working life among healthcare workers

Research team: Assoc. Prof. Yanka Petkova Prodanova, MD, PhD

- Prof. Nevena Tzacheva-Hristova, MD, PhD, DSci
- Prof. Karolina Lyubomirova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Ruja Nikolova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Milena Yancheva – Stoycheva, PhD
- Assoc. Prof. Todor Kundurzhiev, PhD
- Assist. Prof. Milena Tabanska – Petkova, MD, PhD
- Assist. Prof. Iva Miteva, PhD
- Assist. Prof. Lydia Hristova, MD, PhD
- Assist. Prof. Marina Samuneva, MD
- Galya Traykova, PhD student
- Tsonka Ivanova, PhD student
- Martina Hudyakova, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Public Health, Dept. "Occupational Medicine", 8 Bialo more Str., 1527 Sofia

RESULTS: The project aims to explore and analyze the subjective perception of the quality of working life of healthcare workers in order to improve their motivation for work. An extensive theoretical study of the concept of quality of working life (QWL) was made. The methods used to measure the subjective perception of QWL were studied out. A survey was carried out through an adapted and validated a questionnaire for measuring the quality of working life of people working in healthcare. The validity of the adapted questionnaire was 0.966. We inquired 510 people working in 8 medical hospitals - different by type of activity, property, and number. The demographic characteristics of the participants were analyzed. QWL was determined. We made: an analysis of subjective perception of QWL; a relation of socio-demographic indicators with QWL assessment; prioritisation and ranking of criteria based on subjective assessment; correlation analysis to study the relationship between QWL and quantitative variables, and the degree of coincidence between the maximum possible assessment and the assessment at the time of the survey. The main problem areas have been identified and a QWL healthcare management model has been developed through a proposed program. The results showed that it was necessary to work towards improving QWL. It was found that the QWL based on the overall score rating (score) was good among 43.33% of the respondents. Only 2.3% of the healthcare workers from the investigated medical hospitals have an excellent QWL. The QWL problem areas, which require intervention are "Remuneration", "Professional Career" and "Social Benefits". From a theoretical point of view the obtained results contribute to a better understanding of the concept

and from a practical - they provide stakeholders with a tool to increase the motivation and satisfaction of healthcare workers.

Scientific publications and presentations:

- Prodanova Y. Quality of working life. Faculty of Public Health, Sofia, 2018, 148 pp.
- Prodanova Y, Kundurzhiev T, Yancheva-Stoycheva M, et al. Investigation of the subjective perception of the quality of working life among healthcare workers. Faculty of Public Health, Sofia, 2018
- Kundurzhiev T, Prodanova Y. Cluster analysis on the subjective perception the quality of working life on the healthcare workers. Health policy and management. 2017;17(4):27-31.
- Prodanova Y, Kundurzhiev T, Tzacheva N, et al. Total level of quality of working life of workers in the field of health care. Health policy and management. 2018;18(1):23-7.
- Prodanova Y, Kundurzhiev T, Yancheva-Stoycheva M. Comparison of quality of working life and its components in the healthcare sector. Occupational medicine and work ability. 2018;(1):42-9.
- Prodanova Y, Kundurzhiev T, Yancheva-Stoycheva M. Translation, adaptation and validation the questionnaire “Quality of working life” by A.P. Egorishin for workers in healthcare organizations. Science and world. 2018;2(54):41-5.
- Kundurzhiev TG, Prodanova YP. Demographic factors for the quality of working life of healthcare workers in Bulgaria. Int J Adv Res. 2018;6(4)
- Prodanova Y, Kundurzhiev T, Yancheva-Stoycheva M, et al. Study of the Quality of working life at the level of criteria and its relation with some demographic characteristics of the workers in healthcare organizations in Bulgaria. East Acad J. 2018,(2):1-13.
- Prodanova Y, Yancheva-Stoycheva M, Kundurzhiev T, et al. Subjective perception of the Quality of working life of healthcare workers: results from a pilot study. Int conference of public health “From European to National Health Policy”. Sofia, Bulgaria. 9-10 Oct 2017. pp. 172-182.

Contract D-105/02.05.2017 Creation of a simulation laboratory for intravenous therapy

Research team: Assoc. Prof. Pepa Rashkova Bikova-Ivanova, MD

- Prof. Galina Chaneva, PhD
- Prof. Ivanka Stambolova, PhD
- Assoc. Prof. Antoaneta Terzieva, PhD
- Assoc. Prof. Deliana Hadjideleva, PhD
- Assoc. Prof. Nadka Vasileva, PhD
- Assoc. Prof. Maria Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Petia Kantareva, PhD
- Assist. Prof. Stefka Georgieva, PhD
- Dimitrina Jordanova, PhD student
- Assist. Prof. Tania Angelova
- Kamelia Bogdanova, PhD student
- Tania Popova, PhD student

- Anushka Dimitrova, PhD student
- Nadia Manolova
- Boriana Simeonova, PhD
- Iliana Sokolova
- Miloslava Ilieva, PhD student
- Antoanra Dimitrova
- Ivanka Milotinova
- Ralica Gerasimova, student
- Eva Angelova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Public Health, Dept. of Health Care, Bialo more str. 8, Sofia 1527

RESULTS: Intravenous therapy is an important part of the practical training of nurses and midwives. This is an important tool to save lives after surgery, trauma, poisoning, burns, and others. Therefore, intravenous therapy has a wide application and importance in medical practice. In order to build practical skills, clinical thinking and professional behavior of students, a "Simulation Laboratory for Intravenous Therapy" was created. The laboratory is equipped and furnished with dummies and supplies for intravenous therapy and videography. There have been developed 50 problem situations from the teaching staff, aimed at taking a professional decision. Two surveys were conducted using a sociological method. Respondents were 350 students from specialty "nursing" and 90 in "midwife" before and after training. On the recommendation of 81.82% of the interviewed students, a "Handbook for intravenous therapy" was developed after an analysis of the scientific literature on the subject. More than half of the students (65.91%) consider that they have acquired additional practical skills in the simulation laboratory. A significant share of the students - 59.77% indicate that they are fully satisfied with the acquired abilities to cope with the complications of intravenous therapy. Practical training of nursing and midwifery students in simulation laboratory conditions increases the efficiency of the learning process. The students consider that their training in a simulation laboratory on intravenous therapy leads to a significant increase in theoretical knowledge and the acquisition of practical skills. Student satisfaction is significantly higher in a simulation laboratory than in a practical cabinet. This, in turn, leads to more complete inclusion of students in intravenous therapy during clinical practice.

Scientific publications and presentations:

- Hadzideleva D, Sokolova I, Traycheva B, et al. Learning the professional competence of students on intravenous therapy. *Zdrave I nauka*, 2018;2
- Bikova P, Dimitrova M, Vasileva N, et al. Satisfaction of students in a simulation laboratory for intravenous therapy. *Zdravni grizhi*, 2018;2
- Chaneva G, Terzieva A, Bogdanova K., et al. Simulation laboratory on intravenous therapy - innovative method of learning. *Sestrinsko delo*, 2018;2

Contract D-106/02.05.2017 Implementing of education in bioethics at contemporary schools – factor for healthy lifestyle of the growing up generation

Research team: Prof. Antoniya Yordanova Yanakieva, PhD

- Assoc. prof. Alexandrina Vodenitcharova, PhD

- Assoc. prof. Kristina Popova, PhD
- Assist. Prof. Antoniya Trendafilova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Public Health, Dept. of Health Policy and Management, 8 Bialo more str., 1527 Sofia

RESULTS: The aim of the project is to assist and initiate bioethics training of kids and teenagers on the basis of ethical principles from the Universal Declaration on Bioethics of UNESCO. The project puts into practice the methodology and the First pilot program of the European Centre of Bioethics, Italian Unit of the Dept. on bioethics of UNESCO. A course was carried out for the education of teachers in different age gropes /children from 3 to 18 years/ in Sofia schools and academic teachers in the Faculty of Public Health with main methods – lectures, seminars, analyses of publications and cases, simulation games, round table and work in small groups. Books and professional advice were placed at teachers’ disposal. Teachers that successfully passed over the course got certificates as a guarantee for the acquired knowledge and skills necessary for their professional work as teachers on Bioethics in the Bulgarian educational system. We made a study of teachers’ opinion and suggestions for the implementation of a syllabus for bioethics education in the schools and the needed teaching aids. Respondents specify as the utmost benefit of education that students will study the methods for applying the bioethical principles, the active participation in debates and decision making /80%/. Two-thirds of respondents consider it necessary to implement bioethics education and one-third point at the presence of different difficulties for the implementation of education. 60% of teachers indicate that the bioethics program is appropriate for all children up to 18 years. One-fifth of the participants point the age from 7 to 14 years as the most suitable for bioethics education. All teachers consider the course as helping their teaching, giving a fresh direction of their work and express a desire to continue their education on bioethics.

Scientific publications and presentations:

- Yanakieva A, A Vodenitcharova, K Popova, et al: Implementing of education in bioethics at contemporary schools – factor for a healthy lifestyle of the growing up generation. *J of IMAB*. 2019;25(1):2362-8
- Vodenicharova A. Introducing bioethics training in contemporary schools - a factor of healthy lifestyle of young people. World Bioethics Day 2017. MU-Sofia, Oct 19, 2017

Contract Д-107/02.05.2017 Conceptual model for assessing safety as quality element of medical services

Research team: Prof. Zlatitsa Georgieva Petrova, MD, PhD

- Elisaveta Petrova-Geretto, PhD student

Organisation: Medical University Sofia, Public Health Faculty, Dept. of Health Policy and Management, 8 Byalo more str. 8, Sofia

RESULTS: To develop a model for assessment of medical services safety in health establishments and to change control mechanisms from reactive to proactive (prospective) auditing, based on questionnaires’ analysis and preliminary risk assessment. The research goal is to assess to what degree and how medical professionals and patients react and how are issues tackled after an accident and/or medical error has been registered in light of the two approaches, described in scientific literature as “culture of accusation” and “culture of trust”. To analyze the

medical specialists' perceptions of safety as an element of quality medical services. To study the manner in which arising issues are analyzed in terms of how "personal" or "system" approach is applied. To study how the issue of patients' safety is discussed and if it discussed adequately in the public sphere and state administration. To develop and propose a conceptual model for assessing safety as a quality element and quality and medical services safety control by applying the risk assessment approach. The research object was the attitude medical specialists (physicians, nurses, and midwives) and patients have towards patients' safety in five multi-profile hospitals for active treatment, two of which are University hospitals, two Regional hospitals, and one private hospital. The hospitals are located in four Regional centers: Stara Zagora-2, Varna, Bourgas, and Kardzhali. Research characteristics are qualitative and quantitative, deployed in several groups: patients' safety, serious adverse drug reactions, medical errors, sentinel events consequences, etc. 121 physicians, 174 health professionals (nurses and midwives) and 157 patients took part in the research. Questionnaires were developed by the Executive Agency of Medical Audit while research was undertaken by the research team. Data were processed by mathematical and statistical methods: alternative, variation and graphic analysis. The research was undertaken between May and December 2017 in cooperation with the respective hospital management. Results confirm our hypothesis that irrespective of the fact that there are rules and procedures in place in order to ensure patients' safety, a number of various medical errors happen in health establishments. There is predominantly "culture of accusation" presently in health establishment as well as fear of punishment due to the fact that the "personal approach" is used when analyzing medical errors. A separate part of research findings discusses the reasons behind medical errors, omissions, and misfortunes. It is believed that they are rooted in work overload of medical specialists, the strain on human resources that is an insufficient number of medical specialists, insufficient qualification, ineffective communication, and poor organization thus there system-related causes of omissions and misfortunes. Our third hypothesis has also been confirmed according to which patients' safety is not discussed adequately in the public sphere and government institutions (hospitals, media, Parliament). Unfortunately, today, the term "physicians' errors" is used inappropriately and without understanding the vast terminology behind "medical errors" which causes tensions within medical society and in the public which creates unreasonable negativism towards the most humane of professions. Developing a patients' safety system is a long and demanding process which will touch upon not only hospitals but also all participants in the healthcare system. Yet quality assessment and patients' safety is a pressing issue in a number of countries and Bulgaria should actively participate in the debate. The proposed model is geared towards reducing medical errors and improving patients' safety in health establishments, but it requires leadership, a commitment of top managers and developing an organisational culture which motivates staff to see errors as opportunities for improvement. The model structure has the following steps: Applying system approach when analysing medical errors and consequently, defining proper terminology; Classification of sentinel events/ medical errors; Developing indicators for assessing patients' safety; System for registering medical errors; Expanding scientific research in patients' safety and medical errors; Applying risk management in health establishment as regular practice for ensuring patients safety and quality control; Training of physicians, health professionals and administration in quality control.

Scientific publications and presentations:

- Petrova Z, Kostov I. Conceptual model for developing patients' safety system. J "Health policy and management 2018;2

- Tsankova M, Petrova Z, Geretto E. Medical risk management in obstetrics and gynecology practice. J Health policy and management 2018;2
- Petrova Z, Geretto E, Gigova A. Risk management in medical practice. Required physicians behavior. J Health policy and management 2017;17(4):32-38

Contract D-108/02.05.2017 Content of flavonoids and total fenols in Bulgarian foods and structuring the information in data registry

Research team: Prof. Vihren Nikolaev Petkov, MD, PhD.

- Prof. Vihren Petkov, MD, PhD
- Prof. Fanka Ribarova, PhD
- Assoc. Prof. Silvia Tsanova-Savova, PhD
- Assoc Prof. Eng. Stefna Velikov, PhD
- Slaveika Paneva

Organization unit: Medical College “J. Filaretova” – Sofia, Medical University – Sofia

RESULTS: Food is the factor that, based on the current scientific knowledge, can modulate the physiological processes affecting the health status of the organism and could be engaged comprehensively and selectively in each particular individual’s self-control. The development of the current project is focused on the realization of an information resource for the content of bioactive compounds – flavonoids and total phenols in Bulgarian foods, to guarantee their correct implementation in nutrition, medicine, pharmacy and food technologies as well as to enable data input into international networks for exchange of scientific information on food composition. The results of the survey present: Comprehensive scientific arguments on the necessity of a food composition database complying with the particular current requirements at all methodological process stages: identification, sampling, analysis, calculation approaches and data presentation; Information about the historical development of the knowledge on food composition databases until the onset of establishment of international networks for data exchange; Characteristics of flavonoids as bioactive substances in foods supporting human health; Implementation of validated analytical methods for determination of total phenols, total flavonoids and flavonoid composition spectrum providing the relevant parameters for analytical quality of each applied analytical method (sensitivity, accuracy, reproducibility, and uncertainty); Compiled tables listing the content of the tested indicators (6 classes, 15 flavonoid types and total phenols) in 25 Bulgarian fruits (2636 samples – 29 pages) and 33 vegetables (467 samples – 36 pages); Comparative assessment of the values presented in our database and respective available values listed in certain international databases; A constructed information model for multiple and multi-targeted use of the information listed in the tables. The realized survey presents for the first time its own database containing data for the flavonoid and total phenols content in Bulgarian foods that are of particular importance for the establishment of healthy, preventive and curative nutrition of the Bulgarian population. The presented data are important also for the identification of the biodiversity among fruits and vegetables cultivated in our country – information that is essential for the economy and trade providing healthy foods.

Scientific publications and presentations:

- Tsanova-Savova S, S Velikov, V Petkov. The Flavonoids Composition of Bulgarian Foods – Comparison with USDA Database, Bulg Chem Commun 2018;50(Spec Issue C):286-92.
- Velikov S, F Ribarova. Information systems in food science, Health and Science, Infodent-BG, 2018
- Tsanova-Savova S, S Velikov, F Ribarova. Content of flavonoids and total phenols in Bulgarian foods. Database, Studio KAM, 2018
- Tsanova-Savova S, S Velikov, V Petkov. The Flavonoids Composition of Bulgarian Foods – Comparison with USDA Database, 1st Int Conference on Bioantioxidants, Sofia, 25-29 Sep 2017.

COMPETITION „YOUNG SCIENTIST” 2016-2017

MEDICO-BIOLOGICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2016”

Contract 1-D/2016 Molecular characteristics of *von Hippel-Lindau* syndrome in Bulgarian patients

PhD student: Maria Tsaneva Glushkova

PhD supervisor: Acad. Vanyo Mitev, DSc, Assoc. Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave Str. 2, Sofia 1431, Bulgaria

RESULTS: Within the frame of the present scientific study, our team introduced and optimized successfully pre-selected molecular genetic techniques for the diagnostics of the *VHL* gene by means of sequencing analysis for point mutations and MLPA analysis for large deletions and duplications in a selected group of Bulgarian patients with clinical diagnosis of von Hippel-Lindau syndrome (VHL). The target group of 10 Bulgarian patients was clinically well characterized. The molecular-genetic analysis revealed the presence of 5 mutations in the *VHL* gene. One of them is a complex mutational event, which is the first genetic variant from this type and it has not been previously described in the literature. The mutation combines duplication and indel. The verification of the mutation spectrum of the *VHL* gene in Bulgarian patients will enrich the worldwide mutation database. Genotype-phenotype correlations in VHL patients are difficult to interpret due to the extremely heterogeneous manifestation of the disease, which is a combination of many different clinical features. It is necessary to carefully characterize the genotype to confirm or reject the clinical diagnosis. Therefore, the molecular genetic analysis and subsequent genetic counseling with a detailed interpretation of the results during the prenatal and postnatal testing are exclusively important for the affected patients and their families. The VHL diagnosis in due time could improve disease prevention and successful treatment of malignancies. Early detection and removal of the tumor formations could prevent or minimize the development of neurological symptoms, hearing loss, loss of vision and the need for renal replacement therapy.

Scientific publications and presentations:

- Glushkova M, Dimova P, Yordanova I, et al. Molecular-genetic diagnostics of von Hippel-Lindau syndrome (VHL) in Bulgaria: first complex mutation event in the VHL gene. *Int J Neurosci* 2018;128(2):117-24.
- Glushkova M, Yordanova I, Todorov T, et al. A novel frameshift mutation in Bulgarian patient with von Hippel-Lindau syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2016, E-P12.104. Barcelona, Spain, May 21-24, 2016.

Contract 2-D/2016 Algorithm for detection of macrolide resistance mechanisms in Bulgarian clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*

PhD student: Adile Akifova Muhtarova

PhD supervisor: Assoc. prof. Raina Tzvetanova Gergova, MD, PHD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical microbiology, Zdrave str. 2, Sofia, 1431

RESULTS: The aims of this study was to determine the presence of resistance to important class antimicrobials - macrolides, representing the first line of therapy for people with penicillin allergy or after unsuccessful initial beta-lactam therapy. The Kirby-Bauer disk diffusion method for determine of antimicrobial susceptibility and the minimal inhibitory concentration (MIC) to some macrolides were used to achieve the goal. For the detection of macrolide resistance genes were used Multiplex PCR. Results obtained show the presence of macrolide resistance genes in about 23% of strains isolated in 2013-2014y and nearly to 40% of those isolated in 2015-2016. The predominant macrolide resistance gene in Bulgarian strains GAS is *mef (A)*, and the presence of the *erm (B)* gene results in the highest levels of resistance with MIC > 256 in the GAS isolates that possess it. Furthermore, the presence of *erm (B)* is always associated with potential resistance (inducible or constitutive) to clindamycin. For the first time in Bulgaria, a high percentage of resistance of GAS strains to macrolides is proved, using a combination of two sets of molecular-genetic and phenotypic methods. These data show a tendency to increase macrolide resistance in recent years, which is linked to the need for their more precise use as empirical therapy for streptococcal infections.

Scientific publications and presentations:

- Muhtarova A, Gergova R, Mitov I. Distribution of macrolide resistance mechanisms in Bulgarian clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* during the years of 2013–2016. J Glob Antimicrob Resist. 2017; 10: 238-242.
- Muhtarova A, A Staykova, B Borissova, et al. New problematic resistance in Bulgarian isolates *Streptococcus pyogenes*. Jubilee Scientific Conference for lecturers, students and specialists in healthcare "10 years specialty Medical Assistant at Medical College Stara Zagora" 2016, 20-21 Oct, Stara Zagora, Collection of Reports, pp. 38-41.
- Muhtarova A, R Gergova, I Mitov. Exploring the mechanisms of macrolide resistance in Bulgarian clinical isolates *Streptococcus pyogenes* using modern molecular-genetic methods. "Molecular Biology - New Horizons". Second Doctoral Symposium. Sofia, BAS, 6-7 April 2017

Contract 5-D/2016 Quantitive real time PCR analysis of chromosomal microaberrations, detected by microarray technology in patients with complex epileptic syndromes

PhD student: Valentina Lyubenova Peycheva

PhD supervisor:

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave str. 2, Sofia 1431

RESULTS: There are syndromic conditions in which epilepsy is part of a more complex phenotype, where, in addition to the epileptic seizures, mental retardation, autism spectrum disorders, speech retardation, structural-brain abnormalities, and general and / or facial dysmorphisms are observed. These conditions are due to both point mutations in one or several genes, and Copy Number Variations (CNVs) of fragments of DNA with different size, affecting one or multiple genes. In a previous research project, our team performed microarray analysis in preliminary selected group of patients with complex neuro- psychological phenotype. In 6 patients potentially pathogenic chromosomal aberrations were detected. Within the current project, we validated these 6 aberrations- 3 duplications and 3 deletion using real time quantitative PCR method. This study has led to confirmation of the suspected diagnosis in two patients, determination of genetic diagnosis in one patient, detection of the potential cause of part of the symptoms in two patients, and a potential association of an aberration with the clinical characteristics in one patient. This will contribute to the clarification of the patients diagnosis in our cohort as well as will improve genetic counseling in the affected families who are at high risk for future pregnancies.

Scientific publications and presentations:

- Peycheva V, Ivanova N, Kamenarova K, et al. “Molecular genetic and genomic approaches in patients with idiopathic generalized epilepsy and complex epilepsy syndromes”. National Child neurology, Psychiatry and Development Psychology Conference, “Park Hotel Moscow”, Sofia, Bulgaria, Oct 20-22, p. 45-46.
- Peycheva V, Kamenarova K, Ivanova N, et al. “Microdeletions and duplications as genetic cause of neurodevelopmental disorders in Bulgarian patients”. The Eur Human Genetics Conference, Copenhagen, Denmark, May 27–30, 2017
- Peycheva V, Kamenarova K, Ivanova N, et al. Chromosomal microarray analysis of Bulgarian patients with epilepsy and intellectual disability. *Gene*. 2018; 667:45-55.

Contract 8-D/2016 Next generation sequencing by synthesis in selected group of patientst with different types of Congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT)

PhD student: Valentin Martinov Penchev

PhD supervisor: Acad. Prof. Vanyo Ivanov Mitev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave str. 2, Sofia 1431

RESULTS: Congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT) accounts for the majority of the developmental anomalies of the kidney and the urinary tract observed during the prenatal and postnatal period. These cases are often associated with chronic kidney disease (CKD) or end-stage renal failure (ESRD), thus leading to significant morbidity and mortality. Thanks to the extensive genetic studies carried out during the last few years in diverse populations and ethnic groups, the role of multiple genes for the pathogenesis of these disorders has been demonstrated. So far more than 70 genes have been found to contribute to the pathology of renal cystic diseases. The majority of them code transcription factors with key role for cell differentiation during embryonic development. The other part are proteins with essential role for the function and structure of the cilia, which places a large proportion of the renal cystic diseases among the ciliopathies - a heterogeneous group of degenerative developmental disorders

characterized with defects in the cilium-centrosome complex. The results revealed the heterogeneity of the congenital anomalies of kidney and urinary tract and especially in the cases of the so called complex phenotypes. The genetic defects detected in *PKD2* and *SIX2* genes demonstrate the benefit of the implementation of high throughput molecular genetics techniques like NGS. In addition we found number of variants in modifying genes (*PKHD1*, *NOTCH2*) which contribute to the pathological phenotype. The results will help for better understanding, diagnosis and consultation of the patients and their families.

