



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ**

**MEDICAL UNIVERSITY - SOFIA**

# **СБОРНИК**

**Резюмета на изследователски проекти**

**2018-2019**

**Бюджетно финансирани проекти на**

**медицински научни изследвания**

**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 научната дейност 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. Доц. Радка Кънева, дб
9. Емилия Николова
10. Кристиан Пройчев

**Секретар:**

Натали Димитрова

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ</b>	<b>„ГРАНТ’ 2018”</b>	<b>31</b>
Договор 53/2018	Молекулярно генетично проучване на щамове <i>Clostridium difficile</i> изолирани от безсимптомни пациенти и състояние на антибиотичната резистентност	31
Договор 54/2018	Проучване на механизмите на хромозомна и плазмидна хинолонова резистентност при цефалоспорин трета генерация и/или карбапенем резистентни клинично-значими изолати <i>Klebsiella spp</i> в университетска болница “Света Марина” Варна	32
Договор 55/2018	Хаплотипен анализ за изследване на скаченост на някои мутации в CLCN1 гена при пациенти с миотония конгенита тип Бекер	33
Договор 56/2018	Молекулни механизми на мутагенеза при български пациенти със синдром на Ангелман	33
Договор 57/2018	Микробиологични и генетични проучвания върху антибиотичната резистентност при <i>Streptococcus pyogenes</i> и други бета-хемолитични стрептококи	35
Договор 58/2018	Участие на ГАМК <sub>A</sub> и ГАМК <sub>C</sub> рецепторите в генерирането на осцилаторните потенциали в ON- и OFF-отговора на електроретинограмата	36
Договор 59/2018	Новогенерационно секвениране на прицелни гени за идентификация на генетични мутации при български пациенти с фамилни форми на хематурия	37
Договор 60/2018	Високорезолутивен геномен скрининг за небалансирани геномни изменения на преходноклетъчните карциноми на пикочния мехур	38
Договор 61/2018	Роля на канабиноидната и серотонинергичната невротрансмитерни системи върху ноцицепцията, предизвикана от топлинен стрес при плъх	39
Договор 62/2018	miRNA предиктивен профил за оценка на риска от сърдечно-съдови усложнения при захарен диабет тип 2	40
Договор 64/2018	Как вроденият системен лупус при мишки влияе на качеството на овоцитната мейоза – експериментален миши модел за изследване на яйцеклетки, добити след хормонална стимулация, и такива, подложени на <i>in vitro</i> зреене	41
Договор 65/2018	Изследване на характерни за овогенезата преобразувания на хроматина – хроматидна кохезия и кондензация, съпоставени с ДНК-метиране, при <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> зреещи миши овоцити	42
Договор 66/2018	Проучване ефектите на селективния мелатонинергичен препарат агомелатин върху възпалителните процеси и морфологични промени в мозъчни структури при модел на Болестта на Алцхаймер у мъжки плъхове	43

Договор 67/2018	Изследване на влиянието на мезембринови алкалоиди върху поведенчески и ендокринни изменения при остър и хроничен имобилизационен стрес у плъхове.....	44
Договор 68/2018	Ролята на възпалението, оксидативния и хемодинамичния стрес за развитието на пулмонална хипертония при пациенти с ХОББ .....	45
Договор 69/2018	Изследване на комбинираното прилагане на Escitalopram и кетогенна диета върху показатели за депресивност и невровъзпаление при експериментални модели на стрес и депресия .....	47
Договор 70/2018	Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия .....	48
Договор 71/2018	Проучване ролята на гени, свързани с фамилни ракови синдроми върху развитието на множествени първични тумори.....	49
Договор 72/2018	Промоторно хиперметиране на тумор супресорни гени при пациенти с рак на гърдата .....	50
Договор 73/2018	Генетични фактори и клинични характеристики на съдовите усложнения при български пациенти със захарен диабет тип 2.....	51
Договор 74/2018	Аналитично охарактеризиране на лекарствени продукти прилагани при лечение на заболявания на гастроентерологичния тракт – инхибитори на протонната помпа в комбинации с антиинфекциозни средства .....	52
Договор 75/2018	Фенолни съединения от метанолния екстракт на <i>Hypericum cerastoides</i> (Sprach) N. Robson. – структурно охарактеризиране и изпитване за антиоксидантна, анти- $\alpha$ -амилазна, анти- $\alpha$ -глюкозидазна и антилипазна активност .....	53
Договор 76/2018	Сапонин-медирано потенциране на цитотоксичността на етопозид върху лимфомна клетъчна линия.....	54
Договор 77/2018	Синтез, сруктурно охарактеризиране, антимикобактериална активност и токсичност на нови индолови производни. Определяне химичната им стабилност чрез HPLC метод.....	55
Договор 78/2018	<i>In vitro</i> изследване на стабилността и антиоксидантните свойства на новосинтезирани Ga(III) и Pr(III) комплекси на биологично активни урацили.....	56
Договор 79/2018	<i>In vitro</i> оценка възможната невропротективна активност при модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес в изолирани синаптозоми и ефект върху контрактилитета на мозъчни кръвоносни съдове на алцесефолизид и мауритианин, изолирани от надземната <i>Astragalus monspessulanus spp. monspessulanus</i> .....	57
Договор 80/2018	Проучване влиянието на модифицирани хранителни среди върху индекса на растеж и продукцията на флавоноиди в <i>in vitro</i> култури от застрашения таксон <i>Gypsophila trichotoma</i> Wend. ....	58
Договор 81/2018	Високорезолюционен фитохимичен скрининг за редки биологично активни вещества в представители от род <i>Astragalus</i> L. (Fabaceae) .....	59

Договор 82/2018	Фармакологично проучване на тлъсто масло от семена на <i>Nigella sativa</i> върху експериментално индуциран колит при мишки .....	59
Договор 83/2018	Разработване на RP- HPLC метод за разделяне на геометрични изомери на новосинтезирани пиролови и ксантинови съединения .....	61
Договор 84/2018	Проучване на възможностите за приложение на 3D принтиране, чрез екструзия във фармацевтичната практика.....	61
Договор 85/2018	Биосинтез на трополонов тип алкалоиди в <i>in vitro</i> култури на <i>Gloriosa superba</i> L. (Colchicaceae) .....	62
Договор 87/2018	Значимост на слюнчените показатели – високо чувствителен C-реактивен протеин, креатин киназа MB-mass, тропонин I за диагностика на остър миокарден инфаркт при пациенти с хроничен пародонтит .....	63
Договор 88/2018	Промени в кореноканалния дентин при въздействие с високоенергиен диоден лазер (ин-витро изследване).....	64
Договор 89/2018	Влияние на интраканални медикаменти върху ендодонтски биофилм (ин витро изследване) .....	65
Договор 93/2018	Биомиметична реминерализация при експериментален модел на емайлов кариес .....	66
Договор 109/2018	Идентифициране на генни мутации, водещи до дегенерация на ретината при български пациенти чрез новогенерационно секвениране на прицелни гени .....	67
Договор 115/2018	Анализ за промоторно хиперметиране на тумор супресорни гени при овариален карцином .....	68
<b>МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „ГРАНТ’ 2019” .....</b>		<b>70</b>
Договор 55/2019	Сравнително изследване на ефектите на суррохептадине, асенарпине, програнолол и diazepam върху серотонинова токсичност у плъхове .....	70
Договор 56/2019	Участие на ендотелни фактори в регулацията на артериалното налягане при хипертония .....	71
Договор 58/2019	Молекулярно-генетични характеристики на заболяването Комплекс туберозна склероза (TSC) в България .....	71
Договор 59/2019	Проучване на герминативни мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените, като рискови фактори за развитие на простатен карцином и асоциация с агресивно клинично поведение .....	72
Договор 61/2019	Фармакологично проучване на ефекти на ноцицептинов аналог в експериментален модел на невровъзпаление .....	73
Договор 62/2019	Роля на арилхидрокарбоновите рецептори за невробиологичната активност на нови индолнови производни с ароилхидразонов фрагмент .....	74

Договор 63/2019	Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху образуването на биофилм от клинични изолати <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	75
Договор 64/2019	Проучване на чувствителността на <i>Helicobacter pylori</i> към флуорохинолони	76
Договор 66/2019	Оценка на генетичния риск за сърдечно-съдови усложнения при пациенти с диабет тип 2 чрез ново-генерационно секвениране .....	77
Договор 67/2019	Значение на катионния канал, активиран от хиперполяризация, за ретиналната функция: електроретинографско изследване .....	78
Договор 68/2019	Взаимодействие между ендогенната канабиноидна и адренергичната невромедиаторни системи в патогенезата на студовия стрес.....	79
Договор 69/2019	Социални взаимодействия, обучение и пространствена памет у млади плъхове при хроничен социален стрес: ефекти на мезембринови алкалоиди .....	80
Договор 70/2019	Анализ на соматични мутации в първични тумори с различна локализация на пациенти с множествена първична неоплазия .....	81
Договор 71/2019	Проучване на чувствителността към нови антимикробни средства при полирезистентни изолати <i>Klebsiella pneumoniae</i> и на механизмите на резистентността им към колистин .....	82
Договор 73/2019	Генетични фактори обуславящи промени в нормалната функция на системата на комплемента и свързани с тях бъбречни увреждания .....	83
Договор 74/2019	Микробиологични, молекулярно-биологични и епидемиологични проучвания върху <i>Lactococcus garvieae</i> – нов патогенен причинител на локални и системни инфекции .....	84
Договор 75/2019	UHPLC-HRMS охарактеризиране на корените от <i>Chenopodium bonus-henricus</i> L. за съдържание на сапонини, екдистероиди и флавоноиди и изпитване на главните компоненти за наличие на анти- $\alpha$ -амилазна, анти- $\alpha$ -глюкозидазна и антилипазна активност....	85
Договор 76/2019	Разработване на ефективен метод за изолиране на мауритианин от растителни източници и <i>in vivo</i> изследване за протективна активност .....	86
Договор 77/2019	Експериментално и числено изследване на супернасищащи наноразмерни лекарство-доставящи системи на основата на поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид) дихидрофилни съполимери за повишен мембранен транспорт на малкоразтворими лекарствени вещества .....	87
Договор 78/ 2019	Виртуален скрининг на бази данни природни продукти с афинитет към ацетилхолинестеразата .....	88
Договор 79/2019	Етерични масла от инвазивни, чуждоземни растителни видове - неизчерпаем евтин ресурс за фармацевтичната практика.....	88
Договор 80/2019	Разработване на подходи за стимулиране продукцията на полифеноли в ин витро клетъчни системи от <i>Astragalus glycyphyllos</i> L.....	89



Договор 81/2019	Изследване на метаболитите на Metamizole (4-Methylaminoantipyrine; 4-aminoantipyrine; 4-Formyl-aminoantipyrine; 4-acetylaminoantipyrine) за <i>in vitro</i> антитуморна/антипролиферативна активност в експериментални моделни системи.....	90
Договор 82/2019	Имунохистохимично изследване на демиелинизацията на corpus callosum при модел на множествена склероза на мишки, третирани с производни на 4-аминопиридина	91
Договор 83/2019	Дизайн, оценка на лекарственото подобие и синтез на нови хидроксизаместени хидразони с потенциална цитотоксична активност .....	92
Договор 84/2019	Синтез, изследване и проучване на цитотоксичната и ксантин оксидазна активност на нови метални комплекси с N,O,S съдържащи органични лиганди.....	93
Договор 85/2019	<i>In silico</i> и <i>in vitro</i> изследване на ксантинови производни, проявяващи MAOB инхибиторна активност .....	94
Договор 89/2019	Компютърно рентгеново микротомографско изследване на адаптацията на композитни инлеи към твърдите зъбни тъкани, изработени по три различни метода.....	95
Договор 90/2019	Изследване на микротвърдост и грапавост на дентиновия матрикс след въздействие с иригационни разтвори.....	96
Договор 94/2019	Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Изследване на генетичен полиморфизъм на FcyRIIIA и изследване на анти-цитрулинирани протеинови антители в слюнка .....	97
Договор 99/2019	Проучване на ролята на субкласовете на ИгГ в поствакциналния имунен отговор към полизахаридни и протеинови антигени в българската популация.....	98
Договор 104/2019	Изследване на полиморфизмите rs2279115 и rs956572 в <i>Bcl2</i> гена като фактор за развитието на дерматомиозит у възрастни .....	99
Договор 116/2019	Генетичен анализ за мутации на гена UMOD за доказване на автозомна доминантна тубуло интерстициална бъбречна болест .....	100
Договор 148/2019	Молекулярно-генетичен анализ за носителство на мутации в <i>TERT</i> , <i>BRAF</i> и <i>NRAS</i> гените при пациенти с папиларен щитовиден карцином .....	100
<b>МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ "ГРАНТ' 2018" .....</b>		<b>102</b>
Договор 52/2018	Проучване на корелационната зависимост между показатели за обмяната на желязо и IMT при пациенти със сънна апнея .....	102
Договор 63/2018	Статус на микроелементи и витамин Д при бременни жени с гестационен захарен диабет .....	103
Договор 86/2018	Провизорите като протетичен инструмент за управление на меките тъкани около дентални импланти.....	105
Договор 90/2018	Създаване на протокол за оценка на екстраорален статус на ортодонтски пациенти по фотографски анализ и база данни за ортодонтски архив .....	106

Договор 91/2018	Епидемиология на деформациите и оценка на различията в ортодонтските подходи на проведените лечения от студенти и специализанти във ФДМ – София за период от 5 години .....	107
Договор 92/2018	Създаване на софтуерен продукт за дигитален анализ на данните при работа с лицева дъга „Face bow Mini-Maxi” .....	108
Договор 103/2018	Маркери на костната обмяна и сърдечно-съдови рискови фактори при синдром на поликистозните яйчници .....	109
Договор 104/2018	Серологични и молекулярно-генетични проучвания върху участието на хепатит Е вируса в патогенезата на неврологични заболявания .....	110
Договор 105/2018	Органокини при мъже с късен хипогонадизъм и метаболитен синдром... ..	111
Договор 106/2018	Назофарингеален микробиом при деца с хронични белодробни заболявания .....	112
Договор 107/2018	Динамичната картина на респираторните пневмококови инфекции при деца след въвеждане на рутинна пневмококова ваксинация в България .....	113
Договор 108/2018	Хормонален статус и нарушение в костния метаболизъм при пациенти с обструктивна сънна апнея и метаболитен синдром и ефект от лечението с неинвазивна вентилация .....	114
Договор 110/2018	Радиационни поражения на гастроинтестиналния тракт след лъчелечение- оценка на тежестта на заболяването и дефиниране на терапевтичен подход.....	116
Договор 111/2018	Количествено определяне на исхемично-модифициран албумин в серум и проучване значението му като диагностичен и прогностичен биомаркер при пациенти с транзиторна исхемична атака (ТИА) и хеморагичен/исхемичен мозъчен инсулт .....	117
Договор 112/2018	Качество на живот, обезитет и метаболитен синдром в контекста на хроничното субклинично възпаление.....	118
Договор 113/2018	Оценка на връзката между островноклетъчните, тиреоидните и трансклутаминазните антитела при захарен диабет тип 1 .....	119
Договор 114/2018	Антивирусен имунен отговор при деца с вирус-индуцирани бронхообструктивни прояви .....	120
<b>МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „ГРАНТ’ 2019” .....</b>		<b>121</b>
Договор 57/2019	Валидиране на имунологичен метод за определяне на еритроферон в серум и определяне на референтните граници на показателя за Българската популация .....	121
Договор 65/2019	Приложение на молекулярно-генетични техники в диагностичния алгоритъм при негонококов уретрит .....	122

Договор 72/2019	Ендогодишно пилотно проучване за честотата на установяване на EGFR мутационен статус от бронхоалвеоларен лаваж при пациенти с първичен белодробен аденокарцином сравнена с течна биопсия от периферна венозна кръв и тъканна биопсия.....	123
Договор 86/2019	Микроинвазивен и антимикробен ефект на средства за химио-механична екскавация при кариес на временни зъби .....	124
Договор 88/2019	Дезинфекция на ендодонтското пространство при зъби с незавършено кореново развитие.....	125
Договор 91/2019	Триизмерно принтирани шини за профилактика на бруксизъм – експериментално и клинично изследване .....	126
Договор 92/2019	Значимост между присъствие на генен полиморфизъм на IL- 17F и тежест на пародонтита .....	127
Договор 93/2019	Диагностика и микроинвазивен дентален подход при пациенти с артропатии, вследствие на краниомандибуларни дисфункции .....	128
Договор 95/2019	Профилактика на зъбния кариес при деца от 6 до 12 години чрез повлияване на хранителните им навици .....	129
Договор 96/2019	Оценка на риска от развитие на зъбен кариес при пациенти на възраст от 19 до 64 години с Cariogram®.....	130
Договор 100/2019	Изследване на експресията на апоптотичния фактор Caspase-3 в човешки първични епителни клетки от изолирани интраоперативно и третирани с trypan blue предни лещени капсули от пациенти с възрастово обусловена и диабет тип II индуцирана катаракта..	131
Договор 101/2019	Ролята на витамин D в развитието на късогледството .....	132
Договор 102/2019	Роля на ендоканабиноидната система в метаболитните и хормоналните нарушения при синдром на поликистозните яйчници.....	133
Договор 103/2019	Оценка на регенеративните процеси в базалния нервен плексус след трансплантация на лимбални стволови клетки и амниотична мембрана чрез Cochet-Bonnet естезиометрия и оптична кохерентна томография.....	134
Договор 105/2019	Мониториране на тъканната оксигенация при тежък сепсис и хиповолемия . .....	135
Договор 106/2019	Изясняване ролята на интраваскуларния ултразвук (IVUS) в оценката на дегенеративни заболявания на аортата .....	136
Договор 107/2019	Най-чести микробиологични причинители на остър гноен отит и усложненията му, след приложението на 10 валентната пневмококова конюгирана ваксина ..	137
Договор 108/2019	Измерване на серумните нива на 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) при пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата, микроскопски колит и синдром на дразним ото черво .....	138

Договор 109/2019	Създаване на биобанка за фекална микробиота с цел безопасна и ефективна трансплантация на фекална микробиота в България .....	139
Договор 110/2019	Скрининг и диагностика на <i>H. pylori</i> инфекцията и автоимунен гастрит и съпътстващата ги стомашна атрофия .....	140
Договор 113/2019	Изследване на потенциални серумни биомаркери при папиларен тиреоиден карцином .....	141
Договор 114/2019	Сравнение на фактори на костния обмен при лица с първичен хиперпаратиреоидизъм с и без автоимунен тиреоидит .....	141
Договор 117/2019	Уромодулин – маркер за ранна диагностика на хроничните бъбречни заболявания .....	142
Договор 118/2019	Изследване на серумни биомаркери като предиктори за отговор към сърдечна ресинхронизираща терапия при пациенти със сърдечна недостатъчност .....	143
Договор 119/2019	Хибридни методи за лечение на многоетажните атеросклеротични лезии на долните крайници .....	144
<b>МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ “ГРАНТ’ 2018” .....</b>		<b>146</b>
Договор 94/2018	Анализ и оценка на професионалния психо-социален стрес и на сърдечно-съдовия риск при работещи в значими и рисковни сфери от обществено-политическия живот .	146
Договор 95/2018	Пилотно събиране на данни и първоначален опит за внедряване на Европейската база данни за травматизма в България .....	147
Договор 96/2018	Изработване на нови дигитални материали за обучение по биоетика в българските детски градини и училища .....	148
Договор 97/2018	Проучване на личната отговорност за здравето сред лекари и специалисти по здравни грижи в болнични лечебни заведения.....	150
Договор 98/2018	Подобряване достъпа до етичните комисии чрез обучение на медицински специалисти и пациенти в лечебните заведения в страната .....	151
Договор 99/2018	Информираност и обучение на медицинските сестри и студентите от специалност „медицинска сестра” относно агресията и насилието в здравните грижи .....	152
Договор 100/2018	Информираност и обучение на студенти от специалност „акушерка“ и акушерки за оценка на риска от възникване на постпартална депресия.....	153
Договор 101/2018	Проучване и управление на здравния риск от сенсibiliзация към релевантни дентални материали сред студенти по зъботехника от Медицински колеж „Йорданка Филаретова“ – МУ-София.....	155
Договор 102/2018	Изследване на възможностите за използване на изчислителна и комуникационна техника в обучение по здравни грижи във Филиал „Проф. д-р Иван Митев“ – Враца .....	156

**МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ "ГРАНТ' 2019" ..... 158**

Договор 87/2019 Мотивация на родители за профилактика на оралните заболявания на техните деца чрез образователен сайт [www.dentalend.com.bg](http://www.dentalend.com.bg) ..... 158

Договор 97/2019 Влияние на етичния аспект в мотивацията на медицинските специалисти за реализация в Република България ..... 159

Договор 98/2019 Информираност и обучение на родители с деца в кърмаческа възраст ..... 160