Contract 11-D/2016 Expression analysis of Toll- like receptor 2(TLR2), Toll-like receptor 4(TLR4) and Toll-like receptor 7(TLR7) in patients with chronic otitis media and chronic rhinosinuitis

PhD student: Stoyan Ivanov Dimitrov

PhD supervisor: prof. Spiridon Todorov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Otorhinolaryngology, Byalo More str. 8, Sofia 1527

RESULTS: Levels of expression of *TLR2* and *TLR4* can not separately distinguish patients with CRS from healthy controls. Combining them have the potential to distinguish patients from controls as we found sensitivity level at 80% and specificity level at 66.7%. Expression levels of *TLR2* and *TLR4* can reliably distinguish patients with CRSwNP from those with CRSsNP. Combining them does not improve diagnostic accuracy. Expression levels of *TLR2* and *TLR4* separately as well as in combination, can not reliably distinguish patients with COM from healthy controls. Expression levels of *TLR2* and *TLR4* separately can reliably distinguish patients with CRS from patients with COM. It is necessary to confirm the results in bigger group of patients and controls.

Contract 12-D/2016 Expression analysis of an expanded panel of selected hypoxic micro RNAs in patients diagnosed with larynx cancer in tissue and plasma samples

PhD student: Silva Garo Giragosyan

PhD supervisor: Prof. Vanio Mitev, MD, PhD, DSc & Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry & Biochemistry

RESULTS: Laryngeal carcinoma accounts for 2.4% of all malignancies worldwide. Despite innovative methods for treating larynx cancer, such as radio and chemotherapy, and surgical approaches, 5-year survival remains 64%, unchanged in recent decades. This necessitates the introduction of potential biomarkers, including non-invasive, relevant in the medical, biological and clinical practice of larynx cancer. Recently, micro RNAs have proven to be potential biomarkers. We analyzed the expression levels of miR-221-3p and miR-424-5p, whose activity was influenced by hypoxia and related to angiogenesis processes. Expression levels of miR-221-3p and miR-424-5p were analyzed in tissue laryngeal and plasma material in 20 patients. MiR-

424-5p can differentiate tumor from normal laryngeal tissue with 70% sensitivity and 65% specificity (AUC = 0.695, p = 0.035; 95% CI: 0.530-0.860). In combination, the two micro RNAs showed higher resolution values: 90% sensitivity and 60% specificity (AUC = 0.785, p = 0.002, 95% CI: 0.642-0.928). In the analysis of microRNAs as non-invasive markers in patients with laryngeal cancer we received the following data: miR-221-3p distinguishes patients from healthy patients with 80% sensitivity and 71.4% specificity (AUC = 0.814, p = 0.001; 95% CI: 0.685-0.943), miR-424-5p distinguishes larynx cancer patients from healthy controls with 81% sensitivity and 50% specificity (AUC = 0.643, p = 0.118, 95% CI: 0.472-0.814). In combination, the two markers have higher resolution values: 90.5% sensitivity and 75% specificity (AUC = 0.855, p = 0.0001; 95% CI: 0.735-0.974). In conclusion, we can report that the combination of microRNAs: miR-424-5p and miR-221-3p can serve as a potential biomarker to distinguish both laryngeal tumor tissue from both normal and diseased cancer patients Larynx from healthy controls. The results obtained can serve to develop new projects to confirm initial results.

Scientific publications and presentations:

- Giragosyan S, G Stancheva, T Popov, et al. Involvement of miR424-5p and miR-221-3p in tumour metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. ESHG 2017, Copenhagen, Denmark
- Giragosyan S, G Stancheva, T Popov, et al. miR-221-3p and miR-424-5p may act as non-invasive biomarkers in detection of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. MDSC 2017, Pleven, Bulgaria

Contract 13-D/2016 Neuroprotective and antioxidant activity of newly synthesized C-8 caffeine derivatives with arylpiperazine fragment on different toxicity models *in vitro*

PhD student: Alexandra Victorova Kasabova

PhD supervisors:

- Assoc. prof. Virginia Tzankova, PhD, ERT
- Assoc. prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD, ERT

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Dunav Str. 2, 1000 Sofia

RESULTS: In this investigation, we evaluate the possible neuroprotective and antioxidant activity of newly synthesized C-8 caffeine derivatives with arylpiperazine fragment on different toxicity models *in vitro*. As result of our experiments on neuroblastoma cell line SH-SY5Y and isolated rat brain synaptosomes, we found that compound 4d showed lowest neurotoxic effects. In conditions of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress on cellular and sub-cellular level, 4d revealed highest neuroprotective and antioxidant effects. 4d, at concentration 1 μ M, had highest inhibitor effect on the activity of human recombinant MAOB enzyme. All these effects of 4d, might be due to the expected highest free radical scavenging activities of free and highly activated methoxy group on 4th position in the arylpiperazine fragment in the structure of the evaluated caffeine derivatives, substituted on 8th position with arylpiperazine moiety.

Scientific publications and presentations:

- Kondeva-Burdina M, V Tzankova, A Kasabova, et al. Evaluation of the Neuroprotective Effects of Biologically Active Substances from Natural and Synthetic origin. VIth Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, October 13-16, 2016:28

- Angelov B, Kasabova A, Kondeva-Burdina M, et al. In vitro effects of newly caffeine derivatives on isolated rat synaptosomes. 7th Global Experts Meeting on Neuropharmacology, Milan, Italy, Jul 31-Aug 02, 2017

Contract 14-D/2016 Prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum* L. - isolation, structural characterization and pharmacological testing for antineoplastic activity

PhD student: Yana Emilova Ilieva

PhD supervisor: Assoc. prof. Paraskev Nedyalkov & prof. Georgi Momekov, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy

RESULTS: The dichloromethane extract of *Hypericum olympicum* L. was processed and four acylphloroglucinols were attained. Their structures were elucidated by means of spectral methods (Mass and NMR spectroscopy). Two of the substances turned out to be known previously isolated compounds namely olympicin A and hyperpolyphyllirin/hyperibine J. One of the acylphloroglucinols is a known undescribed natural substance (Compound Pa1). The fourth compound turned out to be a new natural product and it is given the name olympiforin A. As expected all of the tested phloroglucinols demonstrated cytotoxic activity within the micromolar range, with IC₅₀ values in the interval 1.15 - 24.94 µM against the tested tumor cell lines. All compounds except the substance Pa1 exerted more specific inhibitory effect on the tumor cell lines and selectively less strong effect a non-cancerous cell line. Multi-drug resistant tumor cell line was more sensitive to the compounds (except hyperpolyphyllirin/hyperibine J) in comparison to a chemosensitive parent cell line. The acylphloroglucinols proved to inhibit the proliferation of vascular endothelial cells (angiogenesis) at micromolar concentrations. Western blot analysis showed activation of procaspase 9 in one of the treated cell lines. Therefore the mechanism mediating the cytotoxicity of olympicin A, hyperpolyphyllirin/hyperibine J and olympiforin A is apoptogenic with recruitment of the intrinsic (mitochondrial) pathway of programmed cell death. The results of this study are another confirmation that polyprenylated acylphloroglucinols (PPAPs) are perspective lead structures for obtaining antineoplastic agents with pleiotropic effects.

Scientific publications and presentations:

- Ilieva Y, P Nedyalkov, G Momekov. Major cytotoxic acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum* L. VIth Congress of Pharmacy, Sandanski, Bulgaria, 13-16 Oct 2016, p53.

Contract 15-D/2016 Investigation of non-steroidal anti-inflammatory drugs for antiviral activity

PhD student: Lyubomir Trifonov Marinov

PhD supervisor: Assoc. Prof. Irina Nikolova, MD, PhD & Prof. Nikolai Danchev MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy & Toxicology

RESULTS: Non-steroidal anti-inflammatory products (diclofenac, metamizole, meloxicam, lornoxicam, ketoprofen, dexketoprofen) were studied for potential antiviral effects. Initially, the maximum non-toxic concentrations (MNC) and cytotoxic concentration 50 (CC50) were determined by the effect of various concentrations on MDBK cell line survival by the MTT assay. The MNC values obtained showed that the highest toxicity was observed in metamizole - 2.73 mg/ml, followed by ketoprofen - 0.729 mg/ml, dexketophen - 0.560 mg/ml, diclofenac - 0.141 mg/ml and meloxicam - 0.070 mg/ml. The least toxic is lornoxicam with a value for CC50-0.0125 mg/ml. The influence of NSAIDs on the replication of human herpes virus type 1 strain F using a modified MTD test by the Reed-Muench method was also determined. The substances were applied in concentrations corresponding to their MNCs and two-fold dilutions. Experimental data on MNC administration showed well-expressed protection (30-40%) of ketoprofen, dexketoprofen, metamizole, meloxicam and Neodolpase. The protection of diclofenac and lornoxicam was negligible (6-7%). The influence of preparations on extracellular virions through direct contact method was also investigated. None of the products tested showed any virucidal effect.

Contract 16-D/2016 Investigation of in vitro inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity by hybrid compounds composed of Galantamine and 4-aminopyridine

PhD student: Ivanka Ivanova Kostadinova

PhD supervisor: Prof. Nikolai Danchev, MD, PhD & Assoc. Prof. Irina Nikolova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy & Toxicology

RESULTS: Investigated compounds were synthesized according established scheme. The newly synthesized peptide derivatives of 4-aminopyridine were characterized by melting points, TLC and NMR spectroscopy. Using the MTT-test was investigated the influence of compounds on the vitality of three cell lines- HepG2, Nevro-2a и bv-173. IC50 values of compounds 1, 2, 3, 4 and 5 on cell line bv-173 after 72 hours are respectively 3, 10, 7, 25, 16 μ M. IC50 values of compounds 1, 2, 3, 4 and 5 on cell line Nevro2a after 72 hours are respectively 22, 14, 14, 84, 44 μ M. IC50 values of compounds 1, 2, 3, 4 and 5 on cell line HepG2 after 72 hours are respectively 107, 80, 118, 117, 102 μ M. The enzyme inhibition activities for acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) was evaluated according to the spectrophotometric method previously reported by Ellman et al., 1961. The inhibitory activity of tested compounds is different and varied depending on enzyme type. The most active is compound 6 with AChE and BuChE inhibitory activity 77,5 % and 47,5 % respectively. We suppose that compounds 4 and 6 showed more significant AChE and BuChE inhibitory activity in comparison to other compounds due to presence of Galantamine in their chemical structures.

Scientific publications and presentations:

- Kostadinova I, N Danchev, I Nikolova, et al. Investigation of in vitro inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity by hybrid compounds composed of Galantamine and 4-aminopyridine. VIth Congress of Pharmacy. Oct13-16, 2016 Sandanski, Bulgaria

- Kostadinova I, N Danchev, I Nikolova, et al. Investigation of in vitro inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity by hybrid compounds composed of Galantamine and 4-aminopyridine. 13th Int Conference on Alzheimer's and Parkinson's disease, Vienna, Austria, 29.03-02.04.2017

MEDICO-BIOLOGICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2017”

Contract D-131/02.05.2017 Molecular-genetics analysis of TSC2 gene in Bulgarian patients with Tuberous sclerosis

PhD student: Maria Tsaneva Glushkova

PhD supervisor: Acad. Vanyo Mitev, DSc and Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria

RESULTS: Within the frame of the current scientific study, our team introduced and optimized successfully pre-selected molecular genetic techniques for the diagnostics of the *TSC2* gene, including sequencing for point mutations detection and MLPA analysis for large deletions/duplications, and we applied this diagnostic approach on a selected group of Bulgarian patients with suspected clinical diagnosis of Tuberous sclerosis. The present study is the first step towards the molecular-genetic analysis of Tuberous sclerosis in Bulgarian patients. The clinical diagnosis was confirmed on a molecular level in 11 out of 21 patients (52%) from the analyzed target group. Four novel unpublished mutations were found in the *TSC2* gene, two of which were frameshift, one nonsense and one large deletion of 16 exons. In addition, 7 mutations already described in the literature were found in the *TSC2* gene. All detected variants in the *TSC2* gene in our group are missense (36% at 4/11), frameshift (27% at 3/11), nonsense (18% at 2/11) mutations, one splice site mutation (10%) and one large deletion (10%). In the targeted group of Tuberous sclerosis, the clinical manifestation was extremely heterogeneous, which did not allow clear genotype-phenotypic correlation to be drawn. Severe anticipation was found in part of the affected families. The early detection of mutations in the *TSC2* gene and the application of adequate therapy involving the mTOR inhibitors would help the disease treatment and will benefit both the affected patients and their families.

Scientific publications and presentations:

- Glushkova M, Bojinova V, Koleva M, et al. Molecular-genetic diagnostics of Tuberous sclerosis complex (TSC) in Bulgaria: six novel mutations in the TSC1 and TSC2 genes. *J Genet.* 2018;97(2):419-27.

Contract D-133/02.05.2017 Evaluation of the impact of 4-methoxy derivatives of salicylaldehydebenzoylhydrazone (SBH) on free radical processes in ROS generation *in vitro* model systems. Raman analysis of the structure-antioxidant properties relation ship

PhD student: Nadya Georgieva Hristova-Avakumova

PhD supervisor: Assoc. prof. Vera Angelova Hadjimitova, PhD

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of medical physics and biophysics, Bulgaria, Sofia 1431, 2 Zdrave str., Bulgaria

RESULTS: Hydrazones are class of organic compounds famous with their broad spectrum of biological activities. The aim of the present study is to perform a comparative evaluation of the antioxidant properties of new designed 4-methoxy SBH derivatives and to find the correlation between the data obtained via a vibrational spectroscopic approach of the hydrazones and their antioxidant activity. The antioxidant activity of the investigated compounds was tested in *in vitro* chemiluminescent and spectrophotometric model systems. This gave us the possibility to discriminate the effect due to direct integration of the compounds with ROS from the impact of the used methods for registration. The hydrazones demonstrated good scavenging activity against H_2O_2 and $O_2^{\bullet-}$. Despite their capability to diminish the concentration of $O_2^{\bullet-}$ in the KO_2 containing chemiluminescent model systems, the 4-methoxy derivatives might participate in ROS generated free radical damage during ischemia-reperfusion injury according to the data obtained using lummol dependent CL in a system of xanthine-xanthine oxidase generated superoxide. The 4mShBH derivative which has demonstrated the best capability to diminish the chemiluminescent lightening in the KO_2 containing model systems is the most suitable compound for modulation and suppression of the initial stages of ROS generation. The analysis of the Raman spectra of the investigated compounds revealed displacement of the peak in the range $1500 - 1600\text{ cm}^{-1}$. Lowest molecular vibrational energy levels were observed for 4mShBH and 4mSBH, followed by SBH and 4mSIH. The obtained data corresponds with the results observed in the NBT - xanthine system. The chemiluminescent response in the xanthine-xanthine oxidase generated superoxide enzyme system is incising in the same order.

Scientific publications and presentations:

- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Traykov T, et al. 4-methoxy aroylhydrazones - promising agents protecting biologically relevant molecules from free radical damage. Bulg Chem Commun 2018;50(issue C):332-7
- Hristova-Avakumova N, Nikolova-Mladenova B, Traykov T, et al. 4-methoxy aroylhydrazones - promising agents protecting biologically relevant molecules from free radical damage. Ist Int Conference on Bio-antioxidants, Sofia 25 – 29 Jun 2017

Contract D-134/02.05.2017 Relationship between arterial stiffness and circulating cardiovascular risk markers in individuals of two age groups

PhD student: Rene Dimitrova Mileva-Popova, MD

PhD supervisor: Associate Professor Nina Yurieva Belova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Physiology

RESULTS: Thirty asymptomatic individuals aged 20 (20y/o) or 50 (50y/o) years were recruited in the study. Informed consent for their participation was obtained. All subjects were subjected to the active orthostatic test (OT) comprising three five minute periods: baseline (supine), active standing and recovery (supine). At the end of each period, applanation tonometry was applied for central elastic arterial wall evaluation. Electrocardiogram was continuously recorded for heart rate variability analysis (HRV). The metabolic markers: fasting glucose, lipid profile, high

sensitive C-reactive protein, homocysteine, and uric acid were measured at the Clinical Laboratory of Alexandrovska Hospital. Essential alterations in the arterial stiffness indices were shown in the 50y/o individuals at baseline – significantly higher aortic systolic (122±6 in the 50y/o vs. 96±3 mm Hg in the 20y/o) and pulse pressure (44±4 in the 50y/o vs. 30±3 mm Hg in the 20y/o), larger augmentation indices. Significant differences between the groups were evidenced in the hemodynamic response to OT as well. The response to the active standing in the 50 y/o group was less efficient – aortic systolic and pulse pressure dropped significantly, aortic diastolic pressure rose to a lesser extent. These findings evidenced the development of arterial stiffness. These conclusions were supported by the HRV indices as well. Significant differences between the groups were shown for most of the studied metabolic markers (## p < 0,05; ## p < 0,01).

	Glucose (mmol/l)	Total cholesterol (mmol/l)	LDL-cholesterol (mmol/l)	VLDL-cholesterol (mmol/l)	Triglycerides (mmol/l)	hs-CRP (mg/l)
20r	4,8±0,1	3,8±0,2	2±0,2	0,4±0,05	2±0,2	0,8±0,1
50r	5,6±0,1 ^{##}	5,9±0,3 ^{##}	3,3±0,3 ^{##}	1,0±0,3 [#]	2,8±1 [#]	2,1±0,6 [#]

We have shown a positive correlation between glucose and LDL-cholesterol levels and the augmentation index as the major stiffness marker in the 50 y/o group that gave us ground to suggest these biochemical markers were of high informative value and produced the largest impact on the development of arterial stiffness.

Scientific publications and presentations:

- Belova N, Mileva-Popova R. Age and gender influence the hemodynamic response to the active orthostatic test. 5th Int Conference on Prehypertension, Hypertension and Cardio Metabolic Syndrome. Venice, Italy, 22-25 Feb 2018.
- Mileva-Popova R, Belova N. Metabolic profile and heart rate variability as an indicator of the cardiovascular sympathetic influences in female individuals of two age groups. XXII Int Scientific Conference of the Union of Scientists – Stara Zagora, 1-2 Jun 2017

Contract D-135/02.05.2017 Determination of leptin-induced expression of the phosphorylated signal transducer and transcription activator 3 (pSTAT3) in the preoptic area of the anterior hypothalamus of rats with normal body weight and model of obesity

PhD student: Milen Hristov Hristov

PhD supervisor: Prof. Krassimira Simeonova Yakimova, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pharmacology and Toxicology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: Leptin is an adipokine that reduces food intake and increases energy expenditure via activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway in mammal hypothalamic neurons. The degree of leptin-mediated STAT3 phosphorylation (pSTAT3) serves as a marker of cellular leptin responsiveness. Neurons, expressing the long form of the leptin receptor have been found in several hypothalamic sites, including the medial preoptic area (MPA). The MPA is necessary for a wide range of physiological and behavioral functions in mammals, including thermoregulation, arousal, sodium, and fluid balance, gonadotropin release, feeding, and sexual responses. The failure of elevated leptin levels to suppress feeding and mediate weight loss in common forms of obesity defines a state of so-called leptin resistance. In this study, we demonstrate that feeding

rats with cafeteria diet for a period of 9 weeks resulted in a significant increase in body weight, Lee index and serum leptin concentration. Using the immunohistochemical method for determining pSTAT3, we observed impaired leptin signal transduction in the MPA of male Wistar rats with diet-induced obesity. These data suggest the development of leptin resistance at the level of STAT3 activation in MPA of the obese rats. The results are consistent with our previous report of disturbances in leptin effects on the firing rate of MPA neurons in rats with an experimental model of obesity.

Scientific publications and presentations:

- Hristov M, Landzhov B, Kamenova K, et al. Diet-induced obese rats are associated with leptin resistance in the medial preoptic area of the anterior hypothalamus. CR Acad Bulg Sci. 2018.
- DiBlasi E, Hristov M, Landzhov B, et al. Leptin-induced pSTAT3 changes in MPA of normal and obese rats. XVII Int Congress of Medical Sciences, Sofia, 10-13 May 2018

Contract D-137/02.05.2017 Study of role of hypoxic miRNAs in laryngeal cancer

PhD student: Silva Garo Giragosyan

PhD supervisor: Prof. Vanio Mitev, PhD, MD, DSci and Assoc. Prof. Radka, Kaneva, PhD

Organization unit: MU - Sofia, MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical chemistry and Biochemistry, Molecular Medicine Center

RESULTS: In the current study, two miRNAs were investigated in tumor and normal tissues in 65 patients, as well as in plasma from 20 patients with larynx cancer. Total RNA, incl miRNA were isolated by RNeasy Mini Kit, Qiagen, and miRNeasy Serum/Plasma Kit, Qiagen. For reverse transcription were used 500ng of total RNA from tissue and 250 ng from plasma by miScript II RT Kit (Qiagen). For relative quantification of studied miRNAs was used SYBR Green Supermix (Qiagen). SPSS software program v17. was used for statistical analysis. The miR-145 and miR-222 levels were significantly altered both in tumor tissue and in plasma. miR-145 showed decreased expression levels, and miR-222 slightly elevated levels of expression in laryngeal tumor tissue whereas plasma levels were significantly reduced in expression. In addition, the two micro RNAs were investigated as markers for distinguishing larynx cancer patients from healthy controls. Both micro RNAs distinguish patients from healthy controls but with moderately high sensitivity and specificity. To confirm or reject the results obtained, it is necessary to study the selected samplers with a larger sample. In addition, we found a statistically significant association between miR-222 and the age of patients (under and over 60 years), as well as miR-145 and tumor and nodal stages. Changed expression levels in our sample and association with clinical-pathological features suggest that these miRNAs are also of key importance for carcinogenesis of the larynx.

Scientific publications and presentations:

- Giragosyan S, Petkova V, Popov T, et al. miR-145-5p, miR-196a-5p, miR-222-3p and lncRNA MALAT1 as non-invasive markers in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. 25th Biennial Congress of the Eur Association for Cancer Research. 30 Jun–3 Jul 2018, Amsterdam, Netherlands

Contract D-138/02.05.2017 Analysis of miRNA expression in non-small cell lung

PhD student: Veronika Jordanova Petkova

PhD supervisor: Prof. Vanio Ivanov Mitev, MD, PhD, Assoc. prof. Radka Petkova Kaneva, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine Dept. of medical Chemistry and Biochemistry- Molecular Medicine Center

RESULTS: MicroRNAs (MiRNAs) can help in understanding the carcinogenesis of lung cancer and serve as potential diagnostic biomarkers for differentiating adenocarcinoma (ADC) and squamous cell lung carcinoma (SCC). The aim of the present study is to analyze and compare the expression patterns of miR-21, miR-197, miR-205, miR-375, miR-495 in ADC and SCC samples. Fresh frozen tissue samples from 50 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (25ADC, 25SCC) and adjacent normal tissues were examined. The expression of miR-21, miR-197, miR-205, miR-375, miR-495 were evaluated by RT-qPCR. The statistical analysis was performed by SPSSv20. We found overexpression of: miR-21 in 60% (12ADC&18SCC), miR-205 in 62% (13ADC&18SCC), miR-197 in 14% (5ADC&2SCC), miR-375 in 30% (11ADC&4SCC) and miR-495 in 40% (13ADC&7SCC) of the samples. The following miRNAs demonstrated decreased expression: miR-21 in 10% (5ADC&5SCC), miR-205 in 10% (7ADC&3SCC), miR-197 in 42% (11ADC&10SCC), miR-375 in 42% (6ADC&15SCC) and miR-495 in 30% (9ADC&6SCC) of the tumors. ROC analysis was performed for distinguishing ADC from SCC. Only miR-205 (AUC=0,672, p=0,036) and miR-375 (AUC=0,692, p=0,019) showed statistically significant results independently. The combination of these two miRNAs (AUC=0,771; p=0,001) could distinguish between ADC and SCC with 80% sensitivity and 76% specificity. With the same sensitivity and specificity the combination of miR-205&miR-375&miR-495 (AUC=0,776; p=0,001) and the combination of miR-205&miR-197&miR-375 (AUC=0,774; p=0,001) could also discriminate between ADC and SCC. It has been suggested that miR-205 appeared to be a promising diagnostic biomarker for SCC. Our results show that different panels of miRNAs including miR-205, have better potential to discriminate between ADC and SCC. However further analysis of the enlarged sample is necessary to ascertain their diagnostic potential in NSCLC.

Contract D-139/02.05.2017 Epidemiological typing of *Streptococcus pyogenes*, isolated from patients with different infections

PhD student: Adile Akifova Muhtarova

PhD supervisor: Assoc. prof. Raina Gergova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical microbiology, Sofia 1431, Zdrave 2

RESULTS: The results of the study showed that the most common *emm*-genotypes among *S. pyogenes* strains are *emm1*, *emmm3*, *emm12*, and *emm4*. Two unique *emm* subtypes were detected: *emm3.132* and *emm3.133*. Our results demonstrated that 85.71% of established *emm* genes are covered by the 26-valent M-protein-based vaccine. For precision and confirmation of the nucleotide sequencing results, different *emm* genotypes were analyzed by multi-locus sequencing (MLST) of seven constantly present in the *S. pyogenes* genes. We received a full

match of the results obtained with both methods. We found that 10% of tonsillopharyngitis in Bulgarian patients was caused by lesser streptococcal groups (Group C - GCS, Group G - GGS). After evidence of the *emm* gene in the four GGS isolates, it was subjected to nucleotide sequencing and 3 *emm* sequence types, namely *stG10.0*, *stG480.0* and *stG6792.0*, were established at the first time for Bulgaria. We have shown that GCS/GGS also have genes encoding various virulence factors similar to *S. pyogenes*. The most commonly discovered gene in GCS and GGS was *slo* (in over 40% in group C and in over 85% in group G). 62.5% of GGS was carrying the *speG* gene, with less frequencies in GGS found *SpeF* (25%), *smeZ* (25%), *ssa* (12.5%). This is the first Bulgarian study to make epidemiological typing of clinical *S. pyogenes* strains, simultaneously with two molecular-genetic methods. We found two new *emm*-subtypes *emm3.132* and *emm3.133* for the world. Bulgarian GAS isolates are most often *emm1*, *emm3*, *emm4*, *emm28*. Nucleotide sequencing of Group G streptococci was performed at the first time in Bulgaria. It has been shown that nearly half of GCS/GGS, also have genes for virulence factors similar to *S. pyogenes*. The data found are also useful for the possible future introduction of *S. pyogenes* vaccines, as well as to explore the epidemiology and virulence of GCS/GGS.

Contract D-143/02.05.2017 Association between HPV infection, mitochondrial status, DNA fragmentation, and idiopathic male infertility

PhD student: Viktor Dimitrov Slavov

PhD supervisor: Acad. Vanio Mitev, MD, PhD, DSci, Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

RESULTS: The aim of this research was to establish if there is a direct link between abnormal mitochondrial function, caused by high-risk papilloma viruses (HPV16; HPV18) and increased DNA fragmentation on spermatozooids from patients with idiopathic (unclear) infertility. Semen samples from 50 male subjects with repetitive reproductive failure were collected for the purpose of this scientific project. Samples of the semen were used for extraction of total DNA and subsequent PCR analysis to detect the presence of HPV 16 and HPV 18. All clinical samples were subject of molecular DNA analysis with the purpose to detect the presence of HPV 16 and HPV 18. From the 50 patients' samples, none contained the presence of the papilloma viruses mentioned above. Based on the initial results and in order to continue the study, the idea to search for the presence of the other 31 types of human papilloma viruses in the isolated clinical specimen appeared. Thus, it was possible to establish a connection between HPV infection and males' idiopathic infertility in the Bulgarian population. Reagents, enabling simultaneous detection of 14 high-risk (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66/68), 4 medium risk (types 53, 73, 81, 82) and 15 low-risk (types 6, 11, 40/61, 42, 43/44, 54/55, 70, 57/71, 72, 84/26) human papilloma virus types (GenoFlow HPV Array test Kit) were used for that purpose. All 50 total DNA isolated from patients' samples were screened by PCR and Flow-Through hybridization for 33 types HPV. The presence of the following types HPV was found: HPV6 - 1 patient (2%); HPV31 - 2 patients (4%); HPV52 and HPV58 - 1 patient (2%). Extremely low presence of HPV types (8%) in the samples tested and the small number of patients studied (50) were not enough for making definite conclusions about the connection between HPV infection

and male's infertility in Bulgarian population. Two prophylactic vaccines, covering 2 of the most oncogenic types of papilloma viruses – HPV16 and HPV 18, are available on the Bulgarian market for years. The campaigns of the manufacturers are mainly aimed at the application of vaccines to girls and women of reproductive age. Both products are also effective in the prevention of HPV16 and HPV18 infections and also for the young men and boys up 26 years old. These two types were not found in the samples of men with reproductive failures. However, patients with HPV6, HPV31, HPV52, and HPV58 viral type were found. At the beginning of this year, the US Food and Drug Administration (FDA) licensed the new Gardasil 9 vaccine to prevent infection with 9 types of papilloma viruses - HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV52, and HPV58. Four of them were found in this study. The vaccine is applicable to both women and men and is already entering the Bulgarian market. The results of this project could serve as a basis for a broader and deeper study of the Bulgarian population on this issue. In the event of a successful establishment of the connection between these viral types and decreased male fertility, the group of young women planning pregnancy could be addressed at recommendations and directions. This would eliminate the human papilloma virus as a factor for reproductive failures.

Contract D-145/02.05.2017 Association of sexually transmitted infections, HPV infection and abnormal cervical cytology

PhD student: Kremena Stoycheva Mesechkova

PhD supervisors: Prof. Vanyo Mitev, MD, DSc, Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Molecular chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431Sofia

RESULTS: High-risk HPV infection is necessary but not sufficient cause of cervical cancer. Sexually transmitted genital pathogens such as mycoplasma, ureaplasma, and chlamydia have been identified as possible cofactors of persistent high-risk HPV infection in cervical carcinogenesis. The aim of this study was to investigate specifically for Bulgarian population, the prevalence of several common sexually transmitted bacterial infections in patients with abnormal cytology and/or HPV infection. Using PCR technique we demonstrated progressively increasing frequencies of HPV infection related to the grade of cytological cervical lesion – 4% of normal cervical cytology, 17% of ASC-US, 46% of LSIL and 86% of HSIL, indicating a strong association of high-risk HPV infection and the grade of cervical lesions. The strong association of *Chlamydia trachomatis* and the grade of the cytological cervical lesion was also found as was the case with *Mycoplasma hominis*, especially in the highest grade HSIL of all precancerous lesions studied. We could not find an association of *Ureaplasma spp* and abnormal cytology, nevertheless *Ureaplasma parvum* prevalence is strongly related to the grade of cervical lesions – 8% in ASC-US, 32% in LSIL and 71% in HSIL. Interestingly, multiple infections with more than one bacterial pathogen showed a strong association (83%) with HPV infection. The current study evidenced the association of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* infection and multiple bacterial infections both with abnormal cervical cytology and HPV infection in Bulgarian population group studied. It would, thus, be suggested for all patients who present with an abnormal cervical pathology to undergo a cervicovaginal microbiological

examination to detect potentially pathogenic microbes for correct diagnosis and treatment, as well as a more complete follow-up of cervical cytological lesions.

Contract D-146/02.05.2017 Investigation of ketoprofen, analgin and meloxicam for antiviral activity

PhD student: Lyubomir Trifonov Marinov

PhD supervisor: Assoc. Prof. Irina Nikolova, MD, PhD, Prof. Nikolai Damqnov Danchev MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology

RESULTS: Ketoprofen, metamizole, and meloxicam were studied for potential antiviral effects. The inhibitory concentration 50 (IC₅₀) in µg / ml of the test drug substances was determined by the influence of different concentrations on the survival of cell lines L929, SH-SY5Y and EA.hy926 by MTT assay. On non-virus-infected SH-SY5Y cell lines, only meloxicam showed time depended on IC₅₀ reduction from 1129 µg / ml at 24 h to 798.4 µg / ml at 48 h and 492.9 µg / ml at 72 h. There is no statistically significant change in IC₅₀ for ketoprofen and metamizole. In cell line EA.hy926, not infected with a virus, a time-dependent reduction in IC₅₀ was observed in all three test substances. The influence of ketoprofen, metamizole, and meloxicam on the replication of human herpesvirus type 1 strain F using a modified Reed-Muench MTT test on L929 cell line was also determined. The three IC₅₀ values are extremely high and cannot be determined with these concentrations, indicating that all three substances are not toxic to this cell line and no antiviral activity of the three test substances is observed.

Contract D-147/02.05.2017 Evaluation of the effects of newly synthesized caffeine-8-thioglycolic acid derivatives on neuroblastoma cell line SH-SY5Y and activity of human recombinant enzyme MAOB

PhD student: Alexandra Victorova Kasabova-Angelova

PhD supervisor: Assoc. prof. Virginia Tzankova, PhD; Assoc. prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

RESULTS: In this study, we evaluate the effects of new derivatives of caffeine-8-thioglycolic acid (100µM) on human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and human recombinant MAOB enzyme (hMAOB) (1 µM). On SH-SY5Y, most of the derivatives, administered alone, didn't show statistically significant neurotoxic effects, compared to the control (non-treated cells). Only JTA-20x, JTA-11, JTA-12 and JTA-13 decreased cell viability. In combination with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (100µM), only JTA-1 and JTA-2 revealed statistically significant neuroprotective effects, stronger than those of caffeine and caffeine-8-thioglycoloc acid. Statistically significant inhibitor activity on hMAOB, was revealed again by JTA-1 and JTA-2. They inhibit the enzyme respectively with 23 % and 25 %, close to the activity of Selegiline,

which inhibits hMAOB activity with 42 %. The possible mechanisms of neuroprotection for JTA-1 and JTA-2 might be due to the inhibition of hMAOB, which catalyse the production of neurotoxic p-quinone from 6-OHDA.

MEDICO-CLINICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2016”

Contract 3–D/2016 Correlation between central aortic pressure and left atrial changes in patients with arterial hypertension

PhD student: Neli Georgieva Nikolova

PhD supervisor: Elena Todorova Kinova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Clinical Center of Emergency, Clinic of Cardiology

RESULTS: Arterial stiffness and left atrial volume index (LAVI) are predictors of cardiovascular complications in patients with arterial hypertension (AH). There is a lack of convincing data on the relationship between left atrial (LA) remodeling and vascular changes in this risk group. The aim was to investigate the relationship between non-invasive measurement of central aortic pressure and LA and left ventricular (LV) structure and function parameters in patients with uncomplicated arterial hypertension. Our study included 70 patients with mean age (54.85 ± 13.17 years) and BMI: 28.3 ± 3.1 kg / m² were studied in 2 groups: 50 with AH - mild to moderate up to five years; 20 healthy controls adapted to age and body weight. We had been used a non-invasive brachial oscillometric method by Mobil-O-Graph PWA, to determine the parameters of vascular stiffness – 24 hour central aortic pressure (24hCAP), 24 hour pulse wave velocity (24hPWV) and augmentation index (24hAix). The patients underwent standard two-dimensional echocardiography, and LA mechanics were evaluated by Speckle tracking echocardiography. The results has shown there is significant differences in measures in parameters of vascular stiffness in patients with hypertensive and healthy controls: 24 hours central systolic pressure (cSys24h): (117.42 ± 10.27 vs 106.80 ± 5.80 mmHg, $p < 0.004$), 24hAix (25.54 ± 6.41 vs $19.13 \pm 6.63\%$, $p < 0.001$), 24hPWV (8.73 ± 1.48 vs 6.22 ± 0.88 m / s, $p < 0.0001$). We revealed significant differences in echocardiographic parameters to LA and LV structure and function between the groups: LAVI ($32,72 \pm 10,14$ vs $22,06,40 \pm 3,65$ ml/m², $p < 0,001$) and global strain of LA - GLS – LA ($29,09 \pm 4,09$ vs $41,29 \pm 5,12\%$, $p < 0,0001$) and high A – wave velocity of transmitral blood flow ($84,24 \pm 17,18$ vs $68,00 \pm 14,81$ cm/s, $p < 0,011$). LAVI correlates positively with cSys24h ($r = 0.445$, $p < 0.004$), Aix24h ($r = 0.447$, $p < 0.003$), PWV24h ($r = 0.526$, $p < 0.000$). GLS-LA correlates negatively with PWV24h ($r = - 0.415$, $p < 0.007$). The other structural and functional indicators of LV did not reveal significant differences and correlations. LA remodeling is determined by the high values of 24 hours non – invasive measurements of central systolic pressure, augmentation index and pulse wave velocity. The cardiovascular parameters of arterial stiffness - cSys24h, Aix24h correlate positively with the left atrial strain. Using the method in clinical practice can improve risk stratification and management of a therapeutic strategy.

Contract Nr 4-D/2016 Circulating CD4 (+) CD28 (-) T lymphocytes in patients with autoimmune thyroiditis and their link to clinical and laboratory features of the disease

PhD student: Ralitsa Valentinova Mekova

PhD supervisor: Prof. Mihail Boyanov, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The aim of this study was to determine whether CD4(+)CD28(-) T lymphocytes are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroiditis(ATD). 71 patients with autoimmune thyroiditis (25 with newly diagnosed euthyroid, 21 with newly diagnosed hypothyroid and 25 with ATD on levothyroxine treatment), with no concomitant diseases and 21 healthy controls participated. Physical examination, including eye status was performed and information about smoking habits and family history for thyroid disease was gathered. Thyroid ultrasound was performed, thyroid volume was calculated and presence of nodules was noted. Circulating CD4(+)CD28(-) T lymphocytes were examined by flowcytometry. Serum levels of TNF-alpha, granzyme B and pephorin were determined by ELISA and thyroid hormones and antibody levels by third-generation ECLIA assay. Circulating CD3(+)CD4(+)CD28 (-) T lymphocytes did not differ in patients with autoimmune thyroiditis and healthy controls, respectively 1.82 (0.0-21.3)% and 1.4 (0.4-7.9)% /p=0.30/. No differences between baseline patients' groups (p = 0.87) or according to actual thyroid status was found. The median proportion of CD3(+)CD4(+)CD28 (-) T lymphocytes in euthyroid patients was 2.1 (0.0-21.3)%, in subclinical hypothyroid- 1.5 (0.2-6.9)% and in hypothyroid- 1.3 (0.04-18.7) %, (p = 0.21). There was a correlation with the patients age (p = 0.019). CD3 + CD4 (+) CD28 (-) T lymphocytes were significantly higher in females (p = 0.019). They were also inversely connected to the antiTG levels (p = 0.032). The number of elevated antibodies also showed inverse correlation with CD3(+)CD4(+)CD28(-) T lymphocytes (p = 0.01). Serum cytokine levels did not differ among healthy controls and patients as well as in patients with different thyroid function. They did not correlate with the clinical features of the disease with the exception of reversal connection of TNF α and antiTG levels (p0.012). In conclusion, no evidence of involvement of CD3(+)CD4(+)CD28(-) T lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune thyroiditis was found.

Contract 6-D/2016 Mutatons in the gene coding hTPO in selected bulgarien patients with primary congenital hypothyroidism

PhD student: Boris Georgiev Stoilov, MD

PhD supervisor: Prof. Iva Stoeva, MD, PhD, MPH

Organization unit: MU-Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Pediatrics, Ivan Geshov bul., Sofia 1606

RESULTS: For molecular genetic analysis by sequencing, 39 candidates were selected - 19 males and 20 females. Five of them did not have a neonatal screening; one of the children had Filter paper card but was not sent on time; another was born in Greece and no neonatal screening was conducted; the third had not been screened at all. In the study are also included one mother

of a patient. The most frequent mutations in the selected group were identified - they differ significantly from the pre-study - no mutations in exon 8 (where the enzyme's catalytic center) were found, but mostly in exons 4, 7 and 14. MPLA analysis revealed two patients - brothers with a deletion in the TPO gene. Sequencing found mutations in homozygous and heterozygous state in 10 patients. The result is indicative of the fact that not only MLPA analysis, is not enough. Next Generation Sequencing is appropriate. In 12 of the candidates, mutations in the investigated gene were found Two uncharted but known mutations were found. There is a need for more frequent control of TSH and fT4 by serum levels in patients with a potent block in hormone synthesis. The goal of the therapy is to maintain TSH close to the lower limit of normal to prevent gland hypertrophy and eventual malignancy. A combination of Screening Diagnostic Test with MGA methods is required. Develop a diagnostic algorithm for the mutagenic screening of the gene coding for hTPO as part of the mutation screening for the forms of disharmonogenesis in CH.

Contract 7-D/2016 Methods of preoperative assessment of ocular surface changes and their significance for the postoperative result

PhD student: Rozaliya Hristova Dimitrova

PhD supervisor: Assoc. Prof. Ivan Tanev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Ophthalmology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The aim of the current project is to determine a diagnostic algorithm for ocular surface disease based on non-invasive methods, including anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT), ocular inflammation point-of-care immunoassay, immunocytochemical and classic histologic analysis of impression cytology samples. Forty patients were included in the study – 20 healthy controls and 20 patients with chronic corneal ulcers. Inclusion in the study was determined by Assoc. Prof. Ivan Tanev and Rozaliya Hristova, Clinic of Eye Disease, University Hospital “Alexandrovska”. Routine ophthalmic investigation was conducted – visual acuity, biomicroscopy, ophthalmoscopy, tonometry. The extent of the defect in depth in patients with ocular surface disease was determined by AS-OCT. After informed consent was obtained impression cytology samples were taken from all participants and submitted to classic histologic processing. Impression cytology samples of healthy controls demonstrated normal epithelial cells with round, distinguished nuclei and normal distribution of PAS+ cells in the conjunctival portion of the sample. Changes in the shape of the cells and their nuclei were observed in patients with trophic ocular surface disease. There were inflammatory cellular infiltrates. PAS+ cells were found on the corneal surface proving conjunctivalization, which is typical of limbal stem cell deficiency. Keratinization of the ocular surface and complete lack of PAS+ mucin cells were observed in some of the samples, which correlates with severe dry eye disease. There were no complications after the procedure. Limbal stem cell deficiency was proven to be a mechanism of trophic ocular surface disease. The significance of ocular surface inflammation for the postoperative results was assessed. An innovative point-of-care immunoassay based on metalloproteinase 9 (MMP-9) levels was used in patients with chronic corneal ulcers. Surgical reconstruction of the ocular surface in patients positive for MMP-9 was shown to be less successful and a second surgical intervention was required. These results will enable an

individualized treatment of ocular surface disease. Preoperative measures to minimize inflammatory activity and provide adequate tear film substitution will promote a successful surgical ocular surface restoration.

Scientific publications and presentations:

- Hristova R, Zdravkov Y, Tanev I. Transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells. Bulgarian Review of Ophthalmology. 2017; 2:32-40.
- Hristova R, Zdravkov Y, Hristova M, et al. Assessment of ocular surface inflammation in patients with chronic corneal ulcers. EuCornea. Lisbon. 6-7 Oct 2017
- Hristova R. Cultured limbal stem cells as treatment for neurotrophic ulcers. ESCRS Winter Meeting, Maastricht. 10-12 Feb 2017. p. 10
- Hristova R, Tanev I. Impression cytology of the ocular surface in trophic corneal disease. Innovation in Ophthalmology. Pravets. 2-4 Dec 2016. p.11

Contract 9-D/2016 Investigation of inflammatory markers in serum in patients with stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease

PhD student: Aleksandar Iliev Lilov

PhD supervisor: Prof. Yanina Slavova - Marinova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, University Hospital for pulmonary diseases, Acad. Iv. Geshov str. 19, Sofia 1431

RESULTS: The aim was to study the role of IL6 in stable COPD patients and its correlations with COPD severity, lung function, exacerbation rate, comorbidities. In 132 stable COPD patients out of exacerbation inflammatory markers (IL6, CRP and leucocytes count), lung function (FEV1, FVC, VC, FEV1/FVC, mMRC, CAT and 6-minutes walking test - 6MWT), exacerbation rate, symptoms (dyspnoea, cough, sputum production) and comorbidities were assessed. There were no differences among mean levels of IL6 in patients from different GOLD categories. The mean IL6 levels were lower in patients with heart failure (0.54 vs. 1.38, $p < 0.001$) and with diabetes mellitus (DM) (0.24 vs. 1.40, $p < 0.001$). No differences with sex, age, BODE index, exacerbation rate, GOLD FEV1, obesity, underweight, arterial hypertension, chronic respiratory failure were found. Data statistical analysis revealed negative correlation between: IL6 vs. 6MWT in GOLD A ($r = -0.886$; $p = 0.019$); and IL6 vs. CAT in GOLD D ($r = -0.380$; $p = 0.027$); positive correlation between IL6 vs. CRP in GOLD B ($r = 0.889$; $p < 0.001$); and IL6 vs. CRP in GOLD D ($r = 0.630$; $p < 0.001$). IL6 plays a major role in the inflammation process in stable COPD patients and is associated with worsening in lung function and other inflammatory markers. Its serum levels are influenced by comorbidities like heart diseases and DM, but regardless of exacerbation rate, BMI, arterial hypertension, chronic respiratory failure.

Contract 10-D/2016 The use of PEEP during prolonged gynecological operations

PhD student: Velislava Metodieva Koritarova

PhD supervisor: Prof. Sylvi Georgiev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine, Dept. of Anesthesiology and Intensive care, G. Sofiyski str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The data collected during the study was processed with SPSS 16.0. The overall incidence of all post-operative complications was reported as 27.1% in both groups. A zero hypothesis has been formed according to which there is no statistically significant relationship between the use of PEEP during prolonged gynecological operations and the incidence of post-operative complications. This hypothesis was verified by the method of crosstab creation where the frequencies of a given complication were analyzed in each of the two groups. The received frequencies were presented as percentages. A significance level of $\alpha \leq 0.05$ was determined and the statistical nonparametric test χ^2 square was applied. The null hypothesis was rejected and a statistically significant correlation between the use of PEEP in prolonged gynecological operations and the lower incidence of all post-operative complications - post-operative respiratory failure, atelectasis, pneumonia, and non-invasive ventilation was demonstrated. Until a statistically significant relationship between the use of PEEP and the incidence of postoperative pneumonia, bronchospasm, pleural effusion and extra-lung complications was established. No case of pneumothorax, pulmonary edema, pulmonary thromboembolism was observed in this study. This study also investigates the effects of PEEP on the hemodynamic stability of patients by looking for a statistically significant correlation between PEEP and the patient's blood pressure during surgery, as well as the amount of infusions and the vasopressors used. There is a zero hypothesis that the use of PEEP does not have an effect on blood pressure, the amount of infusions and vasopressors, and the peak inspiratory pressure and saturation and bleeding during surgery. Again, the crosstab method is applied and the results obtained are checked for static significance with the χ^2 square test, again the significance level is $\alpha < 0.05$. The zero hypotheses is assumed - the use of PEEP has no statistically significant effect on systolic blood pressure, infusion rate and vasopressor counts, and peak inspiratory pressure and saturation and bleeding during surgery. A spreadsheet is attached. 2 Results obtained and discussion -in which the mean value of infusions of crystalloid and colloid infusions was calculated, the vasopressors used - only ephedrine, intraoperative bleeding, and ASA, Ariscat score were used in this study. These average values are reported separately for each group. There is no significant difference between the two groups. In both groups, the highest number of patients with ASA-, evaluated with Ariscat score that included a median or high risk for the development of post-operative complications, were included. The highest percentage was in this study of patients with ARISCAT score-34-51.4% ASA 3-52.9%, most operations continued for 2.30 minutes - in 25.7% of cases, with most operations ending with 1000 ml. Bleeding - in 18% of cases.