**КОНКУРС „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ“ ..... 162**

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ' 2018“ ..... 162**

Договор 116/2018 Молекулярно-генетични техники за диагностика на метаболитни заболявания-предимства и недостатъци..... 162

Договор 117/2018 Молекулярно-генетична диагностика на скелетни дисплазии и колагенози ..  
..... 163

Договор 118/2018 Оптимизиране на молекулярно-генетични методи за идентификация на специфични микроРНК в невро-онкологията и оценка ролята на вирусната компонента..... 163

Договор 119/2018 Спермалният инфекциозен статус като фактор за репродуктивни проблеми .  
..... 164

Договор 129/2018 Идентифициране и биохимично охарактеризиране на хидроксицинамоилхинови киселини и флавоноиди от *Tanacetum vulgare* L. като потенциални терапевтични средства ..... 165

Договор 130/2018 Разработване на специфичен и чувствителен метод за количествено определяне на ерготионеин – потенциален модулатор на апоптични и сигнални пътища в клетката ..... 166

Договор 131/2018 Изследване на редки варианти в гени SHANK1 и SHANK2 и тяхната асоциация с биполарно афективно разстройство и шизофрения при български пациенти..... 167

Договор 132/2018 Изследване ролята на протеин киназа *PKC alpha* в BMP4 -индуцирани към одонтобластна диференциация хетерогенни клетки изолирани от нормална човешка апикална папила ..... 168

Договор 133/2018 Цитотоксични ефекти и оксидативен стрес на доксорубицин, натоварен в хитозан-алгинатни частици върху клетъчна линия H9c2 ..... 169

Договор 134/2018 Експресионен анализ на ключови гени, свързани с избягване на имунния отговор при белодробен рак ..... 170

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2019“ ..... 171**

Договор 120/2019	Скрининг за мутация в гена <i>ARG1</i> в предполагаем ендемичен регион за метаболитното заболяване Аргининемия (аргиназен дефицит) в България .....	171
Договор 127/2019	Мултидисциплинарен анализ при български пациенти с мозъчни тумори. Връзка между вирусни етиологични агенти, генетични и епигенетични фактори .....	172
Договор 128/2019	<i>In vivo</i> проучване върху ефектите на екстракт от <i>Ruscus aculeatus</i> (Asparagaceae) върху експериментален модел на остеопороза при плъх.....	173
Договор 129/2019	Проучване на молекулярно-генетични маркери, асоцииращи се с диарийни заболявания, при резистентни на трета генерация <i>Escherichia coli</i> , изолирани от фецес на пациенти и здрави носители.....	173
Договор 130/2019	Сравнително <i>in vitro</i> изследване на електронодонорния и протондонорния антиоксидантни капацитети на комплекси на Ga(III) и La(III) с 5-аминооротова киселина .....	174
Договор 131/2019	Изследване на НСПВс за <i>in vitro</i> антитуморна/антипролиферативна активност в експериментални моделни системи .....	176
Договор 135/2019	Изследване на редки варианти в гени, кодиращи йонни канали, и тяхната асоциация с биполарно афективно разстройство и шизофрения при български пациенти.....	177
Договор 137/2019	Ефект на пречистен екстракт от AMANITA MUSCARIA върху мозъчни синаптозоми, невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y и активността на човешки рекомбинантен ензим MAO-B .....	177
Договор 139/2019	Изследване на промените в химичните и физични качества на многосиловите ортодонтски дъги в клинична обстановка. Отчитане на дискомфорта на пациента .....	178
Договор 140/2019	Скрининг на флавоноиди от <i>Gypsophila glomerata</i> Pall ex M.B. (Caryophyllaceae) за <i>in vitro</i> модулиране на активността на холинестерази и каспази .....	179
Договор 141/2019	Проследяване на клинични и хисто-патологични параметри, включително AR (CAG) <sub>n</sub> и VDR (AT) <sub>n</sub> генетични маркери във връзка с повишена предизпозиция и агресивен клиничен ход на заболяването простатен карцином след радикална лапароскопска простатектомия при български пациенти.....	180
Договор 142/2019	Изследване на полиморфизма rs2736340 в FAM167A-BLK региона като фактор за развитието на дерматомиозит у възрастни .....	181
Договор 144/2019	<i>TP53</i> мутационен статус при не-дребноклетъчен белодробен карцином..	182
Договор 145/2019	<i>In vitro</i> оценка на възможния протективен ефект на сапонини от род <i>Astragalus</i> ( <i>A. membranaceus</i> , <i>A. glycyphyllos</i> и други) при модел на невротоксичност, индуцирана от биотоксини .....	182
Договор 146/2019	<i>In silico</i> анализ на имуногенни протеини с бактериален произход.....	183

Договор 147/2019	Фракциониране на водно-алкохолен екстракт от <i>Clinopodium vulgare</i> L. на базата на биологични тестове.....	184
<b>МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2018“.....</b>		<b>186</b>
Договор 120/2018	Изследване на сърдечно-съдови рискови маркери при пациенти със захарен диабет тип 1 с и без метаболитен синдром .....	186
Договор 121/2018	Оценка на прокалцитонин като диагностичен и прогностичен маркер при диабетно стъпало .....	187
Договор 123/2018	Генен експресионен анализ на избрани гени и сравнение със серумните нива на техните продукти при български пациенти с доброкачествени възли на щитовидната жлеза и с папиларен тиреоиден карцином.....	187
Договор 125/2018	Оптимизация на хемодинамичния контрол по време на лапароскопска адреналектомия .....	188
Договор 126/2018	Имуноглобулинов и антителен профил при пациенти с ТАО – потенциал за прогнозиране ефективността на приложената терапия.....	189
Договор 127/2018	Нови подходи за оценка на бъбречната функция при пациенти с хронични вирусни хепатити и различна степен на хронично бъбречно заболяване .....	190
Договор 128/2018	Имуномодулаторен ефект на секретирани от човешки мезенхимни стволови клетки разтворими фактори, осъществяван върху Т-хелперни лимфоцити, добити от периферна венозна кръв от пациенти с ревматоиден артрит .....	191
Договор 135/2018	Честота и спектър на мутациите в PIK3CA-гена в българска популация от пациенти с рак на гърдата .....	191
Договор 136/2018	Генетични маркери за прогресия на неалкохолната стеатоза при хроничен вирусен хепатит С .....	192
Договор 148/2018	Създаване на биобанка на пациенти за клинично-генетично проучване на miRNA експресионен профил при коронарна атеросклероза .....	193
<b>МЕДИКО-КЛИНИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2019“.....</b>		<b>195</b>
Договор 121/2019	Хепатокини и тяхната връзка с неалкохолната стеатозна болест и метаболитния синдром при пациенти със затлъстяване и предиабет .....	195
Договор 122/2019	Изследване на ролята на MICA и MICB полиморфизма на алелно ниво при дълголетие .....	195
Договор 123/2019	Роля на адипокините в развитието на диабетното стъпало.....	196
Договор 124/2019	Нови маркери за оценка на бета-клетъчната функция и сърдечно-съдовия риск при пациенти със затлъстяване и нормална въглехидратна обмяна и такива с предиабет и новооткрит захарен диабет.....	197

Договор 126/2019	Генетични основи на кардиомиопатиите при пациентите от български произход	198
Договор 132/2019	Откриване на субклиничните форми на синдром на Кушинг при пациенти с надбъбречни инциденталомии посредством LC-MS изследване на разширен стероиден профил в серум и урина	199
Договор 136/2019	Динамиката в стойностите на тъканните инхибитори на металопротеиназите и алфа-2 макроглобулинът като потенциални маркери за обратно развитие на фиброзата при напредналата чернодробна болест	200
Договор 138/2019	Изследване на генна идентичност между ларингеален карцином и шийни метастази	201
<b>МЕДИКО-СОЦИАЛНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2019“</b>		<b>202</b>
Договор 125/2019	Изследване ролята на пациента в оценката на здравните технологии чрез прилагане на обоснована теория (Grounded theory)	202
Договор 133/2019	Здравните грижи като фактор за превенция на усложненията при пациенти с артериална хипертония	203
Договор 143/2019	Организационни аспекти на здравните грижи при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт	203
<b>КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ 2018“</b>		<b>205</b>
Договор 207/2018	Микроинвазивен подход в детската дентална медицина чрез използване на дентален операционен микроскоп	205
Договор 208/2018	Оптимизация на ехографската диагностика за студенти от Медицински колеж	206
<b>КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ’2019“</b>		<b>208</b>
Договор 236/2019	Микроинвазивна диагностика и лечение на зъбен кариес и ендодонтски заболявания	208
<b>КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2018“</b>		<b>210</b>
Договор 209/2018	Изследване на най-честите бактериални и вирусни патогени, замесени в репродуктивни несполуки при жени върху менструална кръв, като прицелна биологична проба	210



Договор 210/2018	Изследване на микросателитните AR(CAG) <sub>n</sub> и Poly A 3'UTR VDR маркери, като генетични рискови фактори за развитие на простатен карцином и асоциация с агресивен клиничен ход .....	211
Договор 211/2018	Влияние на кетогенна диета върху термичния профил на мозъчния протеом в модел на хронични епилептични припадъци .....	212
Договор 212/2018	Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза чрез мРНК експресионно профилиране .....	213
Договор 213/2018	Проучване ролята на полиморфизма на хаптоглобин върху обмяната на желязо при здрава група доброволци от българската популация .....	214
Договор 214/2018	Сравнение на молекулярно-генетични и имунохистохимични методи за определяне на туморна микросателитна нестабилност при пациенти с колоректален карцином ..	216
Договор 215/2018	Моделиране на човешкия епидермис <i>in vitro</i> за основни и приложни изследвания .....	217
Договор 216/2018	Изследване на генотип-фенотипните корелации при пациенти с дистония-тремор синдром - вариант на Болест на Louis-Bar, обусловен от хомозиготна мутация р.V2716A в ATM гена .....	218
Договор 217/2018	Клинико-генетичен спектър на прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник в България .....	219
Договор 218/2018	Нови биомаркери за ендотелна дисфункция при пациенти с нарушения във въглехидратната обмяна .....	220
Договор 219/2018	Невропсихологични, ликворни и невроизобразяващи маркери при ранна диагностика на Болест на Алцхаймер и сродни заболявания .....	221
Договор 220/2018	Комплексна оценка на характеристиките на глюкозния профил при предиабетни състояния .....	222
Договор 221/2018	Проучване на митохондриална ДНК при пациенти с шизофрения .....	223
Договор 222/2018	Фитофармакологичен потенциал на растения от сем. Asteraceae (Сложноцветни) оценен чрез химично и биологично профилиране .....	224
Договор 223/2018	Изследване на биологичните и молекулярните характеристики на клетъчните култури от перикоронарни фоликуларни тъкани и фоликуларни кисти <i>in vitro</i> .....	225

**КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2019’” .....** **227**

Договор 237/ 2019	Приложение на PRF(Platelet rich fibrin) в хирургичната пародонтална терапия .....	227
-------------------	---	-----

Договор 238/2019	Проследяване степента на изчистване от инфекция с високорискови типове човешки папиломни вируси при жени с койлоцитни цервикални зони и/или наличие на нискостепенни сквамозни интраепителни лезии на цервикса.....	228
Договор 239/ 2019	Роля на генетичните полиморфизми на CYP2C9 и VKORC1 при управление на антикоагулантната терапия в постоперативния период след кардиохирургия .....	229
Договор 240/2019	Разработване на прицелен панел-базиран генетичен тест за идентифициране на мутации, водещи до наследствени очни заболявания .....	230
Договор 241/2019	Изследване на промените в термодинамичните параметри на белтъците в кръвната плазма на пациенти с рак на млечната жлеза, вследствие от провеждането на химиотерапия и лъчелечение.....	231
<b>SCIENTIFIC PROJECTS 2018 – 2019 .....</b>		<b>233</b>
<b>MEDICO-BIOLOGICAL AREA “GRANT 2018” .....</b>		<b>234</b>
Contract 53/2018	Molecular genetic study of <i>Clostridium difficile</i> strains isolated from asymptomatic patients and antibiotic resistance status .....	234
Contract 54/2018	Investigation of mechanisms of chromosomal and plasmidic quinolone resistance among cephalosporine third generation resistant or/and carbapenem resistant clinically significant isolates <i>Klebsiella spp</i> in university hospital “Saint Marina” Varna.....	234
Contract 55/2018	Haplotype analysis for identification of linkage between some <i>CLCN1</i> mutations in patients with myotonia congenital type Becker .....	235
Contract 56/2018	Molecular mechanisms of mutagenesis in Bulgarian patients with Angelmann syndrome .....	236
Contract 57/2018	Microbiological and genetic studies on antibiotic resistance in <i>Streptococcus pyogenes</i> and other beta-hemolytic streptococci .....	237
Contract 58/2018	Participation of GABA <sub>A</sub> and GABA <sub>C</sub> receptors in generation of oscillatory potentials in the ON and OFF response of the electroretinogram .....	238
Contract 59/2018	New generation targeted sequencing for identification of genetic mutations in Bulgarian familial hematuria cases .....	239
Contract 60/2018	High-resolution genomic screening for unbalanced genomic alterations of transitional cell carcinoma of the urinary bladder .....	240
Contract 61/2018	Role of the cannabinoid and the serotonergic neurotransmitter systems on cold stress-induced nociception triggered in rats .....	241
Contract 62/2018	miRNA predictive profile for assessment of the risk for cardio-vascular complications in type 2 diabetes mellitus .....	242

Contract 64/2018	How does congenital Systemic lupus in mice affect the quality of oocyte meiosis – experimental mouse model for investigation of oocytes, obtained by hormonally stimulated ovulation and in vitro maturation.....	243
Contract 65/2018	Investigation of oogenesis-specific chromatin reorganization: chromatid cohesion and condensation, in relation to DNA methylation in <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> maturing mouse oocytes...	244
Contract 66/2018	Study the effect of the selective melatonineric drug agomelatine on inflammatory and morphological changes in brain structures in a model of Alzheimer diseases in male rats .....	245
Contract 67/2018	Investigation of the effect of Mesembrine alkaloids on behavioral and endocrine changes in acute and chronic restrain stress in rats.....	246
Contract 68/2018	The role of inflammation, oxidative and hemodynamic stress for the development of pulmonary hypertension in copd patients .....	247
Contract 69/2018	Study of the combined administration of escitalopram and a ketogenic diet on indicators of depression and neuroinflammation in experimental models of stress and depression .	248
Contract 70/2018	Regulation of appetite and metabolism in severe obese subjects after bariatric syrgery .....	249
Contract 71/2018	Study on the role of genes associated with familial cancer syndromes on the development of multiple primary tumors .....	249
Contract 72/2018	Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in breast cancer patients . .....	250
Contract 73/2018	Genetic factors and clinical characteristics of vascular complications in Bulgarian patients with type 2 diabetes .....	251
Contract 74/2018	Analytical characterization of medicinal products used in treatment of diseases of gastroenterological tract - proton pump inhibitors in anti-infection combinations .....	252
Contract 75/2018	Phenolic compounds from the methanol extract of <i>Hypericum cerastoides</i> (Spach) N. Robson. – structural characterization and investigations for antioxidant anti- $\alpha$ -amylase, anti- $\alpha$ -glucosidase and antilipase activities.....	253
Contract 76/2018	Saponin-mediated enhacement of etoposide cytotoxicity on lymphoma cell line.... ..	254
Contract 77/2018	Synthesis, structure characterization, antimycobacterial activity and toxicity of new indole derivatives. Investigation of their stability by HPLC method .....	255
Contract 78/2018	In vitro study on the stability and the antioxidant properties of newly synthesized Ga(III) and Pr(III) complexes of bioactive uracils .....	256
Contract 79/2018	<i>In vitro</i> evaluation of possible neuroprotective activity in a model of 6-hydrodopamine-induced oxidative stress on isolated synaptosomes and on brain blood vessels contractility of alcesefoliside and mauritianine, isolated from the arial <i>Astragalus monspessulanus spp. monspessulanus</i> .....	257

Contract 80/2018	Study the impact of modified media on growth index and flavonoid production in <i>in vitro</i> cultures of endangered taxon <i>Gypsophila trichotoma</i> Wend. ....	258
Contract 81/2018	Phytochemical screening with high resolution for rare biologically active compounds in species of genus <i>Astragalus</i> L. (Fabaceae).....	259
Contract 82/2018	Pharmacological study of <i>Nigella sativa</i> oil on experimentally induced colitis in mice .....	259
Contract 83/2018	Development of RP- HPLC method for separation of geometrical isomers of newly synthesized pyrrole and xanthine compounds .....	260
Contract 84/2018	Feasibility study on application of 3D printing by extrusion in pharmaceutical practice .....	261
Contract 85/2018	Biosynthesis of tropolon alkaloids in <i>in vitro</i> cultures of <i>Gloriosa superba</i> L. (Colchicaceae) .....	262
Contract 87/2018	Significance of salivary parameters – high sensitive C-reactive protein, creatine kinase MB-mass, troponin I for the diagnosis of acute myocardial infarction in patients with chronic periodontitis .....	263
Contract 88/2018	Changes of root canal dentin at high intensive laser treatment ( <i>in vitro</i> study) .	263
Contract 89/2018	Influence of Intracanal Medicaments on Endodontic Biofilm ( <i>in vitro</i> study) .....	264
Contract 93/2018	Biomimetic remineralization in experimental model of enamel caries .....	265
Contract 109/2018	Identification of genetic mutations causing retinal degeneration in Bulgarian patients using next-generation sequencing of target genes .....	266
Contract 115/2018	Investigation of Analysis of propmотор hypermethylation of tumor suppressor genes of ovarian carcinoma .....	267
<b>MEDICO-BIOLOGICAL AREA “GRANT 2019” .....</b>		<b>269</b>
Contract 55/2019	Comparative study of the effects of cyproheptadine, asenapine, propranolol and diazepam on serotonin toxicity in rats .....	269
Contract 56/2019	Involvement of endothelial factors in the regulation of blood pressure in hypertension .....	269
Contract 58/2019	Molecular-genetic characteristics of the disorder Tuberous sclerosis complex (TSC) in Bulgaria .....	270
Contract 59/2019	Investigation of germline mutations in <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> genes, as risk factors for PCa development and association with aggressive clinical behavior .....	271
Contract 61/2019	Pharmacological study of the effects of nociceptin analogue in an experimental model of neuroinflammation.....	272

Contract 62/2019	Role of arylhydrocarbon receptors on the neurobiological activity of novel indole derivatives with the arylhydrazone moiety .....	273
Contract 63/2019	Microbiological and molecular genetic studies on biofilm formation by clinical isolates of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	273
Contract 64/2019	Evaluation of <i>Helicobacter pylori</i> susceptibility to fluoroquinolones .....	275
Contract 66/2019	Assessment of the genetic risk of cardiovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus by new-generation sequencing .....	275
Contract 67/2019	Contribution of hyperpolarization-activated cation channel to retinal function: electroretinographic study .....	276
Contract 68/2019	Interacton between the endogenous cannabinoid and the adrenergic mediator systems in the pathogenesis of cold stress .....	277
Contract 69/2019	Social interactions, learning and spatial memory in adolescent rats under chronic social stress: effects of mesembrine alkaloids.....	278
Contract 70/2019	Analysis of somatic mutations in primary tumors with different localication in patients with multiple primary neoplasia.....	279
Contract 71/2019	Investigation of susceptibility to new antimicrobial agent among polyresistant isolates <i>Klebsiella pneumoniae</i> and the mechanisms of resistance to colistin .....	280
Contract 73/2019	Genetic factors affecting the normal function of the complement system and associated with renal pathology.....	280
Contract 74/2019	Microbiological, molecular biological and epidemiological studies on <i>Lactococcus garvieae</i> - a new pathogen, cause of local and systemic infections.....	281
Contract 75/2019	UHPLC-HRMS profiling of <i>Chenopodium bonus-henricus</i> L. roots for saponins, flavonoids and ecdysteroids and testing the main compounds for anti- $\alpha$ -glucosidase, anti- $\alpha$ -amylase and antilipase activities.....	282
Contract 76/2019	Development of an effective method for isolation of mauritianin and in vitro evaluation of its protective potential .....	283
Contract 77/2019	Experimental and numerical study of supersaturating nano-sized drug delivery systems based on poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene oxide) double hydrophilic copolymers for enhanced membrane transport of poorly soluble drugs .....	284
Contract 78/2019	Virtual Screening and Hit Selection of Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors .....	285
Contract 79/2019	Essential oils from invasive, alien plant species – endless cheap resource for pharmaceutical practice .....	285
Contract 80/2019	Development of approaches to stimulate polyphenol production in in vitro cell systems of <i>Astragalus glycyphyllos</i> L. ....	286