MEDICO-CLINICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2017”

Contract D-132/02.05.2017 Evaluation of prognostic value of somatic mutations in patients with gastric cancer

Student: Angel Nikolaev Arabadzhiev

PhD supervisor: Asoc. prof. Kostadin Georgiev Angelov, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Surgery, University Hospital “Alexandrovska”, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: Gastric cancer is an aggressive disease with an overall 5-year survival rate of ~20% and ranking second after lung cancer in annual cancer mortality. The prognosis of patients with advanced-stage is still very disappointing. Some cases of gastric cancers harbor amplification of certain receptor tyrosine kinases (RTK) like ERBB2, FGFR2, KRAS, and MET, which are associated with gastric cancer progression. Inhibitors for these RTKs are already available and could be effectively used in targeted treatments for gastric cancer patients. In the current study tumor and normal tissue samples were collected from 27 patients with gastric cancer. The amplification/deletion of selected genes having a role in stomach carcinogenesis was analyzed by MLPA method. As a result of the conducted analysis aberrations in the following genes *GATA4*, *GATA6*, *EGFR*, *CDK6*, *KRAS*, *FGFR1*, *CCNE1*, and *ERBB2* were estimated in 37% (in 10) from the studied patients. Deletions were observed in the genes *GATA4* (in 3 patients) and *FGFR1* (also in 3 patients). *GATA4* is a tumor suppressor gene and *FGFR1* is known as tumor suppressor and oncogene. Duplications were found in the oncogenes: *GATA6* (in 4 patients), *EGFR* (in 1 patient), *CDK6* (in 3 patients), *KRAS* (in 1 patient), *CCNE1* (in 1 patient) и *ERBB2* (in 2 patients). In five (18.52%) patients from all analyzed patients, we have observed aberrations in several genes simultaneously. Progression of the disease is expected in the patients with gene aberrations. These patients, as well as the others included in the study, are going to be follow up.

Contract D-136/02.05. 2017 Diagnostic evaluation of bile acid malabsorption by serum and fecal biomarkers in patients with microscopic colitis

PhD student: Ivan Aleksandrov Lyutakov

PhD supervisor: Assc. Prof. Plamen Penchev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Gastroenterology at University Hospital “Tsaritsa Yoanna – ISUL”, Sofia. 8 Byalo more Str., 1527 Sofia

RESULTS: Excessive amounts of bile acids (BA) entering the colon due to bile acid malabsorption (BAM) cause chronic bile acid diarrhea (BAD). Fibroblast growth factor 19 (FGF19) is the ileal hormone providing feedback inhibition of BAs synthesis in the liver. Little is known about the mechanisms of BA dysregulation in patients with inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS-D) and microscopic colitis (MC). To evaluate the diagnostic accuracy of serum levels of FGF19, total free fecal bile acids (TFFBA) and fecal calprotectin (FC) in patients with chronic diarrhea. In a prospective study we enrolled 40 adult patients with chronic diarrhea who underwent standard laboratory tests, colonoscopy, serum FGF19, FC, TFFBA. Patients were divided into 5 groups: 14 patients with active IBD, 5 patients with IBD in remission, 5 patients with IBD after surgery, 11 patients with IBS-D and 5 patients with MC. Fasting serum FGF19, TFFBA were measured by ELISA test and FC by a quantitative immunochromatographic method. Diagnosis of BAM was confirmed in 24 of 40 pts (60%) and excluded in 16 of 40 pts (40%). For IBS-D, serum FGF19 produced a ROC curve with AUC of 0,777 (p-value of 0,007 and 95% CI [0,628 – 0,927]). Sensitivity and specificity of FGF19 were 72,7% and 72,4% respectively for a cut-off value of 88,22 pg/ml, which will lead to accurate prediction of BAM in 72% IBS-D patients. TFFBA shows no significant difference between all the groups. BAM is very under-diagnosed and FGF19 could be used for screening for BAM in

patients with chronic diarrhea because there is bile acid binder's treatment. Further bigger studies are needed to establish the efficacy of FGF19 and TFFBA.

Scientific publications and presentations:

- Lyutakov I, P Penchev, R Nakov, et al. Evaluation of serum fibroblast growth factor 19 (FGF19) and total free fecal bile acid in stool as markers of bile acid malabsorption in patients with chronic diarrhea: a pilot study. Symposium 211, XXV Int Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease 2018, Jul 67, Dublin, Ireland.
- Lyutakov I, P Penchev, I Terziev, et al. Do we need so many tests for patients with chronic diarrhea? Case report. 2018 Salzburg Columbia Seminar in Internal Medicine. 26 Aug - 1 Sep 2018, Salzburg, Austria.

Contract D-140/02.05.2017 Investigation of the T-helper subsets Th17 and Tregs' phenotype and cytokine secretion in patients with systemic sclerosis

PhD student: Ekaterina Krasimirova Kurteva

PhD supervisor: Assoc. prof. Dobroslav Kyurkchiev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, University Hospital "St. Ivan Rilski", 15 "Acad. Iv. Evst. Geshov" Blvd., 1431 Sofia

RESULTS: We enrolled a total of 24 SSc patients and 16 healthy controls in the study and divided the patients as having diffuse cutaneous SSc (dcSSc, $n = 13$) or limited cutaneous SSc (lcSSc, $n = 11$). We performed flow cytometric analysis of the percentage of peripheral Th17 cells and Tregs and of the surface expression of PD-1 and PD-L1 on lymphocytes as well, in both patients and healthy controls. We used ELISA to quantitate serum levels of human IL-10, IL-17A, IL-23, and TGF- β 1. We identified an increased percentage of Th17 cells in SSc patients when compared to controls ($P = 0.031$). Moreover, we detected up-regulated Th17 cells within the lcSSc subset against controls ($P = 0.025$), nevertheless no difference was found between lcSSc and dcSSc patients. Flow cytometric analysis revealed an increased percentage of CD4+CD25-Foxp3+ in dcSSc patients in comparison with the controls ($P = 0.032$). Regarding the peripheral cytokine profile, we found raised levels of TGF- β 1 ($P = 0.02$), IL-10 ($P = 0.008$), and IL-17A ($P < 0.001$) in patients when compared to healthy controls. Furthermore, we identified increased circulating IL-10, TGF- β and IL-17A in the lcSSc subset versus controls, as it follows: IL-10 ($P = 0.003$), TGF- β 1 ($P = 0.031$), and IL-17A ($P < 0.001$). Moreover, circulating IL-17A was higher in lcSSc as opposed to dcSSc subset ($P = 0.008$). Regarding the stages of the disease, TGF- β 1 serum levels were increased in early-stage against the late stage, independently from the SSc phenotype ($P = 0.017$). Our results illustrate the pathogenetic contribution of Th17 and Treg cell subsets along with the peripheral cytokine milieu in patients with systemic sclerosis. Further, the results could provide novel therapeutic strategies for patients with lcSSc.

Scientific publications and presentations:

- Krasimirova E, Velikova Ts, Ivanova-Todorova E, et al. Up-regulated peripheral CD4+CD25-FoxP3+ cells along with pronounced Th17 circulating profile in patients with SSc. National Conference of Rheumatology. Aheloy. 11-14 May 2017.

- Krasimirova E, Kalinova D, Velikova T, et al. Diminished peripheral T-cell activation along with marked Th17 circulating profile in Ssc. EULAR 2017, Madrid, Spain, 14–17 Jun 2017.

Contract D-141/02.05. 2017 Comparison of the diagnostic value of IGRA - test (T-SPOT.TB) in venous blood and bronchoalveolar lavage

PhD student: Nataliya Nikolaeva Gabrovska, MD

PhD supervisor: Prof. Dimitar Kostadinov, MD, PhD, Doc. Svetlana Velizarova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of pediatry, Multiprofile Hospital for Active Treatment of Lung Diseases „St. Sofia“, 17 Acad. Iv. Geshov blvd., 1431 Sofia,

RESULTS: Typically, IGRA (IFN-gamma release assays) quantiferon test and T-SPOT.TB was administered using the patient's venous blood. Other body fluids such as bronchoalveolar lavage (BAL), pleural effusions, or liquor are also successfully tested (less routinely in clinical practice) with the T-SPOT.TB test for the rapid local identification of tuberculosis infection and disease. The aim of the study is to compare the diagnostic value of a modern immunological method for the diagnosis of tuberculosis (T-SPOT.TB) applied to two types of biological fluids - venous blood and bronchoalveolar lavage fluid. Methods: a prospective study of the diagnostic value of the T-SPOT.TB test applied to venous blood and BAL (taken with routine bronchoscopy) in children suspected of tuberculosis - 30 children were examined for the period 2017-2018 in the National Reference Center for the treatment of childhood tuberculosis - Multiprofile Hospital for Active Treatment of Lung Diseases "St. Sofia". Results: Ten of the children (33.3%) have a negative blood T-SPOT.TB test, 18 (60%) have a positive blood immunoassay, 1 child (3.3%) has a border score and 1, (3.3%) has an unreadable result. Regarding lavage T-SPOT.TB - 17 children (56.7%) have a negative result, 9 (30%) have positive results, 4 children (13.3%) have the unrecognizable result. These results have their scientific explanation related to the pathogenesis of tuberculosis disease in children, significantly different from that of adult patients. The prevalence of tuberculous bacteria in children is predominantly lymphohaematogenic, tuberculosis disease in childhood tends to generalize the process. Therefore, the results obtained differ from those obtained from the study of adult patients in whom the local immunodiagnosis has a very high diagnostic value. Further research into the immunological features of the children organism as well as the specificity of the course of tuberculosis disease among children.

Scientific publications and presentations:

- Gabrovska N. Comparison of the diagnostic value of T-SPOT.TB in venous blood and bronchoalveolar lavage in children with different forms of tuberculosis“, Bulg Med J, 2017;3
- Velizarova S, Spasova A, Gabrovska N. IGRA - tests - a modern immunological diagnosis of tuberculous disease in children, GP news, 2017;2.
- Gabrovska N, Velizarova S, Kostadinov D, et al. Comparison of the diagnostic value of immunological test, applied to two types of biological fluids - venous blood and bronchoalveolar lavage in children with tuberculosis, Congress - ERS Paris Sep 2018

Contract D-142/02.05.2017 Laboratory, genetic, ultrasound criteria for evaluating the degree of liver steatosis and fibrosis in pediatric patients with chronic liver diseases

PhD student: Denitza Roumenova Kofinova

PhD supervisor: Assos. Prof. Daniela Avdjieva-Tzavella

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Paediatric Gastroenterology, University Children's Hospital "Prof. Ivan Mitev", 11 Blvd "Akad. Ivan Geshov", Sofia 1612

RESULTS: In the clinical project were enrolled 71 children, 41 with chronic hepatitis, 20 with Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 10 healthy children, 38 boys and 33 girls, median age 9,62 ±4,93. All of them underwent ultrasound exam with Shear-wave elastography. All participants provided blood samples for liver enzymes and FibroTestActiTest. Fifty children who underwent liver biopsy were analyzed and compared with the results of Shear-wave elastography and FibroTestActiTest. Shear-wave elastography correlates stronger with the histology in comparison to FibroTestActiTest ($r=0.768$, $p<0.001$ and $r=0.617$, $p<0.001$). Both Shear-wave elastography and FibroTestActiTest can differentiate significant fibrosis $F\geq 2$ from lack of fibrosis ($p=0.001$ and $p=0.008$). However, they can not distinguish mild fibrosis F1 from lack of fibrosis F0 ($p=0.4$ and $p=0.7$). The median values of Shear-wave elastography in patients with NAFLD were statistically higher compared to the values of Shear-wave elastography in healthy children. Patients with NAFLD and healthy controls were tested for genetic polymorphic variants, associated with advanced liver fibrosis - PNPLA3 (p.I148 M), GCKR (p.P446L), TM6SF2 (p.E167K). TM6SF2 polymorphism was present in only 2 of the children. The most common genetic polymorphism was GCKR, 12 children were homozygous and 12 heterozygous. PNPLA3 was established in 10 of the children with NAFLD and in 5 healthy controls. Two children had significant liver fibrosis $F\geq 2$. They carried PNPLA3, GCKR variant. The major risk factor for developing NAFLD in patients, who have one of the pathological variants, PNPLA3, GCKR, TM6SF2, was overweight/obesity. Although healthy children with normal body mass index carried some of the polymorphisms PNPLA3, GCKR, TM6SF2, they didn't have liver fibrosis. The project proves the connection between obesity, metabolic syndrome and NAFLD. Tested genetic polymorphisms may help in bigger future clinical research as noninvasive predictive factors for developing NAFLD.

Scientific publications and presentations:

- Kofinova D, D Avdjieva-Tzavella, C Zhelev. Evaluation of the degree of liver fibrosis in children with chronic liver diseases. Elastography. *Pediatrics*. 2016; 2:10-15
- Kofinova D, M Baycheva, I Jordanova, et al. Clinical-laboratory characteristics and genetic variants in children with NAFLD, XIV National Paediatric Congress 2018

Contract D-144/02.05.2017 Expression of androgen receptor in association with other prognostic and predictive factors in bulgarian patients with breast cancer

PhD student: Slavyana Slavcheva Usheva

PhD supervisor: Assoc. Prof. Theophil Sedloev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Surgery, University Hospital "UMBAL Tzaritza Joanna – ISUL", Byalo more str 8, Sofia 1527

RESULTS: Breast cancer is a heterogeneous disease and differs greatly among different patients (intratumor heterogeneity) and even within each individual tumor (intratumor heterogeneity). Triple-negative breast cancer (TNBC) is a highly aggressive subgroup that becomes an immense therapeutical challenge because of the lack of clearly defined molecular targets, which deprives the patients of the efficacy of conventional hormone- and chemotherapy. As a representative of the steroid's receptors' subfamily, the androgen receptor (AR) expresses itself in a high percentage of different types of breast cancer (50-90%), including in TNBC. The study included 25 patients with middle age 56 years (37-82) with histologically and immunohistochemically verified through true-cut biopsy TNBC, treated at the Dept. of Surgery, UMBAL "Tzaritza Joanna – ISUL", Medical University of Sofia. Six of the patients (24%) were diagnosed with multifocal/multicentric breast cancer. RNAlater (RNA Stabilization Solution for Tissue) was used for the fixation of the tumor and the control normal tissue and their preservation was done at the established in collaboration with the Molecular Medicine Center biobank at -80°C. Total RNA was extracted with miRNeasy Lipid Mini Kit. The expression analysis was performed through reverse transcriptase with the help of High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and subsequent real-time PCR. Altered androgen expression was measured in 21 (84%) of the tumor samples in comparison with the corresponding normal ones. Increased expression was accounted in 20 % of the cases (n=5) and decreased - in 64 % (n=16). There was no change in the levels of androgen expression between healthy and tumor tissues only in 4 patients (16%), which serves to show the unquestionable influence of AR over the intimate mechanisms of cancerogenesis. The association of AR with clinicopathological features and prognosis is still not sufficiently clarified and therefore it is necessary to keep assessing its significance as a potential target for target therapy.

Scientific publications and presentations:

- Usheva S, Sedloev T, Spiridonova T, et al. Assessing the levels of androgen expression in a group of patients with triple-negative breast cancer. VIII Science Conference: Novelties in Oncology - 15-17.06.2018, Pravets

Contract D-148/02.05.2017 Implementation of pulse oximetry in dentistry for diagnostics of the dental pulp

PhD student: Dimitar Nikolaev Kosturkov, DMD

PhD supervisor: Prof. Tsonko Uzunov, DMD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Conservative Dentistry, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: Pulse oximetry is a method of measuring oxygen saturation. It can be used to diagnose the condition of the dental pulp by creating special probes for the device, which is the aim of this project. The characteristics of the standard probes for pulse oximeter are studied and three probes for application on frontal teeth, premolars and molars are created. The examination of 44 intact frontal teeth of 22 patients before and after isolating the gingiva with silicone, showed that there is no statistically significant difference between the measured saturation levels for the two groups - 83%. The examination of 186 intact frontal teeth, premolars, and molars, showed close saturation values of the pulp - about 83-84%. When 85 teeth with trauma on 30 patients were examined in dynamics with pulse oximetry (PO) and electric pulp test (EPT), it

was found that 54% of the teeth tested responded with an average of 71 μ A (EPT) and 92% (PO) and after 6 months 94% of the teeth responded normally - an average of 8 μ A (EPT) and 84% (PO). Only 5 teeth (6%) did not respond to EPT from the beginning to the end of the follow-up, and in the PO showed that the saturation decreased to an average of about 70%. When examining 54 teeth on 23 patients before and after preparation for complete crowns, there was a statistically significant difference between the two groups. Saturation before preparation was 82% and after that: 93%.

Scientific publications and presentations:

- Kosturkov D, Uzunov T. Application of pulse oximetry in dental medicine for pulp diagnostics – literature review. *Problems of dental medicine*, 2017;43(1):51-9.
- Kosturkov D, Uzunov T, Uzunova P. Influence of the gingival tissues on the measured saturation level of the dental pulp blood flow. *Chemistry: Bulg J Sci Edu* 2018;27(3):454-9
- Kosturkov D, Uzunov T. Application of modified probes of pulse oximeter for diagnosis of the condition of the pulp. *Problems of dental medicine*, 2017;43(2)
- Kosturkov D, Uzunov T. Dynamic follow-up by Pulse Oximetry and Electric Pulp Test of teeth with trauma. 27th Annual Assembly of IMAB, 11-14 May. 2017, Bulgaria
- Kosturkov D, Ivancheva V, Uzunov T et al. Changes in the pulp microcirculation after teeth preparation for complete crowns. 17th scientific congress of BgDA, June 15-17, 2017, Burgas
- Kosturkov D, Uzunov T, Uzunova, P. Influence of gingival tissues on the measured saturation level of the dental pulp blood flow. National forum of Physics “Physics – forever young science”, 27-29 Oct 2017, Varna, Bulgaria.

COMPETITION „STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT”

STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2016

Contract 1-S/2016 Introduction of a biochemical and molecular-genetic approach for diagnostics of biotinidase deficiency in Bulgaria

Research team: Acad. Prof. Vanyo Ivanov. Mitev, PhD, DSc.

- Prof. Aleksey Alekseev, PhD
- Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD, DSci
- Assist. Prof. Bilyana Georgieva, PhD
- Iglia Yordanova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of chemistry and biochemistry, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: Biotinidase deficiency is an autosomal recessively inherited metabolic disorder due to partial or complete deficiency of the enzyme biotinidase. It is characterized with neurological and/or cutaneous symptoms which could be treated with pharmacological doses of biotin. Aim of the study is to develop biochemical enzymatic and molecular-genetic approach for diagnostics of biotinidase deficiency in Bulgaria. The quantification of the biotinidase activity in blood-saturated filter paper disc was based on colorimetric detection of *p*-aminobenzoate released from the artificial substrate biotilyl-*p*-aminobenzoic acid after incubation with the sample. The mutation analysis included sequencing of the four exons, the exon/intron boundaries and the promotor of the *BTD* gene. To determine the reference range for biotinidase activity we tested 157 healthy normal control samples (68 adults, 36 children and 53 neonates). The mean normal biotinidase activity in dry blood spot was 5.34 pmol/min/disc (range 3.95- 6.96 pmol/min/disc; n=100). In neonates, because of liver immaturity, the mean normal biotinidase activity was 3.05 pmol/min/disc (range 2.18-3.96 pmol/min/disc; n=53) or 57% (range 41-74%) of the normal activity in adults, which is in agreement with the literature. Four of the tested control samples had decreased biotinidase activity (3.16-3.36 pmol/min/disc) or about 63% of the normal activity in adults. After sequencing the p.D444H mutation in exon 4 of the *BTD* gene was found in heterozygous state. A high carrier frequency (3.85%) of that mutation was determined for the Bulgarian population as is reported for many populations also. In all tested 28 families suspected with biotinidase deficiency the diagnosis was rejected. We have introduced a reliable enzymatic method for quantification of the biotinidase activity in dry blood spots and a genetic test for sequencing the *BTD* gene. This biochemical and molecular-genetic approach permits proper diagnosis, prophylaxis and adequate treatment of biotinidase deficiency in Bulgaria.

Scientific publications and presentations:

- Georgieva B, Yordanova I, Todorova A, et al. Introduction of a biochemical enzymatic method and molecular-genetic approach for diagnostics of biotinidase deficiency in Bulgaria. *Pediatrics*, vol.3/2017, p.37-40.
- Georgieva B, Yordanova I, Todorova A, et al. Development of a biochemical enzymatic and molecular-genetic approach for diagnostics of biotinidase deficiency in Bulgaria. 16th Int Congress of Medical Sciences (ICMS 2017), Sofia, Bulgaria, May 11-14 2017; p. 37.

Contract 2-S/2016 Identification and monitoring of *EGFR*, *K/N-RAS* and *BRAF* mutations in circulation tumor cell-free DNA during treatment of non-small cell lung cancer and colorectal patients

Research team: Prof. Albena Parvanova Todorova-Georgieva, DSc

- Prof Albena Todorova-Georgieva, DSc
- Assoc. Prof. Yasmina Milanova, MD, PhD
- Dobromira Petkova, DM
- Veneta Petrowa, DM
- Vera Megdanova, DM
- Assist. Prof. Andrey Kirov, PhD
- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, DSc

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

RESULTS: The aim of the scientific project was identification and monitoring of *EGFR*, *K/N-RAS* and *BRAF* mutations in circulating tumor cell-free DNA from patients during treatment of two of the leading causes for cancer mortality - non-small cell lung (NSCLC) and colorectal (CRC) cancer. In our CRC patients group (22 persons included) we detected only mutations in *KRAS* codon 12; the mutation c.35G>A, p.Gly12Asp was the most common one (~32%). Although this is common “hot spot” region for mutations in this gene, it is strange we didn’t find other mutations. This might be due to the lower frequency of the rest of mutations and for this reason we could not detect them in our relatively small patient cohort. All patients with mutations showed progression in the disease course, which is logical due to the mutations biological effect. Our *KRAS* negative patients were also tested negative for *NRAS* gene mutations. The results from our NSCLC cohort (8 patients) showed only the *EGFR* mutation c.2369C>T (p.Thr790Met) in 50% of our patients. It is associated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) drug resistance. Usually, this mutation is developed secondary after primary (activation) mutation in the *EGFR* gene. We utilized kit for detection of 29 most common *EGFR* mutations and we did not detect any other mutations. Obviously this mutation can appear even without a primary mutation, at least in regards to the common ones. Our *EGFR* negative patients were also tested negative for mutations in *BRAF* gene. The application of circulating tumor cfDNA for genetic testing of *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EGFR* genes could provide important information in regards to diagnostics, monitoring and treatment of CRC, NSCLC and other types of cancers. However, adequate interpretation of the molecular genetic results requires standardized techniques and technologies for DNA extraction and quantitative detection of the tested genetic variants.

Scientific publications and presentations:

- Mihaylova Z, Kirov A, Petrova V, et al. KRAS mutation status on cell-free DNA monitoring in colorectal cancer patients with liver metastases, Ist Balkan Conference of Personalized Medicine, Best Western Expo Sofia Hotel, Sofia 26-27.10.2017, p.20

Contract 3-C/2016 Molecular - Genetic Analysis of Virulence, Resistance and Epidemiology of Bulgarian Clinically Significant Isolates *Streptococcus pyogenes*

Research team: Assoc. Prof. Raina Tzvetanova Gergova, PhD,MD

- Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci,
- Assoc. Prof. Romyana Markovska, MD, PhD,
- Adile Mukhtarova, PhD student
- Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD,
- Kalina Mihova

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology

RESULTS: All of the tested 200 DNA from *S. pyogenes* were shown to carry the typical, for the GAS genes *speB*, *sypCEP*, *sdaB*; more than 80%, *mac* and *smeZ*; followed by *speJ*, *speG* and genes for DNA-ses *sdC*, *sdaD*, *Spd3*. The genes *speA*, *speF*, *speL* and *speM* or their combinations were detected more often in invasive isolates ($p < 0,05$) than in noninvasive ones. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin, azithromycin, clarithromycin, clindamycin were determined by E-tests. Almost 23% of GAS isolates obtained in 2013–2014 and near 40% of them in 2015–2016 contained various elements of resistance. The predominant genes were *mef(A)* and *msr(D)*, these encodes an efflux pump (M-phenotype), identified in near 60 % of the macrolide-resistant strains. The next frequently prevalent mechanism was a combination of *mef(A)* and *erm(B)* in 23 %, which determined high-level inducible or constitutive resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins (iMLSB or cMLSB). The highest MIC value (>256 mg/L) was detected in association with *erm(B)* ($p < 0.05$). The MIC range was observed to be much higher in the isolates with combinations of resistance genes vs. those with *mef* genes alone ($p < 0.05$). Large variety of *emm* types in the studied Bulgarian GAS isolates with noninvasive infections from 2015 to 2016. The invasive isolates were only from *emm* 1, 3, 4, 12 and *emm* 28. Only *emm* 3 strong correlates with invasive Bulgarian isolates ($p < 0,05$). The most prevalent types in the both of two groups were *emm* 3 and *emm* 1. Their high frequency in our country is alarming, because they have rheumatogenic ability. This is the first report of a GAS *emm* types circulating in Bulgaria. Development of this epidemiological study may help to understand the pathogenesis of GAS disease and aid in vaccine development.