Contract 81/2019	Investigation of metamizole metabolites (4-methylaminoantipyrine; 4-aminoantipyrine; 4-formyl-aminoantipyrine; 4-acetylaminoantipyrine) for in vitro antitumor / antiproliferative activity in experimental model SYSTEMS .....	287
Contract 82/2019	Immunohistochemical investigation of corpus callosum demyelination in a model of multiple sclerosis in mice treated with 4-aminopyridine derivatives .....	288
Contract 83/2019	Design, druglikeness evaluation and synthesis of novel hydroxy-substituted hydrazones with potential cytotoxic activity .....	288
Contract 84/2019	Synthesis, investigation and research of cytotoxic and xanthin oxidase activity of new metal complexes with N,O,S containing organic ligands .....	289
Contract 85/2019	In silico and in vitro investigation of xanthine derivatives as inhibitors of MAOB enzyme .....	291
Contract 89/2019	X-ray micro-computed tomography investigation of the adaptation of composite inlays to hard dental tissues fabricated by three different methods .....	291
Contract 90/2019	Investigation of the effect of irrigation solutions on root dentin microhardness and roughness .....	292
Contract 94/2019	Relationship between periodontal diseases and rheumatoid arthritis. Genetic polymorphism study of FcγRIIIA and examination of anti-citrullinated protein antibodies in saliva... 293	293
Contract 99/2019	Study of the role of IgG subclasses in the post-vaccine immune response to polysaccharide and protein antigens in the Bulgarian population.....	294
Contract 104/2019	Study of the polymorphisms rs2279115 and rs956572 in the <i>Bcl2</i> gene as a factor for the development of dermatomyositis in adult patients .....	295
Contract 116/2019	Genetic screening for UMOD mutations in autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease .....	295
Contract 148/2019	Molecular genetic analysis for mutation in the TERT, BRAF and NRAS genes in patients with papillary thyroid carcinoma.....	296
<b>MEDICO-CLINICAL AREA</b>	<b>“GRANT 2018” .....</b>	<b>298</b>
Contract 52/2018	Correlation dependence between iron homeostasis parameters and IMT in sleep apnea patients .....	298
Contract 63/2018	Status of trace elements and vitamin D in pregnant women with gestational diabetes mellitus .....	299
Contract 86/2018	Implant provisionals as a prosthetic tool for peri-implant soft tissue management. ....	301
Contract 90/2018	Development of a protocol for assesement of extraoral status of orthodontic patients by using photo analysis and database for orthodontic archive.....	302

Contract 91/2018	Epidemiology of malocclusions and assessment of the different treatment approaches of dental students and residents at FDM-Sofia for period of 5 years.....	302
Contract 92/2018	Creation of software product for digital data analysis when operating the face bow „Face bow Mini-Maxi .....	303
Contract 103/2018	Bone markers and cardiovascular risk factors in polycystic ovarian syndrome. 304	
Contract 104/2018	Serological and molecular genetic studies on the involvement of hepatitis E virus in the pathogenesis of neurological diseases .....	305
Contract 105/2018	Organokines in men with late-onset hypogonadism and metabolic syndrome 306	
Contract 106/2018	Nasopharyngeal microbiome in children with chronic pulmonary diseases .....	307
Contract 107/2018	Dynamic picture of the respiratory pneumococcal infections in children after introduction of routine pneumococcal vaccination in Bulgaria .....	308
Contract 108/2018	Hormonal status and change in bone metabolism in patients with obstructive sleep apnea and metabolic syndrome and effect from treatment with non-invasive ventilation.....	309
Contract 110/2018	Radiation lesions of the gastrointestinal tract after radiation treatment - assessment of the severity of the disease and definition of a therapeutic approach.....	310
Contract 111/2018	Quantification of ischemically modified albumin in serum and study its importance as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with transient ischemic attack (TIA) and hemorrhagic / ischemic stroke .....	311
Contract 112/2018	Quality of Life, Obesity, and Metabolic Syndrome in the context of chronic subclinical inflammation .....	312
Contract 113/2018	Assessment of the relation between islet cell, thyroid and transglutaminase antibodies in type 1 diabetes.....	313
Contract 114/2018	Antiviral immune response in children with virus-induced wheezing .....	314
<b>MEDICO-CLINICAL AREA “GRANT’ 2019” .....</b>		<b>316</b>
Contract 57/2019	Validation of immunologic method for erythroferrone serum evaluation and establishment of reference values for Bulgarian population .....	316
Contract 65/2019	Application of molecular genetic techniques in the diagnostic algorithm for non-cancerous urethritis .....	317
Contract 72/2019	One-year pilot study on the incidence of EGFR mutation status from bronchoalveolar lavage in patients with primary lung adenocarcinoma compared to peripheral venous blood liquid biopsy and tissue biopsy .....	317
Contract 86/2019	Micro-invasive and Antimicrobial Effect of Chemo-mechanical Excavation Means in Primary Teeth Caries.....	319
Contract 88/2019	Disinfection of the endodontic space in immature permanent teeth .....	320

Contract 91/2019	3D Printed splints for bruxism prevention – experimental and clinical study .....	320
Contract 92/2019	Significance between presence of IL-17F gene polymorphism and severity of periodontitis .....	321
Contract 93/2019	Diagnostic and microinvasive dental approach in patients with arthropathies due to craniomandibular dysfunctions .....	322
Contract 95/2019	Prevention of dental caries in children from 6 to 12 years by influencing their eating habits .....	323
Contract 96/2019	Assessment of the risk of developing dental caries in patients aged 19 to 64 years with Cariogram® .....	324
Contract 100/2019	Apoptotic factor caspase-3 analysis in human primary epithelial cells from isolated intraoperatively and treated with <i>trypan blue</i> anterior lens capsules of patients with age related cataract and diabetes type 2 induced cataract.....	325
Contract 101/2019	Role of Vitamin D in myopia development .....	326
Contract 102/2019	The role of the endocannabinoid system in metabolic and hormonal disorders in polycystic ovary syndrome.....	326
Contract 103/2019	Assessment of regenerative processes in the basal nerve plexus after limbal stem cell and amniotic membrane transplantation using Cochet-Bonnet esthesiometry and optical coherence tomography.....	327
Contract 105/2019	Tissue oxygenation monitoring in patients with severe sepsis and hypovolemia ... ..	328
Contract 106/2019	The role of intravascular ultrasound imaging in evaluation of degenerative pathology of the aorta .....	329
Contract 107/2019	The most common microbiological causes of acute purulent otitis and its complications after administration of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine .....	329
Contract 108/2019	Measuring the serum levels of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) in patients with inflammatory bowel diseases, microscopic colitis and irritable bowel syndrome .....	330
Contract 109/2019	Establishment of a stool bank, aiming safe and effective fecal microbiota transplantation in Bulgaria .....	331
Contract 110/2019	Screening and diagnosis of <i>H. pylori</i> infection and autoimmune gastritis and their concomitant gastric atrophy .....	332
Contract 113/2019	Investigation of potential serum biomarkers in papillary thyroid cancer .....	333
Contract 114/2019	Comparison of Bone Metabolism Factors in Patients with Primary Hyperparathyroidism with and without Autoimmune Thyroiditis .....	334
Contract 117/2019	Uromodulin – a marker for the early diagnosis of chronic kidney diseases .....	334
Contract 118/2019	Investigation of serum biomarkers as predictors for response to Cardiac Resynchronization Therapy in patients with chronic heart failure.....	335



Contract 119/2019 Hybrid methods for treatment of multilevel atherosclerotic lesions of the lower limbs.....	336
<b>MEDICO-SOCIAL AREA    “GRANT’ 2018” .....</b>	<b>338</b>
Contract 94/2018 Analysis and evaluation of occupational psycho-social stress and cardiovascular risk in individuals working in significant and risky areas of social and political life .....	338
Contract 95/2018 Investigation of pilot data collection and initial attempt to implement the European injury database in Bulgaria .....	339
Contract 96/2018 Development of new digital materials for bioethics training in Bulgarian kindergartens and schools .....	340
Contract 97/2018 Research on personal responsibility towards own health of physicians and healthcare specialists in hospitals .....	341
Contract 98/2018 Improvement of the access to ethics committees through training of medical specialists and patients in healthcare establishments in Bulgaria .....	342
Contract 99/2018 Awareness and training of nurses and nursing students about aggression and violence in health care .....	343
Contract 100/2018 Awareness and training of midwifery students and midwives to assess the risk of postpartum depression.....	344
Contract 101/2018 Investigation and management of health risk of sensitization to relevant dental materials among dental students from the Medical College “Iordanka Filaretova” - MU – Sofia .....	345
Contract 102/2018 Investigation of the possibilities of using computing and communication technologies in healthcare training in Affiliate "Prof. Dr. Ivan Mitev "- Vratsa.....	347
<b>MEDICO-SOCIAL AREA    “GRANT’ 2019” .....</b>	<b>349</b>
Contract 87/2019 Motivation of parents for prevention of oral diseases of their children through educational site .....	349
Contract 97/2019 Influence of ethical aspect on the motivation of medical professionals to work in the Republic of Bulgaria .....	349
Contract 98/2019 Awareness and education of parents with infant children .....	351
<b>COMPETITION „YOUNG SCIENTIST” 2018-2019 .....</b>	<b>353</b>
<b>MEDICO-BIOLOGICAL AREA    „YOUNG SCIENTIST 2018” .....</b>	<b>353</b>
Contract 116/2018 Molecular-genetic techniques for diagnostics of the metabolic disorders - advantages and disadvantages .....	353

Contract 117/2018	Molecular Genetic Diagnosis of Skeletal Dysplasias and Collagenosis.....	353
Contract 118/2018	Optimization of molecular-genetic methods for specific microRNAs identification in neuro-oncology and assessment the role of viral component .....	354
Contract 119/2018	Sperm infectious status as a reproductive failure factor .....	355
Contract 129/2018	Identification and biochemical characterization of hydroxycinnamoylchonic acids and flavonoids from <i>Tanacetum vulgare</i> L. as potential therapeutic agents .....	355
Contract 130/2018	Development of a specific and sensitive method for quantitative determination of ergotionein - potential modulator of apoptosis and the cell signaling.....	356
Contract 131/2018	Investigation of rare variants of SHANK1 and SHANK2 genes and their association with bipolar disorder and schizophrenia in Bulgarian patients .....	357
Contract 132/2018	To investigate the role of protein kinase PKC alpha in BMP4-induced to odontoblast differentiation heterogeneous cells isolated from normal human apical papilla.....	357
Contract 133/2018	Cytotoxic effects and oxidative stress of doxorubicin, loaded in chitosan-alginate particles on H9c2 cell line .....	358
Contract 134/2018	Expression analysis of key genes related to tumor immune surveillance in lung cancer .....	359
<b>MEDICO-BIOLOGICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2019” .....</b>		<b>360</b>
Contract 120/2019	Screening for the mutation in ARG1 gene in suspected endemic region for the metabolic disorder Argininemia (Arginase deficiency) in Bulgaria.....	360
Contract 127/2019	Multidisciplinary analysis among Bulgarian patients with brain tumours. Association between viral, genetic and epigenetic factors .....	360
Contract 128/2019	<i>In vivo</i> study on the effects of <i>Ruscus aculeatus</i> extract (Asparagaceae) on the experimental model of osteoporosis in rats.....	361
Contract 129/2019	Study of molecular genetic markers associated with diarrheal diseases in third-generation resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from faeces of patients and healthy carriers .....	362
Contract 130/2019	Comparative <i>in vitro</i> study on the hydrogen-donation and electron-transfer capacities of complexes of Ga(III) and La(III) with 5-aminoorotic acid.....	363
Contract 131/2019	Investigation of the antiproliferative/antitumor activity in experimental model systems .....	364
Contract 135/2019	Investigation of rare variants in genes coding ion channels and their association with bipolar affective disorder and schizophrenia in Bulgarian patients .....	364
Contract 137/2019	Effects of <i>Amanita muscaria</i> extract on isolated brain synaptosomes, neuroblastoma cell line <i>SH-SY5Y</i> , and activity of human recombinant MAOB enzyme (hMAOB).....	365

Contract 139/2019	Investigation of the changes in the chemical and physical properties of multi-force orthodontic archwires during clinical use. Evaluation of patient's discomfort.....	366
Contract 140/2019	Screening of flavonoids from <i>Gypsophila glomerata</i> Pall ex M.B. (Caryophyllaceae) for <i>in vitro</i> modulation of cholinesterase and caspase activity .....	366
Contract 141/2019	Monitoring of clinical and histopathological parameters, including <i>AR</i> (CAG) n and <i>VDR</i> (AT) n genetic markers in connection with increased predisposition and aggressive clinical course of the disease prostate cancer after radical laparoscopic prostatectomy in Bulgarian patients ...	367
Contract 142/ 2019	Study of the polymorphism rs2736340 in the FAM167A-BLK region as a factor for the development of dermatomyositis in adult patients .....	368
Contract 144/2019	<i>TP53</i> Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer.....	368
Contract 145/2019	<i>In vitro</i> assessment of the possible protective effect of Astragalus saponins (A. membranaceus, A. glycyphyllos, etc.) in the model of biotoxin induced toxicity .....	369
Contract 146/2019	<i>In silico</i> analysis of immunogenic proteins with bacterial origin .....	370
Contract 147/2019	Fractionation of aquos – alcoholic extract from <i>Clinopodium vulgare</i> L., based on biological examination .....	370
<b>MEDICO-CLINICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2018” .....</b>		<b>372</b>
Contract 120/2018	Investigation of cardio-metabolic risk markers in patients with type 1 diabetes with and without metabolic syndrome .....	372
Contract 121/2018	Evaluation of procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in diabetic foot .....	372
Contract 123/2018	Gene expression analysis of selected genes and comparison with the serum levels of their products in Bulgarian patients with benign thyroid nodules and with papillary thyroid cancer .....	373
Contract 125/2018	Perioperative hemodynamic control optimisation during laparoscopic adrenalectomy .....	374
Contract 126/2018	Immunoglobulin and antibody profile in patients with TAO - potential for predicting the effectiveness of therapy.....	375
Contract 127/2018	New methods for kidney function evaluation in patients with chronic viral hepatitis and different stages of chronic kidney disease .....	375
Contract 128/2018	Immunomodulatory effect exerted by soluble factors produced by human mesenchymal stem cells on Thelper lymphocytes, obtained from peripheral venous blood from patients with rheumatoid arthritis .....	376
Contract 135/2018	Frequency and spectrum of <i>PIK3CA</i> -mutations in Bulgarian patients with breast cancer .....	376

Contract 136/2018	Genetic markers for progression of non-alcoholic fatty liver disease in patients with chronic hepatitis C .....	377
Contract 148/2018	Creating a biobank of patients for a clinical genetic study of miRNA expression profile in coronary atherosclerosis .....	378
<b>MEDICO-CLINICAL AREA „YOUNG SCIENTIST 2019” .....</b>		<b>379</b>
Contract 121/2019	Hepatokines and their relationship with non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese and prediabetic patients .....	379
Contract 122/2019	Investigation of MICA and MICB allelic polymorphism in longevity .....	379
Contract 123/2019	The role of adipokines in the diabetic foot .....	380
Contract 124/2019	New markers for assessing beta-cell function as well as cardiovascular risk in patients with obesity and normal carbohydrate metabolism and those with prediabetes.....	381
Contract 126/2019	Genetic disorders in bulgarian patient with cardiomyopathy .....	381
Contract 132/2019	Subclinical forms of Cushing’s syndrome detection among patients with adrenal incidentalomas using steroid profile measuring with LC-MS.....	382
Contract 136/2019	Dynamics of values of tissue inhibitors of metalloproteinases and alfa-2 macroglobulin as potential markers of regression of liver fibrosis in case of advanced liver disease .	383
Contract 138/2019	Examining the genetic similarity between laryngeal carcinoma and neck metastasis .....	383
Contract 125/2019	Study of the patient's role in health technology assessment by applying a grounded theory (Grounded theory).....	384
Contract 133/2019	Health care as a factor in the prevention of complications in patients with hypertension .....	385
Contract 143/2019	Organizational aspects of healthcare in patients with ischemic stroke.....	385
<b>COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2018” .....</b>		<b>387</b>
Contract 207/2018	Microinvasive approach in pediatric dentistry by using a dental operating microscope .....	387
Contract 208/2018	Optimisation of ultrasound diagnostics for students from the Medical College	388
<b>COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2019” .....</b>		<b>390</b>
Contract 236/2019	Microinvasive diagnosis and treatment of dental caries and endodontic diseases .....	390

## **COMPETITION „STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT” ..391**

### **STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2018 .....391**

Contract 210/2018	Investigation of the microsatellite <i>AR(CAG)<sub>n</sub></i> and <i>Polly A 3'UTR VDR</i> markers as genetic risk factors in prostate carcinoma and association with aggressive clinical profile .....	392
Contract 211/2018	Influence of ketogenic diet on the thermoprofile of the brain proteome in a model of chronic epileptic seizures .....	393
Contract 212/2018	Screening for non-invasive candidate biomarkers for the diagnosis of endometriosis using mirna expression profiling.....	393
Contract 213/2018	Role of haptoglobin polymorphism on iron metabolism in healthy volunteers from Bulgarian population.....	394
Contract 214/2018	Comparison of molecular-genetics and Immunohistochemistry methods for tumor microsatellite instability in patients with colorectal cancer .....	396
Contract 215/2018	In vitro modeling of the human epidermis for basic and applied investigations.....	397
Contract 216/2018	Investigation of genotype-phenotype correlations among patients with syndrome of dystonia-tremor- variant of ataxia-teleangiectasia, due to mutation P.V2716A in <i>ATM</i> gene.....	398
Contract 217/2018	Clinical-genetic spectrum of limb-girdle muscular dystrophies in Bulgaria .....	399
Contract 218/2018	New biomarkers for endothelial dysfunction in patients with disorders of carbohydrate metabolism.....	400
Contract 219/2018	Neuropsychological, cerebrospinal and neuroimaging markers in early diagnosis of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases .....	400
Contract 220/2018	Complex assessment of the characteristics of the glucose profile in prediabetes ..	401
Contract 221/2018	Investigation of Mitochondrial DNA in Patients with Schizophrenia .....	402
Contract 222/2018	Phytopharmacological potential of plants from Asteraceae family assessed by chemical and biological profiling .....	403
Contract 223/2018	Investigation of biological and molecular characteristics of pericoronal follicular tissues and cysts in vitro .....	404

### **STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2019 .....406**

Contract 237/2019	Application of PRF (Platelet rich fibrin) in surgical periodontal therapy.....	406
Contract 238/2019	Monitoring the clearance of high-risk types of human papillomavirus infection in women with cervical areas of koilocytes and/or the presence of low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix .....	407

Contract 239/2019 The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms in anticoagulant therapy management in postoperative period after cardiac surgery ..... 407

Contract 240/2019 Development of a targeted panel-based genetic test for identification of mutations leading to inherited eye diseases ..... 408

Contract 241/2019 Investigation of the changes in the thermodynamic parameters in the blood plasma of patients with breast cancer during the course of treatment with chemotherapy and radiotherapy ..... 409

**Договор 53/2018** Молекулярно генетично проучване на щамове *Clostridium difficile* изолирани от безсимптомни пациенти и състояние на антибиотичната резистентност  
Изследователски екип: Проф. Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн

- Проф. Людмила Боянова, дмн
- Доц. Румяна Марковска-Давидкова, дм
- Даниел Йорданов, дм
- Д-р Галина Гергова
- Николай Златков Кълвачев, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Съществуват оскъдни съобщения за колонизацията с *Clostridioides (Clostridium) difficile* при асимптоматични деца на възраст >2 години. Ние проучихме *C. difficile* колонизацията при 61 деца на възраст >2 г., хоспитализирани в университетска педиатрична болница и дневни детски центрове и ги сравнихме с литературни данни, публикувани от 2010 г. В нашето проучване *C. difficile* колонизацията беше 6,6% и нямаше носителство на токсигенни *C. difficile*. Това може да се обясни със съобщаваната честа колонизация с *C. difficile* (0-45%, често > 20%), но предимно при деца на възраст <2 г., докато децата в нашето проучване бяха на възраст 2-17 г. (средна възраст, 6.9 г.). Асимптоматичното носителство на токсигенни *C. difficile* в детска възраст варира от 0-2.5%, както в нашето проучване, в проучването на японски новородени, на здрави деца в предучилищна възраст в Швеция и в Гана до 23,1% при хоспитализирани японски деца с коморбидитет. Наличието на положителни за бинарен токсин носители е много ниско или липсва. Предполага се, че възпалителното заболяване на червата и употребата на инхибитори на протонната помпа са рискови фактори за носителство на *C. difficile*. Аналогично, в нашето проучване бяха открити само четири нетоксигенни носители, включително едно от 6 деца с възпалително заболяване на червата и едно от седем деца, приемащи инхибитори на протонната помпа. В литературата има голямо разнообразие в разпространението както на *C. difficile*, така и на токсигенни *C. difficile* при асимптоматични деца, като най-често срещани рискови фактори са възрастта, скорошното използване на антибиотици, храненето с тръба и употребата на инхибитори на протонната помпа. Накратко, резултатите от нашето проучване не показаха риск за инфекции с *C. difficile* в българската педиатрична университетска болница и в дневните детски центрове. Въпреки това, редовното мониториране на носителството на *C. difficile*, особено на токсигенни *C. difficile* е необходимо, за да се сведе до минимум рискът от клинично изразени болести.