Scientific publications and presentations:

- Gergova R, A Muhtarova, I Mitov. Arsenal of antibiotic resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. 15th Congress of Microbiology and Infections of BAM, Sofia, Bulgaria, 18-20 May, 2017, pp.15.
- Gergova R, Muhtarova A, R Markovska, et al. Distribution of EMM genotypes in Bulgarian clinical significant isolates *Streptococcus pyogenes*. A pilot study. 10th Balkan Congress of Microbiology Microbiologia Balkanica 2017 Sofia, Bulgaria. Nov 16-18, 2017. pp.33.

Contract 4-S/2016 Serum hepcidin and its correlation to oxidative stress arameters in neurodegenerative diseases

Research team: Assoc. Prof. Savina Petrova Hadjidekova, MD, PhD

- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Assist. Prof. Maria Petrova, MD, PhD
- Corr. Prof. Latchezar Traykov MD, PhD, DSci,
- Prof. Kamen Tzatchev, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Genetics, Dept. of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: During this project different methodological approaches are used for the diagnosis of neurodegenerative diseases and assessment of iron disorders in the patients included. Immunological ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method with formation of specific complex antigen-antibody, detected spectrophotometrically is used for quantification of serum hepcidin in patients with neurodegenerative diseases. By turbidimetric method are measured C-reactive protein for substantiation of inflammation, transferrin and soluble transferrin receptors – for evaluation of iron metabolism disorder, serum ferritin – for evaluation of stored iron in patients with neurodegenerative diseases. Flame atomic-absorption spectrometry (FAAS) and electrotermic atomic absorbtion spectrometry (ETASS) are used for evaluation of non-enzymatic antioxidant balance through Se, Zn, Cu. For evaluation of enzymatic antioxidant balance is used immunological ELISA method through glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) quantification. Obtained results were compared with control group from previous studies. 79 patients are included, diagnosed by specialist – neurologist with neurodegenerative diseases in University “Aleksandrovska”hospital, Dept. of Neurology and with impaired iron homeostasis, evaluated by red blood cells count, MCV, MCH, MCHC, hemoglobin, reticulocytes count, hemoglobin concentration in reticulocytes, C-reactive protein, serum iron and total iron binding capacity, serum transferrin, ferritin and soluble transferrin receptors, outside the reference ranges by gender and age. The results are processed through appropriate statistical methods to determine significance. Included patients’ average age is 57.3 – 67.2 years. Statistically significant increased serum hepcidin concentrations are established in neurodegenerative diseases patients ($75.95 \pm 20.67 \mu\text{g/l}$ – for all four type of diseases) compared to the control group ($15.35 \pm 6.45 \mu\text{g/l}$), $P < 0.001$. Serum SOD ($18.26 \pm 0.88 \mu\text{g/ml}$) and GPX ($7.74 \pm 0.57 \text{ ng/ml}$) levels are statistically decreased compared to healthy individuals ($128.3 \pm 10.9 \mu\text{g/ml}$), and ($40.8 \pm 2.1 \text{ ng/ml}$), resp., which confirms deficiency of enzymatic antioxidant defense in neurodegenerative diseases patients, $P < 0.001$. Selenium concentrations in neurodegenerative diseases patients ($243.79 \pm 11.51 \text{ nmol/l}$) are decreased compared to control group ($978.4 \pm 41.1 \text{ nmol/l}$), which confirmed deficiency of non-enzymatic antioxidant defense, $P < 0.001$. Concentration of zinc ($35.47 \pm 1.43 \mu\text{mol/l}$) and copper ($31.34 \pm 1.14 \mu\text{mol/l}$) are increased in comparison to control group ($17.8 \pm 1.7 \mu\text{mol/l}$), and ($18.4 \pm 2.6 \mu\text{mol/l}$), resp., which confirms their organism deposition in neurodegenerative diseases patients, $P < 0.001$. In patients with neurodegenerative diseases is established significant positive correlation between serum hepcidin and iron in neurodegenerative diseases patients ($r = 0.740$; $P < 0.001$). Relation between serum hepcidin and ferritin ($r = 0.770$; $P < 0.05$) is positive. Quantified serum hepcidin correlates significantly negative to selenium in neurodegenerative diseases patients ($r = -0.780$; $P < 0.001$). Correlation between serum hepcidin and zinc ($r = 0.952$; $P < 0.005$) and hepcidin and copper ($r = 0.836$; $P < 0.005$) shows positive relation in neurodegenerative diseases patients.

Significant positive correlation is established between serum hepcidin and SOD ($r=-0.843$; $P<0.001$) and between hepcidin and GPX ($r=-0.821$; $P<0.001$) levels in neurodegenerative diseases patients. Serum hepcidin concentrations are increased in all four neurodegenerative diseases (AD, ALS, PD and HD). High hepcidin levels leads to iron overload in brain. Iron mediated oxidative stress is determines neurodegenerative diseases. Determination of serum hepcidin is still novel in clinical and laboratory practice. The results of our present study contribute for elucidating the role of hepcidin in neurodegenerative diseases and help diagnose and selection of suitable therapeutic approach to their treatment. The relationship between hepcidin and serum concentrations of GPX, SOD, Se, Zn and Cu, as well as iron status indicators was established. The level of hepcidin may differentiate patients with functional iron deficiency from those with reticulo-endothelial blockade. In these cases, the quantification of serum hepcidin may serve as an indirect assessment of iron accumulation in the body, provide information on the efficacy of primary disease therapy and alarm in case of toxic overload. Hepcidin quantification contributes to a clearer elucidation of the oxidative stress mechanism as a result of impaired iron homeostasis in neurodegenerative diseases. Serum hepcidin represents as a marker for early diagnosis of impaired iron metabolism, a leading microelement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Scientific publications and presentations:

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Med Rev* 2017 53(2):9-15.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. The role of iron homeostasis in Alzheimer's disease. *HSA J Alzheimers Neurodegener Dis* 2017, 3:011.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Parkinson's disease and iron homeostasis, connection through hepcidin. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55, issue s1.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin levels in Alzheimer's disease. *Clin Chem and Lab Med.* 2017;55, issue s1.
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Neurodegenerative diseases – a link to hepcidin quantification. *Clin Chem Lab Med* 2017;55, Special Suppl, pp S1262 – S1263
- Manolov VE. Hepcidin – physiological and clinical significance. Varna. 2017. 158 pp
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Parkinson's disease and iron homeostasis, connection through hepcidin. 22nd IFCC-EFLM Eur Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine & 25th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF). 11-15.06.2017, Athens, Greece
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Serum hepcidin levels in Alzheimer's disease. 22nd IFCC-EFLM Eur Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine & 25th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF). 11-15.06.2017, Athens, Greece
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Iron homeostasis and hepcidin quantification in Alzheimer's disease patients. 4th Int Conference on Neurodegenerative Disorders and Stroke. 05-06.07.2017, Frankfurt, Germany
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Parkinson's diseases and oxidative stress (preliminary study). 3rd Neurological Disorders Summit. 06-08.07.2017, USA
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Evaluation of serum hepcidin and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. 6th Int Conference on Neurology and Neuromuscular Diseases. 24-26.07.2017, Rome, Italy

- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Some clinical conditions with increased serum iron. Xth National Congress for Clinical Laboratory. 07-09.09.2017, Bulgaria
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Hepcidin quantification in neurodegenerative diseases. 8th Int Conference on Dementia and Dementia Care. 18-19.09.2017, Ireland
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Neurodegenerative diseases – a new view through iron homeostasis. 17th Global Neuroscience Conference. 16-17.10.2017, Japan
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Neurodegenerative diseases – a link to hepcidin quantification. 23rd Int Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC World Lab 2017). 22-25.10.2017, Durban, South Africa
- Manolov V, Petrova J, Hadjidekova S, et al. Iron Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinson's Disease. Metabesity 2017. 30-31.10.2017, London, UK
- Manolov V, Petrova J, Hadjidekova S, et al. Hepcidin quantification in patients with amyotrophic lateral sclerosis. World Congress on Biotechnology and Biological Studies 09-11.11.2017, New Delhi, India
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova J, et al. Evaluation of serum hepcidin concentrations in Parkinson's disease patients. XXII World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. 12-15.11.2017, Ho Chi Mihn City, Vietnam

Contract 5-S/2016 The role of some protective mechanisms in saliva in the development of denture stomatitis in patients with complete dentures, lined with silicone based elastic materials

Research team: Corr. Member of BAS, Prof. Ivan Gergov Mitov, MD, PhD, DSci

- Prof. Bozhidar Yordanov, DMD, PhD
- Assist. Prof. Mariana Yankova, DMD
- Assoc. Prof. Valentin Lozanov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Vessela Raykova, MD, PhD
- Assist. Prof. Radoslav Romeyov Baykushev, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The saliva of 43 totally edentulous patients at the age 48 to 90 (68.4 ± 9.94 years in the average) was examined. The purpose of this study was to determine the role of the saliva defense mechanisms for the development of denture stomatitis in patients, treated with complete dentures, lined with silicone-based elastic material. To determine the type and quantity of *Candida* spp. in a whole unstimulated saliva, the following methods were used: cultivation of clinical material of solid and liquid culture media to prove a fungal agent; fermentation and assimilation tests for the identification of various *Candida* species, spectrophotometric analysis and polymerase chain reaction (PCR) for the expression of *Candida* spp.. To determine the levels of LF and sIgA a ELISA kits were used and to determine salivary flow, pH and buffer capacity - the Saliva Check-Buffer kit. After denture delivery, on the third and the sixth month we found increased quantity of *C. tropicalis* in the patients of groups A and B. In the saliva of the patients with denture stomatitis, the predominantly present species was *C. tropicalis* (54%) isolated in quantities over 10^4 CFU/ml. The presence of *C. tropicalis* in the saliva related to this type of treatment is a prerequisite for the development of hard-to-treat candidoses. The results we

obtained showed that the prosthetic treatment with materials used in groups B and C specifically affected the immunomodulatory action of LF and sIgA in saliva, whereas the prosthetic treatment with Group A materials did not alter the salivary levels of LF and sIgA. We have found statistically significant lower levels for unstimulated salivary flow before prosthetic treatment in patients developing denture stomatitis six months after denture delivery and a tendency to lower pH levels and buffer capacity at the sixth month after prosthetic treatment.

Scientific publications and presentations:

- Yankova M, Yordanov B, Baykuchev R, et al. Presence of *Candida* spp. in the saliva of patients with complete dentures, lined with silicone-based elastic materials. J of IMAB. 2017; 23(4)
- Yankova M, Yordanov B, Mitov I. Changes in saliva at patients, treated with two-layer complete dentures, in relation to the development of denture stomatitis. Problems of Dental Medicine. 2017; 43(2)

Contract 6-S/2016 Role of high-risk Human Papilloma Viruses in the development of prostate cancer and/or precancerous conditions

Research team: Assist. Prof. Bilyana Georgieva Georgieva, PhD

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD, DSci
- Anita Kavrakova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of chemistry and biochemistry, Zdrave Str. 2, Sofia 1431.

RESULTS: The aim of the study is to investigate noninvasive urine specimens in suspected prostate cancer (PCa) patients by a panel of *PCA3*, *TMPRSS2-ERG* fusions and *GSTP1* promoter hypermethylation. Furthermore, we tested urine specimens for the presence of high-risk *Human Papilloma Viruses* (HPV) as an inflammatory cofactor in the complicated origin of prostate cancer (PCa). A total of 50 patients with elevated PSA and/or PCa physiological symptoms were analyzed. Fluctuations in the molecular profile were registered in most of the patients: neoplastic *GSTP1* allele, *PCA3* strongly elevated expression or hyperexpression. Only in 4 cases a positive *TMPRSS2-ERG* status was detected. High-risk HPV types were detected in ~ 35% of our urine specimens, obtained from patients at high risk of PCa based on their molecular profiles. Approximately 96% of detected high-risk HPVs are: 16, 33, 35, 31, distributed in the subgroup with highest oncogenic potential and experimentally proven association with malignant transformation of the prostatic epithelium. The estimated frequency of high-risk HPV types in control male samples with urothelial infection is significantly lower (11%). The pathological examination on cytological slides from high-risk HPV positive urine specimens showed inflammation; variable adaptations of cellular growth and differentiation and partially viral cytopathic effect. In a proportion of patients with molecular PCa disturbed profile precancerous conditions (increased primitive cells with disturbed maturation; enlarged hyperchromatic nucleus and condensed chromatin) were found. Our molecular PCa findings, were confirmed on the cellular level with cytological findings of high grade alterations: coarse distributed chromatin texture with nuclear membrane irregularity and thickening; high N:C Ratio; prominence of nucleoli and irregularity in shape thereof; identical monotonous nucleoli present in all cells in a

group (i.e. “Clonal” pattern); Tumor diathesis. The present study concerns novel data for Bulgarian PCa patients.

Scientific publications and presentations:

- Kavrakova A, Todorova A, Anachkov K, et al. Presence of high risk Human Papilloma Viruses in noninvasive urine samples with molecular profile fluctuations for prostate cancer, cytologically confirmed. 12th Balkan Congress of Human Genetics, 8-11 Sep 2017, Plovdiv, Bulgaria. PP-22.
- Kavrakova A, Todorova A, Anachkov K, et al. Investigation of noninvasive urine specimens with molecular profile fluctuations for a presence of high-risk Human Papilloma Viruses as an inflammatory cofactor in the complicated origin of prostate cancer. Global Congress on Prostate Cancer 28-30 Jun 2017, Lisbon, Portugal.
- Kavrakova A, Georgieva B, Anachkov K, et al. Investigation of noninvasive urine specimens with molecular fluctuations for a presence of high-risk Human Papilloma Viruses as an inflammatory cofactor in the prostate cancer. *Biology & Medicine*, 2018;10(3)

Contract 7-S/2016 Investigation of transduction mechanisms regulating the proliferation of the stem epidermal keratinocytes

Research team: Assist. Prof. Nikolay Dimitrov Ishkitiev

- Assist. prof. Maria Dragneva, PhD,
- Rozalia Tsikandelova, MSc
- Assist. Zornitsa Mihailova
- Marina Mitova, student
- Steliana Tashkova, student
- Prof. Vanio Mitev, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Medical Faculty, Dept. Of Chemistry and Biochemistry

RESULTS: The subject of this project is the human epidermal keratinocytes, and in particular the small part of them that preserves the characteristics of the epidermis' stem cells. To analyze these cells, we performed magnetic separation using two markers - $\alpha6\beta4$ integrin, laminin receptor and CD71, transferrin receptor. As a result of this two-step separation, we obtained three cell fractions - $\alpha6\beta4$ - (cells that unlocked its differentiation program), $\alpha6\beta4 + CD71 +$ (transiently proliferating cells) and $\alpha6\beta4 + CD71-$ (stem cell fraction). With this we achieved the first part of this project's goal - we successfully separated the stem cell fraction of the epidermis. Further, we demonstrated the characteristics of cells from each fraction by analyzing cell division phases of the cell cycle. Thus, we found that $\alpha6\beta4$ -keratinocytes are predominantly non-dividing cells, $\alpha6\beta4 + CD71 +$ are actively proliferating, and $\alpha6\beta4 + CD71-$ have typical stem cell characteristics - about 2/3 of them are in the G1 phase of cell division. To investigate the presence of protein molecules that have specific expression in the stem fraction compared to the proliferating keratinocytes we conducted 2-dimensional gel electrophoresis. We found seven differentially expressed proteins in stem compared to transiently proliferating keratinocytes. We are going subject these candidate proteins to mass analysis. The identification of proteins whose expression is different in the fractions we analyzed would direct us to specific functional molecules on which we would focus our research in the future. The results of our study have

both scientific and practical contribution to control skin processes related to its faster regeneration after injury, prevention of fibrous tissue formation, selection of appropriate methods for investigation and eventual treatment of tumor formations with epidermal origin.

Contract 8-S/2016 New approach for investigating the localization of drug-induced neurodegenerative processes in rat brain by means of differential scanning calorimetry

Research team: Prof. Boris Gotsev Tenchov, PhD, DSci

- Assist. Prof. Silviya Abarova, PhD
- Assist. Prof. Lubomir Traikov, PhD
- Assoc. Prof. Roman Tashev Traikov, PhD
- Assoc. Prof. Lyubka Tancheva, PhD - BAS
- Athanas Slavov, MD
- Aleksandra Marinkova, student
- Anelia Zasheva, student
- Stella Zaharinova, student
- Anastassia Djambazova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Physics and Biophysics

RESULTS: A new, based on DSC approach has been developed for investigating the localization of drug-induced neurodegenerative disorders in rat brain. Three different animal models were used: scopolamine- and streptozotocine-induced dementia of Alzheimer's disease type and 6-hydroxydopamine-induced disorders of Parkinson's disease type. As far as we know, this is the first study reporting proteome denaturational profiles obtained from separate parts of animal brains (Wistar rats). DSC was also used to record thermograms of rat liquor and blood plasma in order to identify proteome changes in these liquids induced by the neurodegenerative disorders. The thermograms obtained for the separate brain parts display significant distinctions in many cases, thus leading to the conclusion that the developed new approach provides interesting new information about localized proteome changes in the different parts of the brain resulting from neurodegenerative disorders. The following new results are of particularly high interest: 1. Scopolamine causes significant, opposite in sign changes in the exotherm positions of the cortex and striatum. These exotherms are beneficially influenced into the direction of recovery of the control exotherm positions by biologically active protectants. However, these protectants do not influence the scopolamine-induced changes in the exotherm position of the hippocampus; 2. Streptozotocine does not affect the cortex, hippocampus and cerebellum thermograms which remain similar to each other and to those of the controls but significantly modulates the striatum thermogram; 3. The inductor 6-hydroxydopamine applied to the right hemisphere striatum brings about big differences between right and left hemispheres manifested in the appearance of new transitions in the right hemisphere, which are clearly visible in the DSC and ITC thermograms; 4. The inductors scopolamine and streptozotocin bring about large changes in the liquor denaturational profiles, while the blood plasma thermograms are virtually unchanged and remain similar to the healthy animal thermograms.

Scientific publications and presentations:

- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, et al. A novel DSC Approach for evaluating protectant drugs efficacy against dementia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863(11):2934-41.
- Tenchov B, Abarova S, Koynova R, et al. Low-Temperature Exothermic Transitions in Brain Proteome of Mice, Effect of Scopolamine. *Thermochim Acta* 2017, 650, 26–32.
- Koynova R, Tenchov B. Natural product formulations for prevention and treatment of Alzheimer's disease: a patent review. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*
- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, et al. New investigation of drug efficacy against scopolamine-induced dementia in mice using differential scanning calorimetry, The Royal Society Meeting "Of mice and mental health: facilitating dialogue between basic and clinical neuroscientists", 24-25 April 2017, London, UK
- Nizamova N, Abarova S, Traikov L, et al. Thermal denaturation profiles of brain proteome and blood serum of rats with drug-induced dementia. A DSC study, YES Meeting Abstracts, PS213, Porto Biomed J. 2017;2(5):209
- Abarova S, Koynova R, Tancheva L, et al. Differential Scanning Calorimetry Investigation of Drug Efficacy of Myrtenal Against Scopolamine-Induced Dementia In Rodents. Annual Conference, Plovdiv 2-3 Nov 2017.

Contract 9-S/2016 Complex assessment of the characteristics of the glucose profile and cardiovascular risk in prediabetes

Research team: Prof. Tsvetalina Ivanova Tankova, MD, DMSc

- Prof. Georgi Georgiev, MD, PhD
- Assoc. Prof. Iliana Borisova, MD, PhD
- Ass. Prof. Greta Grozeva-Damyanova, MD, PhD
- Ass. Prof. Nevena Chakarova, MD, PhD
- Ass. Prof. Roumyana Dimova-Draganova, MD, PhD
- Ass. Prof. Maria Boyadjieva-Vladimirova, MD, PhD
- Ani Tododrova, MD, PhD student
- Mina Serdarova, MD, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Diabetology, Zdrave Str. 2, Sofia 1431

RESULTS: The aim of the study is to assess glucose variability in subjects with prediabetes and to evaluate its relation to oxidative stress and autonomic function. 50 subjects, mean age 55.6±9.7 years, mean BMI 28.4±6.4 kg/m², divided into 2 groups according to glucose tolerance: 32 subjects with prediabetes and 18 with normal glucose tolerance (NGT) were enrolled. Glucose tolerance was assessed by OGTT with serum glucose measured by hexokinase method. Immunoreactive insulin was assessed by ECLIA and oxLDL and 5-Nitrotyrosine – by ELISA method. Indices for insulin resistance and sensitivity were calculated. HbA1c was assessed immunoturbidimetrically. CGM was performed with professional sensor FreeStyle LibrePro. The indices of glucose variability CV (p<0.041), J-index (p<0.014), CONGA (p<0.047) and GRADE (p<0.036) were significantly elevated in the prediabetes group. Time in range was significantly decreased (p<0.014) and time above range (p<0.018) was significantly increased in prediabetes compared to NGT. In prediabetes the levels of HbA1c (p<0.036) and

mean interstitial glucose ($p < 0.025$) were significantly higher compared to NGT. A significant decrease in parasympathetic tone during deep breathing ($p = 0.009$) and in sympathetic tone at rest ($p = 0.021$) and during Valsalva maneuver ($p = 0.026$) were found in the prediabetes group. Sympathetic activity was related to SD in the participants with prediabetes ($F [1,31] = 7.91$, $p = 0.018$); whilst parasympathetic activity was related to J-index and time above range in subjects with prediabetes ($F [1,31] = 7.20$, $p = 0.004$) and with CONGA in NGT ($F [1,18] = 6.75$, $p = 0.025$). No significant correlation between autonomic tone and the markers of insulin resistance and oxidative stress was established. In prediabetes there is a significant increase in both mean glucose concentration and glucose variability. The assessment of glucose variability in prediabetes probably has additional role in the evaluation of the glucose homeostasis at these early stages of dysregulation and probably is an additional risk factor for autonomic dysfunction.

Scientific publications and presentations:

- Tankova T, Dimova R, Chakarova N et al. Assessment of glucose variability in subjects with prediabetes. *Endocrinol* 2018;2
- Chakarova N, Dimova R, Grozeva G, et al. Assessment of glucose variability in subjects with prediabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;151:56-64.

Contract 10-S/2016 Design and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel inhibitors of acetylcholinesterase – fourth stage

Research team: Prof. Irini Atanas Doytchinova, PhD, DSci.

- Assist. Prof. Georgi Stavrakov, PhD
- Assist. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Iva Valkova, PhD, Dept. of Chemistry
- Ventsislav Yordanov, PhD student

Organization unit: MU – Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of chemistry, 2 Dunav st., 1000 Sofia

RESULTS: A virtual screening by molecular docking on the enzyme acetylcholinesterase (AChE) of over 6 million drug and drug-like molecules from the ZINC database was performed and several compounds with high ChemPLP values were identified. Four of the best predicted binders to AChE were purchased and tested for AChE affinity, neurotoxicity and permeability across the blood-brain barrier (BBB) and intestinal mucosa. The results showed that all four new compounds exhibit affinities for AChE in the nanomolar range, three of them are nontoxic at concentrations up to 100 μM , and all of them have good permeability across BBB and intestinal mucosa. The interactions between the inhibitors and the enzyme were analyzed. The three nontoxic compounds are potential parents of new series of derivatives-inhibitors of AChE.

Contract 11-S/2016 A liquid chromatography–high resolution mass spectrometry – based approach combined with bioinformatic analysis to integrate chemistry with geographical origin: application in the study of *Portulaca oleracea* L. (purslane)

Research team: Assoc. Prof. Reneta Slavova Gevrenova, PhD

- Assoc. Prof. Valentin Lozanov, PhD
- Assist. Prof. Silviya Ruseva, PhD
- Assist. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Assist. Prof. Irina Lazarova, PhD
- Mirena Tzenova, student
- Rayana Dinkova, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav str. 1000 Sofia

RESULTS: This study presents a strategy based on liquid chromatography – high resolution accurate mass spectrometry method (LC – HRAMS) and bioinformatic methods to analyze 33 *Portulaca oleracea* L. (purslane) (Portulacaceae) accessions originating from 13 floral regions in Bulgaria together with 5 accessions with Greek provenance. The extraction was performed with microwave with solvent 0.1% formic acid. The aim was to develop a purslane metabolic database that was dedicated to LC-MS metabolic “fingerprints” of assayed samples. LC-MS data were preceded with Software application Compound Discoverer 2.1.0.308, Trial version (Thermo Sci., USA). Principal Component Analysis (PCA) combined with both descriptive and differential analyses were used to find marker metabolites to distinguish North Bulgaria vs South Bulgaria, North Bulgaria vs Greece and South Bulgaria vs Greece. There is no significant difference between the studied Bulgarian samples, while 49 marker metabolites were found in differential analysis between Bulgaria and Greece. Based on accurate masses (mass accuracy 1 ppm), retention times, comparison with commercial standards and literature data these secondary metabolites were identified after detailed analysis of Volcano-plots. 37 are reported for the first time. The identified compounds were used to perform a study of the biosynthetic pathways of purslane secondary metabolites using KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) software platform. The statistical treatments identified marker compounds that can be used to distinguish origin of accessions set. Combining LC-MS data with multivariate statistical analysis was proven effective in studying the purslane metabolites, allowing for integration of chemistry with geographic origin.

Scientific publications and presentations:

- Gevrenova R, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V, et al. A liquid chromatography–high resolution mass spectrometry – based approach combined with bioinformatic analysis to integrate chemistry with geographical origin: application in the study of *Portulaca oleracea* L. (purslane). 3rd Int Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Bansko, Bulgaria, 18-21 Oct 2017. p. 184
- Arnaudov P, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V, et al. Bioinformatics inside on Bulgarian *Portulaca oleracea* (purslane). 2nd Int Biomedical Congress. Sofia, Bulgaria, 17-19 Nov 2017

Contract 12-S/2016 Influence of sex hormones on subgingival microflora and periodontal health in children during puberty

Research team: Prof. Hristina Lazarova Popova, PhD

- Prof. Maya Rashkova, PhD

- Assist. Prof. Nadezhda Mitova, PhD
- Assist. Anton Kozarov
- Assist. Velichka Doseva - Panova, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Pediatric Dentistry, G. Sofiyski 1, Sofia 1431

RESULTS: The aim of the study was to investigate microorganisms from the subgingival biofilm in children with and without plaque-induced gingivitis, as well as the influence of sex hormones on the periodontium. The subject of the study was 60 children aged between 10 and 14 years, divided into two groups: - 30 children without gingivitis (PBI Saxer & Mulheman <25%), OHI-GV = 0.56, HI O'Leary = 80.3% plaque-free surfaces; - 30 children with plaque-induced gingivitis (PBI Saxer & Mulheman > 50%), OHI-GV = 2.15, HI O'Leary - 32.2%. Through PCR Real time, 9 control strains were collected from a pooled sample - *A.actinomycetemcomitans* (purple complex), *P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia* (red complex), *P.intermedia*, *P.micros*, *F.nucleatum*, *E.nodatum* (orange complex), *C.gingivalis* (green complex). By liquid chromatography with mass spectroscopy were examined testosterone in boys and estradiol and progesterone in girls samples of saliva. Immediately after eruption of the permanent teeth, at a healthy periodontium and a minimal amount of plaque, microorganisms with less pathogenicity (*P.intermedia*, *P.micros*-orange complex) and those necessary to initiate the coaggregation processes (*F.nucleatum*, *C.gingivalis*) are occurring. In children with gingivitis, the subgingival microflora is complicated by the isolation of microorganisms from the red complex (*P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia*) and the frequency of the microorganisms of the orange complex (*P.intermedia*, *P.micros*, *F.nucleatum*) is rising. Microorganisms are found in microbial associations of 1 to 7 microorganisms, and in children with gingivitis the variety increases. The subgingival ecosystem is complicated within the age as well the frequency of pathogenic microorganisms of the red complex is increasing. The levels of the studied sex hormones in saliva show slight quantitative changes, only estradiol in girls showed higher values at gingival inflammation.

Scientific publications and presentations:

- Mitova N, Rashkova M, Popova H. Microbial association of subgingival microorganisms in children with plaque-induced gingivitis. Problems of dental medicine, 2017; 43(2):71-78
- Mitova N, Rashkova M, Popova Hr. Subgingival microbiota during the process of formation of permanent dentition. Folia Medica, 2018
- Mitova N, Rashkova M, Kozarov A. Subgingival microflora in the process of permanent dentition formation – 17th scientific congress of BgDA, 15-17 Jun 2017, Bourgas, 65 p

Contract 13-S/2016 Pilot study of the cytokine profile in patients treated with dental implants

Research team: Prof. Angelina Kisselova-Yaneva, DDS, PhD, DSc

- Acad. Prof. Bogdan Petrunov, MD, PhD, DSci –NCIPD
- Assoc. Prof. Georgy Nikolov, MD, PhD – NCIPD
- Assoc. Prof. Maya Lyapina, MD, PhD
- Prof. Mariela Yaneva-Deliverska, PhD, DSc,

- Prof. Maria Nikolova, PhD, DSci – NCIPD
- Radoslava Grozdanova, PhD – NCIPD
- Jordan Galabov, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Image and Oral Diagnostic, G. Sofiyski Str. 1, Sofia 1431

RESULTS: The aim of the present study was to determine the serum levels of pro-inflammatory cytokines mediating inflammatory and osteolytic processes in perimplantitis: interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-17 and interleukin-22 (IL-22) in patients treated with dental implants and in persons with suspected or proven sensitization to dental materials. The measurement of serum cytokine levels was performed with commercial ELISA kits, according to the manufacturer's instructions. Skin patch testing with Ti, TiO₂, Titanium(III)nitride and Titanium(III)oxalate decahydrate was performed. Quantitative determination of allergen-specific IgE in serum against panel of inhalatory and food allergens was performed by EUROIMUN. A total of 100 persons were included in the study: - a main group of 49 patients treated with dental implants, of which 26 without rejection reactions and periimplantitis and 23 - with periimplantitis; - a control group of 51 persons, of whom 32 with sensitization to dental materials and 19 without evidence of allergy, of different gender, age and occupations. A significantly higher mean TNF- α serum levels were established among the patients without dental implants and sensitized to dental materials if compared with those treated with dental implants without reaction of rejection and periimplantitis. The incidence of sensitization to titanium allergens was low in all patient groups, without significant differences. Highest was the incidence of sensitization to Titanium nitride, especially among the patients with periimplantitis. Among some patients with IgE-mediated allergy and treated with titanium implants high levels of some of the tested cytokines (TNF- α and IL-22) were established. Three of the 4 patients with IgE-mediated allergy, treated with titanium implants, and with high levels of one or two of the tested cytokines, also demonstrated positive skin-patch tests to titanium salts. In conclusion, no significant differences in serum cytokine levels in patients with titanium implants were established, so no definitive conclusions about their clinical significance could be drawn-out. We could assume that the release of pro-inflammatory mediators reflects a "normal" non-specific response in patients exposed to Ti particles.

Scientific publications and presentations:

- Lyapina M, Cekova M, Deliverska M, et al. Immunotoxicological aspects of biocompatibility of titanium. J of IMAB. 2017;23(2):1550-9.
- Lyapina M, Cekova M, Nikolov G, et al. Pilot study of serum proinflammatory cytokone levels in patients treated with dental implants. Intern J Curr Adv Res. 2018;7(4D):11555-8.
- Lyapina M, Cekova M, Nikolov G, et al. Pilot study of serum proinflammatory cytokone levels in patients treated with dental implants. 28-th Annual Assembly of IMAB. 13 - 16 May 2018.

STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2017

Contract D-232/15.12.2017 Fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase or/and carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* among hospitalized, ambulatory patients and healthy people - children and adults

Research team: Assoc. Prof. Rumyana Donkova Markovska-Davidkova, MD, PhD

- Prof. Temenuga Stoeva, MD, PhD
- Petya Stankova
- Assoc. Prof. Raina Gergova, MD, PhD
- Prof. Lyudmila Georgieva, MD, PhD, DSci
- Kalina Mihova
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Prof. Marianna Murdjeva, MD, PhD - MU-Plovdiv
- Prof. Magdalena Lesseva, MD, PhD - UMHATUM "N. I. Pirogov"
- Corr. Member of BAS Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Microbiology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: The aim of this project was to investigate the mechanisms of resistance and clonal relatedness among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and/or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from feces of hospitalized, ambulatory patients and healthy people - children and adults and compare with those in clinical isolates of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Susceptibility was determined by the disc-diffusion method, MIC strip method and methods for detection of ESBL and carbapenemase production, AmpC and/or carbapenemases (in the collection of carbapenem-resistant isolates). Isoelectric focusing, bioassay and PCR were used to characterize the major types of beta-lactamases, sequencing, PCR to determine the basic mechanisms of plasmid quinolone resistance, plasmid typing, epidemiological typing by ERIC-PCR and MLST. In conclusion, in 105 clinical isolates from 8 hospitals from 4 towns in Bulgaria - Sofia, Varna, Plovdiv and Pleven, we found carbapenemases - KPC-2 (51%) and NDM-1 (47%). KPC-2 producing *K pneumoniae* belonged primarily to four MLST types - ST15, ST29, ST16, ST902, all of which were Inc FII plasmids. Almost all NDM producers belonged to the ST11 type. These producers were also isolated from the feces of patients hospitalized in the participating hospitals, proving the possibility that the normal intestinal flora is a reservoir for these dangerous microorganisms. The third-generation cephalosporin-resistant isolate was 28% (356 out of 1255 studies), the highest in children and 54% in hospitalized children, and was the lowest in healthy adults. Resistance to cephalosporins third generation was due to the production of predominantly CTX-M-15 enzymes in 48%, followed by CTX-M-3-15%, hyperproduction of AmpC-14%, CTX-M-14-6%. Colistin combinations mainly with rifampicin - in 36%, but also with azithromycin, meropenem, doxycycline or gentamicin, showed a synergistic effect in the carbapenem and colistin-resistant isolates of *K. pneumoniae*.

Scientific publications and presentations:

- Marteva-Proevska Y, T Velinov, R Markovska, et al. Antibiotic combinations with colistin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* - *in vitro* assessment. Journal of IMAB. 2018;24(4):2258-66
- Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, et al. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Bulgarian hospitals - Interregional spread of ST11 NDM-1-producing *K. pneumoniae*. Infect Genet Evol. 2019;69:61-7.
- Marteva-Proevska Y, T Velinov, R Markovska, et al. High level of colistin resistant Gram-negative bacteria in a University Hospital in Bulgaria. CR Acad Bulg Sci., 2019
- Stankova P, R Markovska, T.Stoeva, et al. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients in two hospitals in Varna and Sofia 14 Congress of Microbiologists in Bulgaria, Hisarya 10-13.10. 2018

Contract D-233/15.12.2017 New biochemical, genetic and clinical markers to optimize the diagnosis and monitoring of nonalcoholic fatty liver disease in obese and pre-diabetic patients

Research team: Prof. Zdravko Asenov Kamenov, MD, PhD, DSci

- Prof. Ludmila Vladimirova, MD, PhD, DSci
- Vera Karamfilova, MD
- Antoaneta Gateva, MD, PhD
- Irena Ivanova, MD, PhD
- Prof. Asen Alexiev MD, PhD, DSci
- Nadejda Milcheva MD, PhD
- Prof. Alexey Savov, PhD, DSci
- Nadejda Yaneva
- Assoc. Prof. Raya Ivanova MD, PhD
- Assoc. Prof. Radina Ivanova-Boyanova, MD, PhD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Internal Medicine, University Hospital "Alexandrovska", 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

RESULTS: In the study were included 218 patients with ultrasound established liver steatosis, aged 50,22 \pm 10,86 years, divided into 2 groups – group 1 with obesity without glycemic disturbances (n=135), and group 2 with obesity and prediabetes (n=83). We found significantly higher levels of Pentraxin3 in the group with prediabetes compared to the group with obesity (1877.03 \pm 895.45 vs. 2321.29 \pm 926, 63 ng/ml, p=0.028). ELF score and hyaluronic acid, which is part of this index, correlate moderately with the intima-media thickness and the diabetic neuropathy index. WISP2 correlates moderately with the ankle-brachial index as well as the vibration threshold. No significant dependence was found between Pentraxin 3, WISP2, ELF and the two genes studied- PNPLA3 and TM6SFL. A higher percentage of heterozygous carriers of the pathological alleles C> G and C> T was found in the prediabetic group from both genes tested, compared to the group without carbohydrate disturbances, where the homozygous variants of the normal genes are predominant. The results found that the risk of glycemic disturbances is about 9.6 times higher in the carriers of the pathological allele G in the PNPLA3 gene compared to normal homozygotes. The risk of insulin resistance is also significantly

increased in these patients by 2.1- fold compared to normal homozygotes. Intima - media thickness is significantly higher at PNPLA3 C> G genotype. The risk of carbohydrate disturbances is about 3.9 times higher in carriers of the C> T TM6SF2 genotype compared to normal homozygotes. In heterozygotes C> G PNPLA3 the risk of metabolic syndrome is about 3 times higher than in normal homozygotes. In heterozygotes C> T TM6SF2 compared to normal homozygotes, the risk of developing metabolic syndrome is about 8.4 times higher.

Contract D-234/15.12.2017 Acute pancreatitis – assessment of disease’s severity and the role of enteral nutrition in the therapeutic process

Research team: Prof. Borislav Georgiev Vladimirov, MD, PhD

- Prof. Boiko Korukov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Maya Belitova-Zhelyazkova, MD, PhD
- Assist. Prof. Mila Kovacheva-Slavova, MD, PhD
- Stanislava Zivkova Keremidchieva-Hristova, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Gastroenterology, UMBAL “Tsaritsa Ioanna-ISUL”, 8 Byalo more Str., 1527 Sofia

RESULTS: Early determination of acute pancreatitis (AP) severity is often a clinical challenge, and the need for early enteral nutrition (EN) is a matter of debate. The aim of the present study is to investigate the contribution of early systemic inflammatory response assessment through a panel of biochemical markers (procalcitonin, IL-6, prealbumin) in addition to commonly accepted methods, leading to therapeutic approach optimization in patients with AP. The AP severity was determined by the revised Atlanta criteria, APACHE-II, imaging methods, routine laboratory parameters, and the biochemical inflammatory marker panel (procalcitonin, IL-6, prealbumin). Patients with moderate and severe AP received early EN. The study enrolled 120 patients with AP at mean age 53.21 ± 15.9 years, 61.67% were men. The leading etiological cause in women was biliopancreatitis ($p=0.04$), and alcohol in men ($p=0.01$). 52.50% of patients were with mild, 35.83% with moderate and 11.67% with severe AP regardless of sex, age and etiology. 50% of patients had APACHE-II scores <3 , and 2.5% >8 . Localized complications were more common in males ($p=0.03$) and after alcoholic abuse ($p=0.045$). 93.02% of those receiving EN ($n=57$) switched to per os feeding during the first 48 hours. Adverse effects and complications due to EN were observed in 22.81%. EN is most beneficial in patients with severe AP, WON/necrosis and transient multi-organ failure. Antibiotic treatment was started at hospitalization in 68.82% of 93 patients. We observed significant positive correlations between procalcitonin and IL-6 with each other and with CRP and negative correlation with prealbumin. Significantly higher procalcitonin, CRP, IL-6 levels and lower prealbumin levels were found in patients with multi-organ failure, SIRS and WON versus pseudocysts. Malnutrition severity (prealbumin) and mean hospital stay correlated with AP severity ($p=0.04$). Mortality was 0.83%. Biochemical markers panel inclusion has the potential to increase the specificity of initiating antibiotic therapy and EN, resulting in disease outcome improvement.

Scientific publications and presentations:

- Kovacheva-Slavova M, Golemanov B, Genov J, et al. Malnutrition risk in patients with pancreatic disorders. Fifth National Congress for Young Gastroenterologists, Sofia, Bulgaria, 29-31 Mar 2019

- Kovacheva-Slavova M, Genov J, Golemanov B, et al. Malnutrition screening in patients with pancreatic disorders. 51 Annual Meeting of the Eur Pancreatic Club, Bergen, Norway, Jun 25-29, 2019

Contract D-235/15.12.2017 Evaluation of connection between hepcidin and ferroportin with brain-vascular atherosclerotic changes parameters in chronic kidney diseases patients

Research team: Assoc. Prof. Savina Petrova Hadjidekova, MD, PhD

- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Assist. Prof. Radoslava Grozdanova, PhD - NCIPD
- Acad. of BAS Prof. Latchezar Traykov, MD, PhD, DSci
- Prof. Yulia Petrova, MD, PhD, DSci
- Prof. Kamen Tzatchev, MD, PhD, DSci
- Prof. Boris Bogov, MD, PhD
- Prof. Evgeniy Vazelov, MD, PhD
- Assist. Prof. Georgi Angov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Mila Tzankova, MD, PhD
- Assist. Prof. Marieta Karadjova, MD, PhD
- Assist. Prof. Maria Petrova, MD, PhD
- Assist. Iren Petrova-Ivanova, MD
- Prof. Maria Nikolova, MD, PhD - NCIPD
- Todor Kunchev, MD, PhD student
- Petar Jeliatzkov, MD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Genetics; 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

RESULTS: During our study we evaluated serum hepcidin concentrations and ferroportin macrophageal expression in 28 females and 32 males with chronic kidney disease (stages II to V, incl.) and connection to brain-vascular atherosclerotic changes parameters was established. Their results were compared to: 24 females and 36 males with chronic kidney disease but without brain-vascular atherosclerotic changes, and 30 females and 30 males - because main disease changes iron metabolism parameters, healthy volunteers with no chronic kidney disease and no brain-vascular atherosclerotic changes, established by the same laboratory and functional measurements. Statistically increased serum hepcidin concentrations is found in patients with chronic kidney disease (stages II to V, incl.) with brain-vascular atherosclerotic changes ($254.8 \pm 25.6 \mu\text{g/l}$) compared to chronic kidney disease patients with no brain-vascular atherosclerotic changes ($149.9 \pm 16.7 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. Serum hepcidin is increased in both CKD patients groups compared to healthy volunteers ($19.0 \pm 2.2 \mu\text{g/l}$); $P < 0.001$. Statistically increased serum homocysteine and AMDA concentrations are found in patients with chronic kidney disease (stages II to V, incl.) with brain-vascular atherosclerotic changes ($23.6 \pm 2.9 \mu\text{mol/l}$ и $1.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$) compared to chronic kidney disease patients with no brain-vascular atherosclerotic changes ($23.6 \pm 2.9 \mu\text{mol/l}$ и $1.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$); $P < 0.05$. Homocysteine and ADMA concentrations are increased in both CKD patients groups compared to healthy volunteers ($1.9 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$ и $0.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$); $P < 0.001$. Serum vitamin B12 concentrations are statistically decreased in patients with chronic kidney disease (stages II to V, incl.) with brain-vascular

atherosclerotic changes (25.7 ± 6.1 pmol/l) compared to chronic kidney disease patients with no brain-vascular atherosclerotic changes (79.9 ± 11.3 pmol/l); $P < 0.005$. Vitamin B12 levels are decreased in both CKD patients groups compared to healthy volunteers (435.6 ± 20.9 pmol/l); $P < 0.001$. Statistically increased brain-vascular atherosclerotic changes of parameters (IMT and ABI) are found in patients with chronic kidney disease (stages II to V, incl.) (1.20 ± 0.13 and 1.65 ± 0.11) compared to CKD patients with no brain-vascular atherosclerotic changes (1.06 ± 0.13 and 1.59 ± 0.11); $P < 0.05$. In both CKD patients groups brain-vascular atherosclerotic changes parameters are increased compared to healthy volunteers (0.37 ± 0.09 и 1.15 ± 0.08); $P < 0.001$. In patients with chronic kidney disease (stages II to V, incl.) with brain-vascular atherosclerotic changes we found significant decreased ferroportin macrophageal expression compared to serum hepcidin concentration; $P < 0.001$. Patients with CKD but with no brain-vascular atherosclerotic changes show the same correlation between ferroportin macrophageal expression compared to serum hepcidin concentration; $P < 0.001$. Increase of serum hepcidin, homocysteine and ADMA levels was found in CKD patients (stages II to V, incl.) with brain-vascular atherosclerotic changes compared to CKD patients (stages II to V, incl.) with no brain-vascular atherosclerotic changes, as mean $r=0.907$ with the significance of $P<0.001$. Significance of hepcidin, homocysteine and ADMA levels increased in both CKD patients groups compared to healthy controls is $P<0.001$. Atherosclerotic a. carotis changes parameters (IMT and ABI) were increased in CKD both group patients (with and with no brain-vascular atherosclerotic evidence) compared to healthy volunteers; $P<0.001$. Decreased vitamin B12 levels and ferroportin macrophageal expression in CKD patients (with and with no brain-vascular atherosclerotic evidence) compared to the healthy control group showed $r=0.783$ with the significance of $P<0.001$. It is important for the routine clinical practice quantification of hepcidin and evaluation of ferroportin macrophageal expression as early markers for iron metabolism dysregulation, trace element involved in the pathogenesis of atherosclerotic blood vessels changes in chronic kidney disease patients (stages II to V, incl.). Both parameters correlate to IMT and ABI changes during atherosclerosis development in the organism. Increased ADMA is connected to higher stroke risk. Hepcidin and ADMA levels represent one of the most important stable and unstable angina pectoris predictors.