**Научни публикации и прояви:**

- Boyanova L, Markovska R, Hadzhiyski P, et al. Recurrent *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in a patient suffering from inflammatory bowel disease and benefits of resistotyping. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2019 Aug;94(4):334-336.

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

**Договор 54/2018 Проучване на механизмите на хромозомна и плазмидна хинолонова резистентност при цефалоспорин трета генерация и/или карбапенем резистентни клинично-значими изолати *Klebsiella spp* в университетска болница “Света Марина” Варна**

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

- Проф. Теменуга Стоева, дм - МУ-Варна
- Петя Станкова
- Д-р Гургана Куюмджиева - МУ-Варна
- Проф. Людмила Боянова, дмн
- Проф. Радка Кънева, дб
- Калина Михова
- Член-кор проф. Иван Митов, дмн

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящият проект беше да се проучат резистентни на хинолони и цефалоспоринови трета генерация и/или карбапенемни клинични изолати *Klebsiella spp* в УБ - Варна. Бяха използани полимеразо-верижна реакция и секвениране за определяне на вида на бета-лактамазите, за репликонно типизиране. Епидемиологично типизиране беше чрез ERIC PCR и MLST. В периода от януари 2014 до декември 2017 г. бяха проучени общо 1084 *Klebsiella pneumoniae*, изолирани в УМБАЛ „Света Марина“ Варна. От тях за последващо проучване бяха избрани 159 изолатата, резистентни на трета генерация цефалоспоринови и/или карбапенемни от пациенти на болницата, както и един изолат от ръце на персонал, получен при вътрешен санитарен контрол. Колекционираниите изолати показаха високите нива на резистентност към аминокликозиди и хинолони, както и сравнително високо ниво на резистентност към карбапенемни – 22,6%. По отношение на ESBL преобладаваха CTX-M ензимите – предимно CTX-M-15 в 91% от щамовете. Изключително важна е наличието на карбапенем-резистентна K pneumonia – 36 изолатата. Двадесет и осем от тях произвеждаха KPC-2 и CTX-M-15, два само KPC-2. Три изолатата произвеждаха NDM-1, CMY-4 и CTX-M-15. Доказахме и шест изолатата произвеждащи DNA-1 и CTX-M-3, както и единични, произвеждащи KPC-2 и VIM-1, VIM-1 и SHV-12, както и OXA-48 и CTX-M--15. Изоелектричното фокусиране потвърди наличието на тези ензими. При 146 конюгационни експерименти получихме 56 трансконюганта, като детерминантите, кодиращи резистентност към хинолони бяха предадени при 16 трансконюганта, а *bla*<sub>ESBL</sub> при всички получени щамове. При 49% от изолатите доказахме *qnrB*, като преобладаваше *qnrB9*. В 8.4% установихме *qnr S1*. *OqxA* генът позитивира в 100%, а *oqxV* в 96,1%. Бяха установени 17 MLST типа, съответстващи на определените ERIC типове. Най честите бяха ST15 в 40.9% от изолатите, ST11 в 20.1%, ST35 - 5.2%.

**Научни публикации и прояви:**

- Неделчева Г, Стоева Т, Марковска Р, и др. Антибиотична чувствителност на клинично значими изолати *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна за периода 2014-2017г. *Обща медицина*, 2019; 3. Под печат
- Markovska R, Stoeva T, Stankova P, et al. First report of *Enterobacter asburiae* isolate, producing NDM-1 and a novel ACT-68 enzyme in Bulgaria. *Infect Dis (Lond)*. (ex-Scandinavian Journal of Infectious Diseases). 2019 Aug;51(8):627-629.



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

**Договор 55/2018** Хаплотипен анализ за изследване на скаченост на някои мутации в *CLCN1* гена при пациенти с миотония конгенита тип Бекер

Изследователски екип: Гл. ас. Биляна Георгиева, дб

- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Савина Тинчева, дб
- Ас. Ани Митева
- Ангелина Мандаджиева, кръжочник
- Зорница Павлова, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Настоящата разработка има пилотна роля по отношение на хаплотипен анализ за скаченост на някои *CLCN1* мутации при пациенти с миотония конгенита тип Бекер в България. Общо 46 души от български и италиански (сицилиански) произход бяха подложени на хаплотипен анализ. Наблюдавана беше по-ниска честота на най-разпространените алели за носителите на p.Arg894\* при контролната група на фона на пациентите (всички от български произход). За получаване на статистически значими резултати обаче трябва да бъде включена по-голяма извадка носители на p.Arg894\* мутацията в *CLCN1* гена, което ще бъде от интерес за бъдещи научни разработки на групата. Проведен беше LOD анализ за скаченост на избраните маркери в българските семейства, който не показва достатъчно добър резултат ( $LOD \geq 3$ ), за да може да бъде установено наличието на обособен хаплотип, който да се предава заедно с мутацията. Получените от нашата научна група резултати бяха сравнени с хаплотип, доказан при изследване на ефект на родоначалника сред носителите на *CLCN1* p.Arg894\* от руската популация. Припокриване на 4 от изследваните маркери не може да бъде дефинирано като значимо съвпадение. Това поставя въпроса дали има смисъл да се говори за общ източно европейски произход на p.Arg894\* мутацията. По отношение на италианската група с произход от областта на Сицилия, сравнението между най-разпространените алели при носителите на p.Gly190Ser мутацията и контролната група не показва значима разлика. В тази група ефект на родоначалника може по-вероятно да бъде отхвърлен и в контекста на по-голямата изследвана пациентска извадка. Проведеният LOD анализ е в подкрепа на това твърдение, тъй като не беше доказана скаченост между p.Gly190Ser мутацията и изследваните генетични маркери. На базата на всички получени резултати в хода на настоящата разработка за момента все пак не може да се говори за доказан ефект на родоначалника за мутации в *CLCN1* гена в българската или италианската група.

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

**Договор 56/2018** Молекулни механизми на мутагенеза при български пациенти със синдром на Ангелман

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

- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Гл. ас. Биляна Георгиева, дб
- Ас. Ани Митева
- Славена Атемин, докторант
- Тихомир Тодоров, дб

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящата научна разработка бе да установим молекулните механизми на мутагенеза при български пациенти със синдром на Ангелман (AS). Изследвахме 24 пациента (11 момичета и 13 момчета) от 22 неродствени семейства с предполагаема клинична диагноза AS. При 9 от семействата (41%) намерихме патогенен молекулен дефект, с което потвърдихме на молекулярно-генетично ниво клиничната диагноза AS. Използвахме съвременни молекулярно-генетични техники- директно секвениране, MLPA и MS-MLPA анализи. Открихме разнообразни молекулни механизми на мутагенеза при българските семейства, които включват делеция на майчиния 15q11-q13 регион, точкови мутации в *UBE3A* гена, бащина унипарентна дизомия и импринтинг дефект. При 4 (44%) от доказаните семейства открихме делеция на майчиния 15q11-q13 регион с точки на счупвания BP1-BP3 или BP2-BP3. При 1 (11%) от доказаните семейства открихме импринтинг дефект- делеция на AS-SRO регулаторния регион, който е част от PWS-AS импринтинг центъра. Такава микроделеция води до липса на метилиране в 15q11-q13 региона и до свръхекспресия на гените в AS критичния регион. При 1 (11%) от доказаните семейства открихме рядка находка - бащина унипарентна дизомия, където пациентът не унаследява *UBE3A* ген от майката. При 3 (33%) от доказаните семейства открихме 3 различни точкови мутации в *UBE3A* гена- две миссенс мутации с.488T>C; p.Leu163Ser и с.1832A>T; p.Gln611Leu (описани за първи път от нашата изследователска група) и една фреймшифт мутация с.2576\_2579delAAGA; p.Lys859Argfs\*4 (публикувана в литературата). Получените данни хвърлят светлина и подкрепят хипотезата, че специфичната нуклеотидна архитектура в съответните части от гена определя по-висока вероятност за грешки на ДНК полимеразата и генерирането на точкови мутации в съответните участъци. Получените резултати ни помогнаха да разработим системен диагностичен алгоритъм, с което осигурихме възможност за поставяне на правилна диагноза при пациентите. Комбинирането на отлични познания за молекулните механизми на мутагенеза и точна молекулярно-генетична диагноза дава възможности за адекватна генетична консултация и профилактика на заболяването при засегнатите семейства с AS.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Павлова З, Тодоров Т, Атемин С, и др. Молекулни механизми на мутагенеза при български пациенти със синдром на Ангелман. Трети Докторантски Симпозиум „Молекулярна биология – от молекулите до клетките и обратно“. Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, 7-8 март 2019г., гр. София. Книжка с абстракти, стр. 31, Постер 3.
- Georgieva B, Atemin S, Todorova A, et al. Molecular-genetic diagnostics of Angelman syndrome – the Bulgarian experience. Acta Medica Bulgarica 2020;47(1).

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на Съвета по медицинска наука.