Scientific publications and presentations:

- Manolov V, Hadjidekova S, Grozdanova R, et al. Iron homeostasis and atherosclerotic changes in chronic kidney disease patients. *Modern Medicine LXII (2/2018):47-62.*
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Evaluation of cognitive function in chronic kidney disease patients and its connection to serum hepcidin levels. *Orion Conferences on Neurology, Dementia & Alzheimer's disease. 17-19.04.2018, Barcelona, Spain*
- Manolov V, Hadjidekova S, Emilova R, et al. Atherosclerosis in chronic kidney disease patients is connected through hepcidin. *9th Annual World Congress of Neurotalk-2018 (NT-2018). 16-18.05.2018, Bangkok, Thailand*
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Chronic kidney disease increases stroke cases; where is the hepcidin role? *4 Eur Stroke Organisation Conference (ESOC 2018). 16-18.05.2018, Gothenburg, Sweden*
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Quantification of serum hepcidin in chronic kidney disease patients with atherosclerotic changes in a. carotis. *16th Annual Dialysis & Renal Medicine Conference. 08-09.06.2018, Baltimore, USA*

- Manolov V, Hadjidekova S, Emilova R, et al. Atherosclerotic changes and serum hepcidin levels in chronic kidney disease patients. World Nephrology Congress. 20-22.06.2018, Paris, France
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Correlation between IMT and serum hepcidin levels in atherosclerotic a. carotis changes in CKD. 22nd Biennial Meeting of the Int Society of Developmental Neuroscience. 22-25.05.2018, Nara, Japan
- Manolov V, Hadjidekova S, Emilova R, et al. Atherosclerosis in chronic kidney diseases patients is connected through hepcidin. 2nd World Congress & Expo on Biotechnology and Bioengineering. 25-27.06.2018, Dubai, UAE
- Hadjidekova S, Petrova I, Vasilev V, et al. Serum hepcidin in chronic kidney disease patients with atherosclerosis. 4 Annual World Pathology Conference (WPC-2018). 14-15.07.2018, Budapest, Hungary
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Atherosclerosis and changed iron metabolism in chronic kidney disease. 29 Conference on Public Mental Health and Neuroscience (World Mental Health 2018). 16-18.07.2018, Dubai, UAE
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. IMT correlates to serum hepcidin in atherosclerotic a. carotis changes in patients with chronic kidney disease. 27 Euro Global Neurologists Meeting. 23-25.07.2018, Moscow, Russia
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Evaluation of iron homeostasis in chronic kidney disease patients with a. carotis atherosclerotic changes. 20 Edition of Int Conference on Clinical Nephrology. 06-07.08.2018, Madrid, Spain
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Evaluation of cognitive function disorders and connection to iron homeostasis in patients with chronic kidney disease. 26 Eur Neurology Congress. 06.08.-07.08.2018, Madrid, Spain
- Manolov V, Hadjidekova S, Petrova I, et al. Hepcidin quantification in chronic kidney disease patients with atherosclerotic changes. BIT's 16th Annual Congress of Int Drug Discovery Science and Technology. 16.08.-19.08.2018, Boston USA
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Atherosclerotic changes of a.carotis in chronic kidney disease patients with changes iron homeostasis. Annual Physicians Meeting 2018. 21-22.09.2018, Osaka, Japan
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Correlation between IMT and serum hepcidin in atherosclerotic changes in chronic kidney disease patients. 5th World Heart and Brain Conference. 24-26.09.2018, Abu Dhabi, UAE
- Manolov V., Petrova I., Hadjidekova S., et al. Evaluation of intima-media thickness in patients with chronic kidney disease and a. carotis atherosclerotic changes. XIth National Conference of clinical laboratory. 27-29.09.2018, Plovdiv, Bulgaria
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Evaluation of early cognitive function disturbances and serum hepcidin quantification in chronic kidney disease patients. Global Insight Conference on Neurology and Brain Disorders (ICNBD-2018). 18-20.10.2018, Las Vegas, Nevada, USA
- Hadjidekova S, Manolov V, Petrova I, et al. Quantification of serum hepcidin in chronic kidney disease patients with atherosclerotic changes in a. carotis. 16th Int Conference on Nephrology & Therapeutics. 19-20.10.2018, New York City, New York, USA

- Petrova I, Hadjidekova S, Manolov V, et al. Evaluation of cognitive function disturbances and connection to iron homeostasis in chronic kidney disease patients. Int Conference on Nephrology and Urology. 21-22.01.2019, Singapore

Contract D-236/15.12.2017 Protein fibrillization processes in plasma proteome in neurodegenerative diseases

Research team: Prof. Boris Gotsev Tenchov, PhD, DSci

- Assist. Prof. Silviya Abarova, PhD
- Assist. Prof. Lubomir Traikov, PhD
- Prof. Regina Komsa-Penkova, PhD, DSci - MU-Pleven
- Prof. Rumiana Koynova PhD, DSci
- Nezi Nizamova, student
- Cvetoslav Georgiev, student
- Anastasios Papageorgiou, student
- Stella Zaharinova, student
- Anelia Zasheva, student
- Acad. Prof. Latchezar Traykov, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Maria Petrova MD, PhD
- Todor Kunchev, PhD student
- Dimiter Bakalov, student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Physics and Biophysics, Sofia, Str. Zdrave 2

RESULTS: The most remarkable result of the present study is that in the cases with advanced Parkinson's disease, the microcalorimetry data allowed to clearly distinguish two distinct, discrete patient groups with substantially different denaturation profiles of their blood plasmas, that were not distinguished in any way in the diagnoses provided by the medical team. The most characteristic sign by which these two patient groups differ from each other is the large difference in albumin peak height in the thermograms. In this report, we have designated these two groups as high-albumin and low-albumin patients. This result suggests that blood plasma studies using DSC reveal new, so far unknown opportunities to elucidate the molecular mechanisms of the disease. Another remarkable, completely original result is that the investigated samples of human cerebrospinal fluid display well-expressed exothermic transitions that precede in temperature the protein denaturation transitions, in contrast to blood plasma samples which only show endothermic denaturation transitions. Because these exotherms do not result from post-denaturation high-temperature aggregation of proteins, they obviously show the presence of specific water-soluble protein fractions in the cerebrospinal fluid characterized by reversible processes of fibrillization and/or aggregation occurring prior to their denaturation. In order to clarify the nature of these protein fractions, further testing by other methods is required. Other studied groups of samples from patients with neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and various types of dementia, also revealed large differences between the thermodynamic characteristics of blood plasma from healthy and diseased individuals. The large variety of different in shape blood plasma denaturation profiles of patients with

neurodegenerative disorders has shown that DSC has clear potential as a diagnostic and research method that can be used to identify the nature of neurodegenerative disease as well as to evaluate its severity and the effect of therapies applied.

Scientific publications and presentations:

- Tenchov B, Koynova R, Antonova B, et al. Blood plasma thermal behavior and protein oxidation as indicators of multiple sclerosis clinical status and plasma exchange therapy progression *Thermochimica Acta* 2019;67:193-9
- Tenchov B, Zaharinova S, Abarova S, et al. Thermodynamics of Protein Fibrillation. Relation to Molecular Basis of Diseases. 10th Jubilee Int Conference of the Balkan Physical Union, AIP Conf. Proc. 2018

Contract D-238/15.12.2017 Assesment of vitamin D, vitamin B12 and homocysteine levels in Bulgarian patients with type 2 diabetes

Research team: Prof. Tsvetalina Ivanova Tankova, MD, DSci

- Prof. Georgi Georgiev, MD, PhD
- Assoc. Prof. Iliana Borisova, MD, PhD
- Assist. Prof. Greta Grozeva-Damyanova, MD, PhD
- Assist. Prof. Nevena Chakarova, MD, PhD
- Assist. Prof. Roumyana Dimova-Draganova, MD, PhD
- Ani Tododrova, MD, PhD student
- Mina Serdarova, MD, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Endocrinology, Division of Diabetology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

RESULTS: The aim of the study is to assess vitamin B12 and vitamin D levels in a Bulgarian population of patients with type 2 diabetes. 308 type 2 diabetes patients (170 males, 138 females), of mean age 60.3 ± 10.4 years and mean BMI 32.0 ± 5.9 kg/m², were enrolled. Serum levels of vitamin B12 and vitamin D were measured by electrochemiluminescent immunoassay. B12 deficiency is present in 34% of the studied population, 28% have low-normal levels and 38% - normal levels. 44% of the patients present with vitamin D deficiency, 13% - with severe deficiency, 30% - with insufficiency and 13% - with normal levels. B12 deficiency is present in 18% of the patients taking metformin and in 37.7% of those not on metformin. The mean level of B12 is 178 pmol/l in the group receiving metformin, and 235 pmol/l in the group not on metformin ($p = 0.006$). B12 level correlates with the mean dose of metformin ($r = -0.18$, $p=0.005$) and does not correlate with the duration of therapy. Each 250 mg increase in metformin dose increases the risk of B12 deficiency by 15%. ($p=0.005$). About one third of the patients with type 2 diabetes have B12 deficiency and another third have low-normal levels that do not exclude deficiency. More than half of type 2 diabetes patients have vitamin D deficiency and another one third are with insufficiency. B12 deficiency is twice more common in patients receiving metformin. The main determinant of B12 deficiency appears to be metformin dose.

Scientific publications and presentations:

- Chakarova N, Dimova R, Mincheva R et al. Vitamin B12 status in a Bulgarian population with type 2 diabetes. *Endocrinologia* 2019;3.

Contract D-239/15.12.2017 The influence of different rotary NiTi instruments and various filling techniques on the incidence of dentinal defects during endodontic treatment

Research team: Prof. Radosveta Ivanova Vassileva, DMD, PhD

- Assoc. Prof. Emilia Karova, DMD, PhD
- Assist. Prof. Irina Tsenova, DMD

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Conservative Dentistry, St. George Sofiyski Str. 1, Sofia, 1431

RESULTS: The objective of the current study was the assessment of the ability of different nickel-titanium rotary systems and filling techniques to initiate dentinal radicular microcracks. Changes in the dentinal wall caused by various endodontic systems were observed on 84 lower incisors, whereas for the obturation methods we utilized 50 lower premolars. We used a positive and a negative control group. After the shaping and filling of the root canals, all samples were sectioned horizontally at 3, 6, 9 mm levels from the root apex. An overall number of 252 slices from the incisors and 150 from the premolars were obtained and inspected with stereomicroscope under x40 magnification and captured with a digital camera. The comparison between the different shaping systems showed a higher incidence of dentinal defects in the apical third of the root. This difference was statistically significant in comparison with the microcracks from the middle and the coronal third. The least number of slices with dentinal defects was registered at the coronal portion of the root. The greatest number of slices with cracks was observed in the *Pro Taper Universal* and *HyFlex* group (14 each). All rotary NiTi systems generated dentinal microcracks regardless of their alloy, taper, geometry, type of motion and the total number of files used. The three filling methods used in the current experiment performed almost equally in the three levels of the root. The warm vertical compaction initiated cracks in the coronal and middle root portions, while the cold lateral condensation – in the apical. The least microcracks were observed in the apical third of the roots, filled with GuttaCore. Stereomicroscopic investigation in the three levels of the root canal is a reproducible and reliable method for microcrack detection and observation. There was neither propagation nor appearance of new microcracks after a four-week period of time.

Scientific publications and presentations:

- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. The ability of root canal cleaning and shaping procedures to initiate dentinal radicular microcracks. *Int J Sci Res.* 2018;7(8):1558-65.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Damages to radicular dentin during root canal filling and retreatment procedures: analysis, evaluation methods, and methodological issues. *Int J Sci Res.* 2018;7(10):524-33.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Dentinal Microcrack Formation After Root Canal Filling with Thermoplasticized Gutta-percha: an in vitro study. *Int J Sci Res.* 2018;7(11):1360-4.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Incidence of dentinal microcracks after root canal preparation with two reciprocating systems: a stereomicroscopic study. *J of IMAB.* 2018; 24(4):2245-9.
- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. The ability of ProTaper Next NiTi rotary systems to induce microcracks: a stereomicroscopic investigation. 11th Int Sofia Dental Meeting, Sofia, Bulgaria, 27-30 Sep 2018

- Tsenova I, Vassileva R, Karova E. Nickel-titanium rotary files: potentials for fractures and damages of root canal dentin. 3rd Int Biomedical Congress–Sofia, Bulgaria, 16-18 Nov 2018

COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2016"

Contract 1-I/2016 Influence of sex hormones on periodontal health of children during puberty and development of clinical criteria for periodontal assessment in childhood and adolescence

Research team: Prof. Maya Rasheva Rashkova, PhD

- Assist. Prof. Nadezhda Mitova, PhD
- Assist. Anton Kozarov

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Pediatric Dentistry, G. Sofiyski 1, Sofia, 1431

RESULTS: The aim of the study was to develop diagnostic clinical criteria for periodontal health assessment during the period of eruption and to investigate the influence of sex hormones on the periodontium in children during puberty. The subject of the study were: 90 children (6 and 14 years) without gingivitis and good oral hygiene - to develop diagnostic criteria for periodontal examination by measuring the depth of gingival sulcus at varying levels of tooth eruption, using a third generation electronic probe Parometer (Orange). Six measurements of 1522 teeth were made; 60 children (10 and 14 years) - 30 children without gingivitis and 30 children with plaque-induced gingivitis - for measurement by liquid chromatography with mass spectroscopy, testosterone (in boys) and progesterone and estradiol (in girls) in saliva samples. Statistical processing with SPSS 19. The results showed that the depth of gingival sulcus in the period of eruption varies when eruption is up to 1/3 of the clinical crown from 3.08 mm to 1.88 mm until occlusal contact. At the incisors and canines, this process is more dynamic, whereas in the other tooth groups the changes in the depth of the gingival sulcus are smoother with smaller deviations. When the teeth enter the occlusal contact there is stabilization of periodontium and the gingival sulcus reaching average values close to the adult standard (2.20 mm). For the first molars, incisors and first premolars the stabilization of the periodontium is up to the ages of 11 and 12 and for the other groups by age of 14. Periodontal indexes using representative teeth - first incisors and first molars can be appropriately used from the age of 8. In the period 10-14 years age sex hormones did not show a significant change in saliva samples, both in girls and boys. There is a slight increase in hormones in gingivitis children compared to healthy children.

Scientific publications and presentations:

- Mitova N, Rashkova M, Tankova H. Gingival sulcus depth in healthy children with teeth in eruption. Problems of dental medicine, 2017;43(2):79-86
- Mitova N, Rashkova M, Tankova H. Depth of gingival sulcus in different tooth groups during eruption. Journal of IMAB, 2018

COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2017"

Contract D-230/15.12.2017 Enhance the capacity of the laboratory Analysis and synthesis of bioactive compounds of the Medical chemistry and biochemistry department in the field of omix (metabolomics, proteomics, lipidimics) research

Research team: assoc. prof. Valentin Stoychev Lozanov PhD

- Assoc. Prof. Ivaylo Ivanov PhD
- Assist. Prof. Anelia Vasileva
- Assist. Prof. Vesela Lozanova
- Paulina Sugareva
- Yassen Hristov, PhD student
- Delyn Dobromirov Zhekov, PhD student

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of medicine

RESULTS: As a result of the implementation of the project, modern conditions were created for the realization of metabolomic, lipidomic and proteomic studies in the laboratory and the university respectively, in the long term. A computer workstation and computer server with high productivity and capacity have been purchased and put into operation, which allows the processing of large arrays of data obtained from the realization of mass spectroscopic studies. An arsenal of software applications for omics research has been updated and a team of young scientists trained and qualified to work with them has been set up. The new infrastructure is used to implement several ongoing projects - the discovery of new biomarkers for the diagnosis of COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease); lipid and eicosanoids profiles in psoriasis; metabolic profiles of wild mushrooms; identification of aromatic compounds in Bulgarian yoghurt; identification of potential inhibitors of caspases and acetylcholinesterase in *Gypsophila glomerata* extract; identification of substances with a potential antitumor effect in *Tanacetum vulgare* L. plant extracts. A web-based portal of the laboratory is under construction. The built infrastructure has enabled the laboratory to be fully integrated with the international ZCloud information exchange network.

Scientific publications and presentations:

- Balabanova V, Gevrenova R, Zheleva - Dimitova D, et al. Bioinformatic inside on portulaca oleracea l. (purslane) with Bulgarian and greek origin, 10th CMAPSEEC (10th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast Eur Countries), May, 2018, Split, Croatia
- Dospatliev L, Lozanov V, Ivanova M, et al. 2018. Differences in amino acid composition of stem and cap of morchella esculenta from the Batak Mountain, Bulgaria. 2nd Int Conference on Bio-antioxidants (Bio-antioxidants 2018). Sep 2018, Varna, Bulgaria.
- Dospatliev L, Lozanov V, Ivanova M, et al. Amino acids in edible wild mushroom from the Batak Mountain, Bulgaria. 11 Chemistry Conference, Oct 2018, Plovdiv.

Contract D-231/15.12.2017 Building of a laboratory for the posture and locomotion study at the Physiotherapy department in FPH in MU-Sofia (stage I)

Research team: Assoc. Prof. Stefan Nedkov Yanev, PhD

- Assoc. Prof. Vanina Mihailova-Alakidi, PhD
- Assoc. Prof. David Kanchev, PhD
- Assoc. Prof. Yoannis Papantasiou, MD, PhD
- Prof. Ivet Borisova Koleva-Yosinova, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Todor Dimitrov, PhD
- Assist. Prof. Julieta Gerenova, PhD
- Assist. Prof. Inna Ivanova, PhD
- Assist. Prof. Nadya Manova
- Assist. Prof. Elena Zheleva
- Assist. Prof. Elvira Nikovska
- Prof. Antonia Yanakieva, PhD
- Prof. Mariela Yaneva-Delivska, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Todor Kundurgiev, PhD
- Assist. Prof. Svetlin Georgiev

Organization unit: MU - Sofia, Faculty of Public Health, Dept. of Physiotherapy, 15 Bull. Acad. Ivan Evstratiev Geshov, 1431 Sofia

RESULTS: In the build at the first stage Laboratory for the Study of the posture and locomotion at the Dept. of Physiotherapy at the Medical University - Sofia, a baropodometric trail was installed providing the opportunity to conduct basic biomechanical, kinesiological for healthy individuals and pathokinesiological examinations of patients. The spectrum of patients with diseases in the laboratory contains different conditions after injuries of the lower limbs, pelvis and spine; diseases of the musculoskeletal system and connective tissue; nervous system diseases (central and peripheral); diseases of the inner ear; cerebrovascular diseases; congenital abnormalities, deformations, and chromosome aberrations, etc. The used Ultrasensor 3D Platform hardware has the ability to apply postural (static) and dynamic research, and stabilometry. The platform is equipped with 7 sensors per square centimeter, which represents an XY resolution of 42.3dpi (or 6.5dpi). The Z-resolution is 16bit, the matrix calibration is 16bit, the maximum scanning frequency is 400fps, accuracy +/- 2%, maximum pressure 150N/cm², length 200cm and width 50cm. Precise digital measurements and analyzes give the opportunity for precise recording of symptoms, their reproducibility and comparability over time, which supports the scientific work in the clinics of orthopedics and traumatology, neurology, pediatrics, physical and rehabilitation medicine at the university hospitals of the MU-Sofia. Scientific forums and information meetings have been organized to promote the capacity of the laboratory not only in the medical environment but also with partners from other higher education institutions in Bulgaria. The REDCap data collection platform is organized. Through the joint activities of the Dept. of Physiotherapy and the Diasu Research Center, Rome, Italy, the team has the opportunity to participate in international projects. Improvement of the Physiotherapy students training quality at the MU-Sofia, has been done through practical exercises in the laboratory, as well as through updating of the curricula.

Scientific publications and presentations:

- Yanev S. Baropodmetry - opportunities for clinical physiotherapy. Announcements of the Union of Scientists in Bulgaria - Ruse. 2019;9(4)

- Yanev S, Andreev A. Equilibrium research after vermix removal - case report. Announcements of the Union of Scientists in Bulgaria - Ruse. 2019;9(4)
- Yanev S, Ivanova I, Kundurzhiev T. Static baropodometric analysis of the physiotherapy students at the Medical University - Sofia. Physiotherapy, 2019;1-2
- Koleva I. Rehabilitation of Grip and Walking (Collection of Lectures). Simel Press, Sofia, 2019
- Koleva I, Yoshinov R, Yoshinov B. Collection of tests in physical medicine, physical therapy and rehabilitation. Simel Press, Sofia, 2019

ИНДЕКС

- Аделина Цакова.... 135, 138, 147, 148, 149, 188
Адиле Акифова Мухтарова..... 213, 226
Адиле Мухтарова..... 92, 247
Адриана Бочева 47, 48
Адриана Георгиева Бакалова 77
Албена Кирилова Йорданова..... 66, 113
Албена Първанова Годорова-Георгиева..... 34, 97, 246
Албена Телчарова-Михайловска 189
Албена Годорова..... 39
Албена Годорова-Георгиева .. 86, 95, 135, 162, 227, 228, 245, 246, 251
Алберт Градев 100
Алекса Андонов 104
Александра Викторова Касабова-Ангелова 217, 230
Александра Касабова..... 70, 72, 80, 125
Александра Маринкова 254
Александра Савова 198
Александра Цветанова Савова..... 197
Александрина Влахова 59, 179
Александрина Воденичарова 207
Александър Борисов Златков..... 79, 124
Александър Георгиев Стойнев 53, 108
Александър Димитров Шинков 192
Александър Златков..... 75, 125, 127
Александър Илиев 51, 52
Александър Илиев Лилов..... 235
Александър Копчев..... 151
Александър Лилов 56, 88
Александър Стойнев..... 48, 103, 105
Александър Червеняков 87
Александър Шкондров 71, 116, 117, 120
Алексей Алексеев 245
Алексей Савов 156, 165, 261
Алексей Славков Савов..... 162
Альн Начев 90
Анастасиос Папагеоргиу 266
Анастасия Джамбазова..... 254
Анастасия Михайлова 146, 181
Ангел Арабаджиев 179
Ангел Дандов..... 46, 100
Ангел Николаев Арабаджиев..... 237
Ангела Гусийска 175
Ангелина Илиева Киселова-Янева 258
Ангелина Трифонова 93
Андон Тимчев..... 196
Андрей Иванов..... 46
Андрей Киров..... 34, 86, 95, 246
Андрей Чорбанов..... 57
Анелия Василева..... 43, 55, 271
Анелия Димитрова-Каменова 202
Анелия Зашева 254, 266
Ани Георгиева 74, 129
Ани Годорова 193, 255, 268
Анита Кавръкова..... 251
Анна Ганчева..... 196
Анна Димитрова 135, 147
Анна Костадинова 137
Антоанета Гатева 145, 149, 182, 261
Антоанета Димитрова 201, 206
Антоанета Костова..... 155
Антоанета Митева Млъчкова 174
Антоанета Младенова 179
Антоанета Терзиева 201, 206
Антоанета Трифонова Гатева 144
Антон Козаров..... 257, 270
Антон Койчев 59
Антон Тимчев..... 160
Антон Хинков 74, 129
Антония Йорданова Янакиева 207
Антония Исаева..... 43, 102, 180
Антония Трендафилова 207
Антония Янакиева 272
Анушка Димитрова..... 206
Асен Алексиев..... 156, 182, 261
Асен Недев 81
Асен Рачев Гудев 152
Асена Стоименова 200
Ася Костадинова..... 196
Атанас Йонков 140
Атанас Лукарски 125
Атанас Славов 254
Атанас Стефанов Йонков..... 143
Атанаска Величкова Миткова 56
Атанаска Георгиева 146, 181
Атанаска Еленкова..... 191
Атанаска Миткова 59, 60, 87, 88, 89, 90
Атанаска Петрова Еленкова..... 159
Бияна Георгиева..... 34, 39, 95, 245, 251
Бияна Георгиева Георгиева..... 39, 95, 251
Бияна Добрева 68, 69
Бисера Атанасова..... 202
Бисера Димитрова Атанасова 137

Богдан Петрунов	258	Велислава Методиева Коритарова	235
Божидар Йорданов	250	Величка Досева-Панова	174, 258
Божидарка Хаджиева	117	Венелин Петров	65
Бойка Георгиева Цветкова	125	Венера Добриянова	98
Бойка Милчева	191	Венера Николова	57
Бойко Коруков	262	Венета Петрова	246
Бойчо Василев Ланджов	51	Венцел Младеновски	59
Бойчо Ланджов	52	Венцислав Йорданов	136, 256
Борис Богов	263	Венцислава Пенчева-Генова	138
Борис Георгиев Стоилов	233	Вера Карамфилова	182, 261
Борис Гоцев Тенчов	253, 266	Вера Мегданова	246
Борис Кадинов	79	Вера Хаджимитова	67, 222
Борислав Георгиев Владимиров .	153, 186, 262	Вероника Йорданова Петкова	225
Борислав Маринов Маринов	163, 190	Весела Балабанова ..	68, 70, 118, 121, 122, 123, 256
Борислав Цанков	126, 128	Весела Балабанова-Бозушка ..	68, 69, 118, 121, 122, 123, 256
Борян Спасов	111	Весела Бисерова Вичева	122
Боряна Асенова	185	Весела Васкова Райкова	132, 169
Боряна Видева-Зидарова	197	Весела Вичева	114, 123, 124
Боряна Николова-Младенова	67, 75, 119	Весела Лозанова	55, 271
Боряна Симеонова	206	Весела Райкова	110, 251
Боряна Узунова	66	Весела Тодорова	143
Бушра Ал Хадра	171	Весела Узунова-Райкова	65
Валентин Карабелъов	111	Веселин Илинов	59
Валентин Лозанов	42, 251, 256	Виктор Димитров Славов	227
Валентин Мартинов Пенчев	215	Виктор Костов	79
Валентин Попов	178	Виктор Манолов	132, 167, 190, 248, 263
Валентин Стойчев Лозанов	55, 271	Виктор Славов	39
Валентина Атанасова	146	Виктория Искрова Михайлова	81
Валентина Любенова Пейчева	214	Вилма Пошева	115
Валентина Решкова	149	Виолета Димитрова .	43, 55, 102, 107, 139, 180
Валентина Хаджинешева	57	Виолета Костадинова	57
Ванина Михайлова-Алакиди	272	Виолина Стоянова	40, 111
Ваньо Митев	58	Виолина Тотева	123
Ваньо Иванов Митев	42, 102, 245	Вирджиния Йорданова Цанкова	126
Ваньо Митев ..	34, 39, 43, 56, 59, 60, 61, 66, 82, 85, 87, 88, 89, 90, 95, 97, 107, 112, 114, 133, 179, 212, 215, 216, 221, 224, 225, 227, 228, 246, 251, 253	Вирджиния Цанкова ..	70, 72, 79, 80, 114, 122, 124, 125, 128, 217
Ваня Масларска	73	Вирна Мария Циту	92
Ваня Милошева Юрукова	195	Вирна-Мария Циту	106
Ваня Юрукова	88	Вихрен Николаев Петков	210
Васил Димитров	134, 147	Владимир Василев	159, 194
Васил Димитров Димитров	134	Владимир Нейчев	59
Васил Маринов Павлов	179	Владимир Петрунов	170
Васил Павлов	59, 177	Владимир Толчков	130
Васил Хайкин	102, 180	Владислав Стоянов	139
Васил Яблански	142	Влайко Воденичаров	202
Велизар Шиваров	136, 171	Вяра Великова	176

Вяра Шумналиева-Иванова.....	150, 151, 180	Деница Димитрова.....	88, 195
Габриела Митев.....	75, 119	Деница Момекова	81
Габриела Славкова.....	60	Деница Руменова Кофинова	241
Галина Гергова	36	Десимира Миронова	49
Галина Добревска	49	Десислава Жекова.....	44
Галина Златанчева.....	148	Десислава Йорданова	154, 188
Галина Стамова Чанева	201	Десислава Костова-Левтерова	177
Галина Чанева	206	Десислава Цанова-Тошева	83
Галя Трайкова.....	204	Диана Димитрова.....	202
Генка Петрова-Ташкова	203	Диана Кьосева	59
Георги Ангов	263	Диана Петрова Попова	61, 98
Георги Богданов.....	62, 64, 109	Диана Стефанова-Петрова	133
Георги Велев.....	59	Диана Цанкова	127
Георги Галев.....	65	Диана Янева.....	173
Георги Георгиев	52, 158, 191, 192, 193, 255, 268	Диляна Грандева-Банкова.....	196
Георги Кирилов.....	159	Димитрина Желева-Димитрова	69, 70, 118, 122, 123, 124, 256
Георги Николов.....	258	Димитрина Живкова Желева-Димитрова...	68, 121
Георги Ставраков.....	114, 256	Димитрина Йорданова.....	206
Георги Тодоров	59, 177, 179	Димитринка Атанасова	46
Георги Тодоров Тодоров.....	59	Димитринка Атанасова-Димитрова	100
Георги Цветанов Момеков.....	75, 119	Димитринка Митева	140
Гергана Мизгова.....	100	Димитър Андонов Филчев	176
Гергана Петрова Стоянова	140	Димитър Бакалов	267
Гергана Станчева	56, 59, 60, 61, 87	Димитър Буланов.....	140, 178
Гергана Стоянова	142	Димитър Дечев.....	83
Гергана Христова.....	130	Димитър Иванов Буланов	178
Грета Ганчева Грозева-Дамянова	158	Димитър Конов	61
Грета Грозева-Дамянова.....	157, 193, 255, 268	Димитър Костадинов.....	56, 88, 240
Грета Чакърова.....	157	Димитър Кочев.....	47, 48, 104, 105
Давид Кънчев	272	Димитър Николаев Костурков.....	243
Даниел Йорданов	36	Димитър Тодоров Йовчев	171
Даниел Тодоров.....	129	Димо Кръстев	47
Даниела Авджиева-Тзавелла.....	241	Добрин Василев	58, 112, 145, 148
Даниела Дачева	59	Добрин Константинов	60
Даниела Милетиева	138	Добрин Свинаров.....	85, 154
Даниела Пенчева.....	60, 66, 87, 89, 90, 155	Добрин Цветкова.....	117
Даниела Пехливанова.....	51, 53, 108	Добринка Иванова	45
Даниела Стоичкова Петрова-Николова	138	Добромира Димитрова	96
Данка Петрова Обрешкова.....	117	Добромира Петкова	246
Дарвин Иванов	75	Доброслав Кюркчиев.....	185, 187, 239
Дарина Качакова	56, 61, 88, 89, 90, 98, 150, 151	Доброслав Станимиров Кюркчиев.....	184
Делян Жеков.....	271	Долорес Тодорова	84
Деляна Хаджиделева	201, 206	Дора Маринова.....	56, 88, 195
Денислав Емилов	172, 174	Драгомир Дарданов	140, 178
Десислава Недева	134, 147	Ева Ангелова	206
Деница Алуани.....	80, 114, 126, 128	Евгени Влаев	142

Евгени Живков	178	Здравка Тодорова.....	154, 188
Евгени Иванов	81	Здравко Асенов Каменов.....	145, 182, 261
Евгени Меков	56, 88	Здравко Каменов.....	144, 149
Евгений Възелов	263	Златимир Господинов Коларов	150
Евгений Юриев Харитов	65, 110	Златимир Коларов.....	130
Екатерина Иванова-Тодорова	84, 184	Златина Коканова-Недялкова	80
Екатерина Красиминова Куртева	239	Златина Ненчовска.....	46
Екатерина Куртева.....	184, 187	Златица Георгиева Петрова	208
Екатерина Николова	99	Зорница Михайлова.....	43, 82, 253
Елвира Никовска	272	Зорница Спасова-Миткова.....	197
Елвира Цолова.....	175	Зоя Васкова.....	148
Елена Ангелеска.....	65	Ибрям Ибрям.....	165
Елена Арабаджиева.....	140	Ива Вълкова	114, 124, 256
Елена Джамбазова.....	51	Ива Димитрова.....	52
Елена Желева.....	272	Ива Митева	204
Елена Кинова.....	231	Ива Петкова.....	102
Елена Петкова	134, 147	Ива Стоева.....	233
Елена Стефанова	62, 63	Ива Тодорова Петкова.....	179
Елизабета ди Блази	34	Ива Христова Стоева.....	155
Елина Петрова	119	Ивайло Димитров.....	81
Елисавета Йорданова Наумова.....	146, 181	Ивайло Еленков	160
Елисавета Милкова Стефанова.....	154	Ивайло Иванов	196, 271
Елисавета Милкова, Стефанова.....	188	Ивайло Иванов Еленков.....	196
Елисавета Наумова-Григорова	136	Ивайло Людмилов Търнев	86
Елисавета Петрова-Джеретто	208	Иван Алекснадров Лютаков	237
Елисавета Стефанова.....	155	Иван Веселинов Танев.....	183
Елица Георгиева Деливерска-Александрова	136, 172	Иван Гергов Митов.....	41, 99, 250
Елица Голкочева-Маркова	196	Иван Господинов Миланов.....	187
Елица Деливерска-Александрова.....	171	Иван Димитров Димитров	135
Елка Николаева Радева.....	83	Иван Лютаков.....	185
Елка Попова.....	44	Иван Митов ...	37, 45, 92, 93, 96, 132, 169, 247, 260
Емануил Найденов	184	Иван Павлов	136
Емил Влайков Воденичаров.....	202	Иван Попов.....	56, 59
Емил Димитров Паскалев	85	Иван Поромански	145
Емил Начев	159	Иван Танев.....	102, 180, 233, 234
Емилия Карова	268	Иван Щърбанов.....	60
Емилия Чернева	77	Иванка Димова.....	39, 90
Емма Кьолеян	45	Иванка Иванова Костадинова.....	219
Енрико Медури	40	Иванка Исталианова Димова	99
Енчо Савов.....	37	Иванка Костадинова	114
Жасмина Миланова.....	246	Иванка Милотинова.....	206
Женя Стефанова.....	109	Иванка Петкова Пенчева-Ел Тиби	73
Живка Цочева Карагъзова	165	Иванка Петрова-Дойчева	81
Жоржета Стоянова Бочева	64	Иванка Стамболова.....	206
Жулиета Геренова.....	272	Иванка Станчева	143
Жулиета Христова-Димитрова ...	178, 179, 195	Ивелина Железова	78
Зафер Сабит	104, 105	Ивелина Химчева.....	47

Ивет Колева-Йошинова	272	Костантин Гроздев.....	59
Иво Кременски	90	Красимира Йончева	126
Иво Сираков	37, 41, 93, 99, 106	Красимира Казакова	154
Иглика Йорданова.....	95, 97, 245	Красимира Павлова Йончева	67, 128
Илиана Атанасова	159	Красимира Симеонова Якимова.....	34
Илиана Илиева Йонкова.....	66, 115	Красимира Якимова.....	224
Илиана Йонкова	116, 120	Кремена Стойчева Месечкова	228
Илиана Соколова.....	206	Кристина Белчева	79
Илина Манова	116, 120	Кристина Попова	207
Илина Николаева Кръстева.....	71	Кристиян Герасимов.....	201
Илина Николаева Манова	116	Лазар Митров	54
Илия Фидошев.....	59, 177	Лаура Стефанова Андреева-Гургуриева....	170
Илияна Борисова.....	157, 193, 255, 268	Лена Петрова Сечанова.....	106
Инна Иванова	272	Лидия Кортенска.....	100
Йоанна Александрова Матрозова.....	194	Лидия Христова	204
Йоанна Матрозова.....	159	Лили Пейкова	75, 119, 127
Йоаннис Папатансиу.....	272	Лилия Витанова	44
Йордан Гълъбов	259	Лилия Владимирова.....	112
Йордан Йорданов	126, 128	Лилия Димитрова.....	124
Ирен Петрова-Иванова	263	Лилия Симонова	140, 178
Ирена Иванова.....	137, 202, 261	Лина Георгиева Малинова	52
Ирена Петкова Костова	72	Лина Малинова	51, 64
Ирина Александрова.....	42, 99	Лъчезар Динчов Трайков	167
Ирина Лазарова	256	Лъчезар Петков	136, 171
Ирина Николова.....	219, 229	Лъчезар Трайков	66, 113, 248, 263, 267
Ирина Ценова	268	Любина Тодорова	38
Ирина Чакърова.....	57	Любка Танчева	253
Ирини Атанас Дойчинова	114, 256	Любомила Димитрова	38
Ирини Атанас Дойчинова-Цекова.....	114	Любомир Асенов Дурмишев	86, 131
Ирини Дойчинова	68, 124, 135	Любомир Маринов	74, 129
Калина Каменова	49, 63, 64, 109	Любомир Стефанов	130
Калина Михова....	56, 61, 66, 85, 87, 89, 90, 96, 98, 106, 113, 155, 247, 260	Любомир Трайков.....	253, 266
Калина Николова-Ганева	57	Любомир Трифонов Маринов	219, 229
Калина Гумангелова-Юзеир	84, 184	Людмила Боянова Георгиева	36
Калина Шишкова	74, 129	Людмила Владимирова	156, 182, 261
Камелия Богданова	206	Людмила Георгиева.....	260
Камен Коцилков.....	173	Людмила Янкова.....	47, 48, 105
Камен Пирински	59	Люси Стефанова	121
Камен Цачев	133, 167, 248, 263	Магдалена Димитрова	99
Карела Майнхард	90	Магдалена Кондева-Бурдина70, 71, 72, 79, 80, 116, 120, 124, 125, 126, 127, 217, 230, 311	
Каролина Любомирова	204	Магдалена Лесева	260
Катерина Кавалджиева	57	Майя Маркова	57
Кирил Любенов Найденов	58	Маноела Манова-Овчарова.....	197
Кирил Петров	53	Манол Соколов	59
Константин Василев Митов.....	200	Маргарита Ганева	189
Константин Митов.....	202	Маргарита Каменова	60
Костадин Ангелов.....	59, 237	Маргарита Райчева	66, 113

Мариана Мурджева.....	260	Миглена Кирилова-Донева	198, 200
Мариана Янкова	250	Миглена Копринарова.....	39
Мариела Василева.....	59	Мила Василева Власковска.....	38
Мариела Василева-Славева.....	177, 179	Мила Ковачева-Славова.....	153, 186, 262
Мариела Величкова	89	Мила Цанкова	263
Мариела Христова-Савова	99	Милен Венциславов Димитров	77
Мариела Янева-Деливерска	259, 272	Милен Христов	34, 224
Мариета Караджова	263	Милена Георгиева Велизарова	132
Марина Александрова	160	Милена Иванова-Шиварова.....	181
Марина Борисова	187	Милена Николова-Влахова.....	185
Марина Митева	253	Милена Табанска-Петкова	204
Марина Самунева.....	204	Милена Четирска	185
Марио Борисов.....	68, 69	Милена Шиварова	136, 171
Мария Бояджиева.....	107, 156, 157, 158, 255	Милена Янчева-Стойчева	204
Мария Бояджиева-Владиминова.....	107, 156, 157, 158	Милослава Илиева.....	206
Мария Василева	197	Мимоза Цветкова.....	47, 48, 104, 105
Мария Гичева-Еленкова	107	Мина Сердарова.....	193, 255, 268
Мария Глушкова	95, 162	Мирена Ценова	257
Мария Димитрова	43, 198, 200, 201, 206	Мирослав Михайлов.....	88, 195
Мария Димитрова Драгнева.....	43	Мирослава Варадинова	62
Мария Динкова.....	100	Мирослава Георгиева Варадинова	62, 109
Мария Драгнева	55, 253	Михаела Младенова	135
Мария Камушева.....	200, 203	Михаил Боянов.....	232
Мария Николова.....	130, 160, 259, 263	Момчил Ризов	99
Мария Петрова	66, 113, 167, 248, 263, 267	Моника Шумкова.....	112
Мария Средкова	45	Мохамед Хаят	59
Мария Стаевска-Коташева.....	134	Надежда Милчева	182, 261
Мария Стефанова Камушева	198	Надежда Митова	257, 270
Мария Стойнова.....	192	Надежда Янева	261
Мария Тончева Стаевска-Коташева.....	147	Надка Бояджиева	49, 62, 109
Мария Христова	86, 127, 131	Надка Василева	201, 206
Мария Цанева Глушкова	212, 221	Надка Иванова Бояджиева	62
Марта Балева	185	Надя Георгиева Христова-Авакумова	222
Мартин Мариянов.....	170	Надя Манова.....	272
Мартин Младенов	87	Надя Манолова.....	206
Мартина Худякова.....	204	Надя Христова-Авакумова.....	67
Мая Белитова-Желязкова	262	Наталия Грънчарова	82
Мая Боянова Георгиева	127	Наталия Николаева Габровска.....	240
Мая Георгиева	75, 79, 119, 124, 125, 357	Наталия Тръпчевска	99
Мая Захариева	73	Невена Цачева-Христова.....	204
Мая Кичева	174	Невена Чакърлова	157, 158, 255, 268
Мая Константинова	155	Невена Янкова Чакърлова.....	157, 193
Мая Ляпина.....	258	Нези Низамова	266
Мая Рашева Рашкова	270	Нели Георгиева Николова.....	231
Мая Рашкова.....	257	Нели Дилкова	170
Мери Америкова	73	Нико Бенбасат	121
Миглена Георгиева Кирилова-Донева	203	Нико Йосиф Бенбасат.....	129
		Никол Христова	38

Николай Василев.....	40	Полина Димитрова	100
Николай Горанов.....	59	Радина Иванова-Боянова.....	182, 261
Николай Дамянов Данчев	74, 120	Радина Стефанова Иванова-Боянова	156
Николай Данчев	126, 197, 219, 229	Радка Кънева .	56, 58, 59, 61, 66, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 96, 98, 107, 113, 131, 150, 151, 155, 189, 214, 216, 224, 225, 247, 260
Николай Димитров Ишкитиев	253	Радка Петрова Кънева	60, 112
Николай Еленков Лазаров.....	46, 100	Радка Тафраджийска	40, 47, 48, 103, 105
Николай Ишкитиев	43, 82	Радка Тафраджийска-Хаджиолова.....	40
Николай Кълвачев.....	169	Радомир Угринов	136, 171
Николай Кътев	59	Радосвета Иванова Василева	175, 268
Николай Ламбов.....	67, 128	Радослав Байкушев	132, 169, 251
Нина Белова.....	222	Радослав Билюков.....	138
Нина Янчева-Петрова	160	Радослав Клисуров	62
Ния Петрова.....	177	Радослава Грозданова.....	130, 259, 263
Ния Сърбянова	87	Радослава Саръева	85, 86, 155
Огнян Георгиев	133, 138	Радослава Црънчева.....	133
Олга Белчева.....	60, 102	Радост Великова.....	176
Олга Богданова.....	60	Райна Гергова	175, 213, 226, 260
Олга Живанова Белчева.....	107	Райна Цветанова Гергова	92, 247
Олег Георгиев Чолаков.....	87	Ралица Валентинова Мекова	232
Павел Кирилов Станимиров	82	Ралица Герасимова	206
Павлина Гатева.....	38, 40, 111	Ралица Живкова	57
Павлинка Попова	66, 115, 116	Ралица Иванова	192
Параскев Недялков	68, 118, 218	Ралица Николаева Робева	156, 191
Параскев Тодоров Недялков	80	Ралица Попова-Илинкина	41, 100
Паулина Сугарева	271	Ралица Робева.....	162
Пенка Илиева Переновска.....	142	Рашо Колев Рашков	149
Пенка Переновска	141	Рашо Рашков	151
Пепа Бикова-Иванова	201	Рая Иванова	182, 261
Пепа Рашкова Бикова-Иванова.....	206	Рая Стефанова Иванова.....	148
Петра Василева.....	48	Раяна Динкова	118, 257
Петранка Здравева	71, 116	Рене Димитрова Милева-Попова	222
Петранка Крумова Здравева.....	116	Ренета Гевренова	68, 70, 118, 121, 122, 123
Петър Ангелов.....	65	Ренета Димитрова	196
Петър Арnaudов	78, 122	Ренета Славова Гевренова	69, 256
Петър Грибнев.....	59, 177	Ренета Тошкова.....	74, 129
Петър Желязков	167, 263	Рени Цвеова.....	58, 85, 98, 107, 112
Петър Калайджиев	152	Розалия Димитрова.....	183
Петър Петров.....	83	Розалия Христова Димитрова.....	233
Петя Ангелова	74, 129	Розалия Циканделова	43, 82, 253
Петя Генова-Калу.....	163	Роман Емилов Ташев.....	48, 104
Петя Кантарева.....	206	Роман Ташев.....	47, 103, 253
Петя Купенова	44	Росен Петков	88
Петя Маркова	54	Росен Русев.....	194
Петя Станкова	96, 260	Росица Вачева-Добревска	185
Петя Янкова	181	Росица Дачева	151, 185
Пламен Дунев.....	148	Росица Димова	45
Пламен Иванов Пенчев	185		
Пламен Пенчев.....	238		

Росица Методиева.....	49, 62, 63, 109	Силвия Волева.....	163, 190
Ружа Николова	204	Силвия Въндева	159, 194
Румен Георгиев Димитров	90	Силвия Начева.....	145
Румен Малинов Стоилов.....	151	Силвия Петкова.....	84
Румен Николов	34	Силвия Русева	256
Румен Павлов Николов.....	92	Силвия Савова.....	210
Румяна Батова.....	164	Симеон Валентинов Монов	150, 185
Румяна Благоева.....	81	Симеон Монов.....	151
Румяна Григорова	79	Слава Джонева	202
Румяна Димова-Драганова .	157, 158, 193, 255, 268	Славейка Панева	210
Румяна Додова.....	59, 89, 90	Славена Цанева	97
Румяна Донкова Марковска-Давидкова	45, 96, 260	Славина Кирилова Сурчева	40, 111
Румяна Койнова	266	Славина Сурчева.....	38
Румяна Къдрева.....	148	Славяна Славчева Ушева	242
Румяна Любомирова Симеонова	70, 123	Славяна Ушева	89, 179
Румяна Марковска	36, 247	Снежина Кандиларова.....	146
Румяна Марковска-Давидкова	36	Снежина Лазова	140, 142
Румяна Митрева	53	Соня Драгнева	137
Румяна Симеонова	71, 114, 120, 122, 124	Соня Иванова	34, 63
Румяна Търновска-Къдрева.....	58	Соня Калинова	40
Румяна Цонева.....	111	Спас Керимов	63
Русанка Ковачева	192	Спаска Лесичкова	140
Руска Шумналиева.....	150, 151, 185	Спиридон Тодоров.....	215
Савина Петрова Хаджидекова	248, 263	Спиро Константинов	77
Савина Тинчева	95	Стайко Сарафов	86
Самиа-Надин Катибова	143	Стаматиос Прифтис	142
Сашка Райчева.....	90	Станислав Йорданов.....	61
Сашо Бонев.....	140	Станислав Рангелов	81
Светла Ангелова.....	163	Станислав Сотиров	118
Светла Данова	39	Станислава Владимирова.....	127
Светлана Христова.....	59	Станислава Керемидчиева-Христова.....	262
Светлин Георгиев.....	272	Станчо Станчев	51
Светослав Димов.....	37, 93	Стела Захаринова.....	254, 266
Светослав Тошев.....	59	Стелиана Ташкова	253
Свилен Иванов Маслянков.....	177	Стефан Балкански.....	72
Свилен Масляков	179	Стефан Великов	210
Свилен Маслянков	59	Стефан Недев Стефанов.....	189
Севдалин Начев.....	184	Стефан Недков Янев.....	272
Семра Мустафа.....	191	Стефка Георгиева.....	206
Силва Гаро Гирагосян	216, 224	Стефка Иванова.....	117, 163, 190
Силва Гирагосян	61, 87, 88	Стефка Методиева Делимитрева.....	57
Силви Георгиев	235	Стоимен Иванов.....	165
Силви Любчов Георгиев.....	164	Стоян Иванов Димитров	215
Силви Митова-Симинкович.....	153, 186	Стоян Шишков	74, 129
Силвия Абарова	253, 266	Страхил Берков	108
Силвия Андонова-Бъклова.....	156, 162	Събина Митова	46, 100
		Таня Ангелова	206
		Таня Василева Стратева.....	37, 93

Таня Кадийска	135	Христо Стоянов.....	136, 171
Таня Петкова	137	Христо Шивачев	60
Таня Попова.....	206	Цанко Мондешки	138
Таня Стефанова	109	Цветалина Иванова Танкова	255, 268
Таня Стратева.....	41, 140	Цветалина Танкова	193
Татяна Петрова Пенкова-Червенякова	160	Цветан Велинов.....	45
Теменуга Стоева.....	37, 45, 96, 260	Цветан Гатев.....	145
Тенчо Тенев	196	Цветелин Луканов.....	146, 171, 181
Теодора Атанасова.....	78	Цветелина Великова	84, 144, 145, 182, 184, 187
Теодора Николаева Болярова-Конова ..	84, 130	Цветелина Маринова	157
Теодора Попова.....	77	Цветелина Спиридонова	89
Теодора Светославова Ханджиева-Дърленска	49	Цветослав Георгиев	151, 266
Теодора Янева-Сиракова.....	58, 112, 148	Ценка Бонева	148
Геофил Ангелов Седлоев	89	Цонка Иванова	204
Геофил Седлоев	179, 242	Цонко Узунев	243
Тихомир Диков.....	59, 143	Шима Мехрабиан-Спасова	66, 113
Тихомир Петков	143	Юлиан Войников .	40, 68, 69, 74, 111, 121, 129
Тихомир Тодоров.....	95, 162	Юлиан Тенчев Войников	118
Тодор Димитров	272	Юлия Мартева-Проевска	37
Тодор Киров	46, 100	Юлия Петрова	145, 167, 263
Тодор Кундурджиев.....	181, 272	Юри Пенков Няголов	54
Тодор Кундурджиев.....	204	Юсеф Султан.....	125
Тодор Кунчев.....	167, 263, 267	Явор Асьов	145
Тодор Попов	61	Явор Желев.....	167
Тодор Гороманов	48, 105	Явор Митков.....	79, 125
Фани Мартинова	159	Явор Николов	89
Фанка Рибарова	210	Яна Емилова Илиева.....	218
Филип Куманов	156	Яна Здравкова	130
Христиана Величкова	81	Яна Кръстева	146
Христина Ангелова.....	51	Яна Христова.....	107
Христина Лазарова Попова.....	173, 257	Яна Чекаларова	40, 46, 100, 108, 111
Христина Михайлова.....	84	Яни Здравков.....	183
Христина Ночева.....	48, 105	Янина Георгиева Славова-Маринова	88
Христина Попова	174	Янина Славова-Маринова	56, 235
Христина Рафаилова.....	142	Яница Русенова	78, 121
Христина Христова Ночева-Димитрова	47, 103	Янка Петкова Проданова	204
Христо Василев	66	Янчо Зарев	115
Христо Даскалов	41	Ясен Христов.....	271
Христо Найденски	73		