**Договор 57/2018**      **Микробиологични и генетични проучвания върху антибиотичната резистентност при *Streptococcus pyogenes* и други бета-хемолитични стрептококи**

**Изследователски екип:** : Доц. Райна Цветанова Гергова, дм

- Чл. кор. Проф. Иван Митов, дм, дмн
- Доц. Румяна Марковска-Давидкова, дм,
- Ас. Адиле Мухтарова
- Ас. Вирна Мария Циту
- Проф. Радка Кънева, дб
- Калина Михова, биолог

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на проучването е: да бъде проучена резистентността към макролидите, линкозамидите, тетрациклините, хинолоните при бета-хемолитичните стрептококи от групи А (GAS) и В (GBS) с помощта едновременно на фенотипни и генотипни методи. За осъществяване на тази цел е използвана колекция от 449 клинични изолата *Streptococcus pyogenes* (GAS), колекционирани през периода 2013г.-2018г. и 107 *Streptococcus agalactiae* (GBS), от 2017 - 2018. Настоящото проучване показва, че 31.5% от щамове GAS и 58,88% от GBS бяха макролид-резистентни и 14% GAS, респ. 16% GBS са с намалена чувствителност към клиндамицин. Резистентни към тетрациклин/хинолони са 10.3%/0% GAS и респ. 94.62% /10.28% GBS. За първи път в България е открит и секвениран нов ген, *msr(D)*, който се оказва водещ за нивото на макролидната резистентност при M-фенотипна изява и се среща при всички GAS с *mef(A)*, Важно значение има откриването за първи път в България, на връзка между бързо нарастващата макролидна резистентност през последните години, изолатите с *ermB*, кодиращ високо ниво на резистентност и появата на проблемен клон *emm28*, чиито антигени се съдържат в 30 валентната ваксина. Ваксината е във финален етап на изпитване и покрива всички доказани в проучването серотипове на българските макролид резистентни изолати GAS. Въпреки хетерогенността, която се откриваше при *ermA+* щамове, може да се каже, че типове *emm12* и *emm77* бяха преобладаващи. В настоящото проучване генът *tet(M)* беше преобладаваща генетична детерминанта при тетрациклин-резистентните щамове в 85% и се установяваше, както при макролид - чувствителните, така и при макролид-резистентните GAS. По-рядко се срещаше *tet(O)*, в 15%, но по-често корелираше с макролидната резистентност. Тревожна е тенденцията за възходяща градация в макролидната резистентност при български клинично-значими изолати бета-хемолитични стрептококи групи А и В, както и факта, че повече от 22% от изследваните български изолати GBS са вече MDR. Това показва, че три от антимикробните групи, считани за подходящи за лечение на стрептококови инфекции, стават неефективни.

**Научни публикации и прояви:**

- Мухтарова А, Гергова Р, Митов И. Еволюция на макролидната резистеност при български клинични изолати *Streptococcus pyogenes* през периода 2013-2018г. Здраве и наука, бр. 1-2, 2019, 21-25
- Мухтарова А. Микробиологични и генетични проучвания върху клинични изолати *Streptococcus pyogenes*, дисертационен труд, София, 03.12. 2018 г. Научен ръководител: доц. д-р Райна Цветанова Гергова.

- Muhtarova A, Mihova K, Markovska R, et al. Molecular *emm* typing of Bulgarian macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2019;1-4; DOI: 10.1556/030.66.2019.033 (IF<sub>2018</sub> - 1.107)
- Muhtarova A, Gergova R, Markovska R, et al. "Macrolide resistance and *emm* type distribution of group A streptococcal isolates from Bulgarian patients" 14 конгрес на микробиолозите в България с интернационално участие, Хисаря, Октомври, 10 -13 2018

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на Съвета по медицинска наука.

**Договор 58/2018      Участие на ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>C</sub> рецепторите в генерирането на осцилаторните потенциали в ON- и OFF-отговора на електроретинограмата**

**Изследователски екип:** Доц. Петя Николова Купенова-Шербанова, дм

- Доц. Елка Йорданова-Попова, дм
- Проф. Лилия Витанова, дмн
- Веселина Михайлова, студент
- Александър Александров, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** За да изясним участието на GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> рецепторите в генерирането на осцилаторните потенциали в ON- and OFF-отговора на електроретинограмата (ON-OPs и OFF-OPs), ние напълно разделихме ON- and OFF-отговора в електроретинограмата (ЕРГ) на жаба (*Rana ridibunda*), използвайки светлинни стимули с голяма (3s) продължителност, представяни през 30s в условия на тъмно. Изолирахме осцилаторната активност посредством честотно филтриране (честотна лента 20-300 Hz). Проследихме ефектите от селективна блокада на GABA<sub>A</sub> рецепторите с bicuculline (1μM, 10 μM 50 μM) и на GABA<sub>C</sub> рецепторите с TRMPA (1μM, 10 μM, 100μM). Блокадата както на GABA<sub>A</sub>, така и на GABA<sub>C</sub> рецепторите предизвикваше значително увеличение на амплитудата на b-вълната (ON-отговор) и d-вълната (OFF-отговор) в ЕРГ. Ефектите от двата вида блокада показаха, обаче, значителни различия по отношение на осцилаторните потенциали, насложени върху b-вълната и d-вълната, като ранните OPs (O<sub>1</sub>-O<sub>3</sub>) и последващите ги късни OPs показаха различна фармакологична реактивност. Блокадата на GABA<sub>A</sub> рецепторите предизвикваше увеличение на амплитудата на ранните OPs както на ON, така и на OFF- отговора, а потискане до изчезване на късните OPs. Блокадата на GABA<sub>C</sub> рецепторите повлияваше само ON-OPs, като увеличаваше амплитудата както на ранните, така и на късните OPs. Проведеното от нас имуноцитохимично изследване показва специфично разпределение на субединици на двата вида йонотропни рецептори в ON- и OFF- подслоеве на вътрешния плексиформен слой, подкрепящо електрофизиологичните данни. То дава основание и за хипотези за възможни нервни мрежи от сериални синапси с участие на хоризонтални, или амакринни клетки, които биха могли да са генератори на осцилаторна електрична активност. Получените резултати показват, че както GABA<sub>A</sub>, така и GABA<sub>C</sub> рецепторите вземат важно участие в генерирането на осцилаторните потенциали в електроретинограмата, като се наблюдава изявена ON/OFF асиметрия в ефекта им върху електричната осцилаторна активност.

**Научни публикации и прояви:**

- Kупenova P, Popova E, Mihaylova V. GABA-A receptor-mediated modulation of oscillatory potentials in the ON- and OFF-response of the frog electroretinogram. Bulgarian Society of Physiological Sciences – Sofia branch: Scientific meeting 23 November 2018, Sofia, Bulgaria.

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

**Договор 59/2018      Новогенерационно секвениране на прицелни гени за идентификация на генетични мутации при български пациенти с фамилни форми на хематурия**

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

- Гл. ас. Галя Златанова-Рашкова, дм
- Доц. Полина Митева-Шумналиева, дм
- Доц. Валентин Лазаров, дм
- Доц. Мария Гайдарова, дм
- Гл. ас. Димитър Русинов, дм
- Калина Михова
- Дарина Качакова-Йорданова, дб
- Проф. Радка Кънева, дб
- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Хематурията, присъствие на еритроцити в урината, може да бъде симптом на множество заболявания, в това число и генетично-обусловени аномалии в структурата на гломерулната базална мембрана. Етиологията на наследствените хематурии не е напълно изучена, а гените с доказана роля в патогенезата са с много големи размери, което затруднява генетични изследвания. Технологиите на новогенерационното секвениране предлага решение на тези два проблема. В рамките на настоящето проучване, четирима пациента с данни за фамилна история на заболяването бяха изследвани с екзомния панел TruSight One (Illumina). При двама от болните бяха установени мутации в гена *COL4A5*, което позволи поставяне на диагноза X-свързана форма на синдром на Алпорт при засегнатите индивиди от мъжки пол. В единия случай става въпрос за ново-описана замяна, засягаща сплайс място в края на екзон 30, с.2509+2T>G. Вариантът отсъства от големите геномни бази данни и сегрегира с болестта в семейството, което ни дава основание да го определим като патогенен. Вторият вариант в *COL4A5* е известна патогенна мутация, която се асоциира с относително по-лека форма на заболяването, р.Gly624Asp. При двама от изследваните пациенти не бяха открити мутации в нито един от гените за колаген тип IV. За сметка на това идентифицирахме два варианта в други гени, с потенциален принос към хематурията – р.Gly34Arg в *CIQC* и р.Gly191Arg във *FGG*. Мутациите в *CIQC* и *FGG* са свързани с автозомно рецесивни заболявания, съответно C1Q дефицит и дисфибриногенемия. Макар и нетипичен симптом, хематурия е описана при пациенти страдащи и от двете заболявания. При болните в нашето изследване тези варианти се намират в хетерозиготно състояние. В този смисъл, те не могат да обяснят напълно появата на болестта, но доказано патогенния им характер ги прави добри кандидати за фактори, модифициращи клиничната изява. Резултатите от прочуването ни

позволяват да заключим, че прицелното екзомно секвениране е надежден и чувствителен метод за генетичен анализ при пациенти с фамилни форми на хематурия.

**Научни публикации и прояви:**

- Beltcheva O, Kamenarova K, Mihova K, et al. Next generation sequencing approach for determining the molecular basis of familial hematuria. European Human Genetics Conference, Gothenburg, Sweden, June, 15-18, 2019

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

**Договор 60/2018      Високорезолютивен геномен скрининг за небалансирани геномни изменения на преходноклетъчните карциноми на пикочния мехур**

**Изследователски екип:** Гл.ас. Олга Сергеевна Антонова, дб

- Чл. кор. проф. Драга Тончева-Митева, дб
- Доц. д-р Савина Хаджидекова, дм
- Гл.асист. Рада Станева Цветкова
- Ас. Борис Младенов
- Гл. асист. Драгомира Николова, дб
- Ас. Виктория Спасова, докторант
- Ас. Михаил Ганев, докторант
- Зора Хамуде, дб
- Десислава Нешева, дб

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване е да се изследват преходноклетъчни карциноми от пикочен мехур чрез цялостно геномно сканиране за разкриване на небалансирани геномни микроаберации (вариации в броя копия) свързани с туморната прогресия и метастазирание; да се задълбочат проучванията на вече установени хромозомни райони и гени свързани с туморогенезата. В хода на проекта са използвани съвременни високорезолютивни молекулно-генетични техники - олиго ДНК микрочипове и SNP-микрочипове, рутинно прилагани при диагностиката на системни генетични заболявания. Установени са бщо 512 аберации – 173 делеции и 337 дупликации, като най-висок генетичен дисбаланс се разкрива в хромозомните райони 1p, 1q, 2q, 4p,4q, 5q, 6p, 6q, 8q, 9p, 9q, 10p, 11q и 17q. Сред посочените региони се детектират 12 значими региона, съдържащи гени с туморна прогресия, метастатичен и пролиферативен потенциал, както и 5 региона със загуба на хетерозиготост (LOH), съдържащи 176 гени. Установен е статус на туморите по отношение на мутции в *FGFR3* и *CDKN2A/CDKN2B*. Получените резултати имат научно-приложно значение, тъй като разкриват фенотип – генотип корелации при изследване на геномна нестабилност на уроепителни тумори и дефинират гени, които са потенциални мишени за таргетна терапия. Резултатите от това изследване допринасят за изясняване механизма на туморната инвазия в резултат на генетичен дисбаланс, чрез активация на гени с метастатичен и пролиферативен потенциал, както и за подбор на гени от региони със загуба на хетерозиготост за оценка на ролята им като потенциални тумор-супресорни гени. Определянето на генетичните дисбаланси на уроепителните тумори все още се намира на стадий научно – лабораторни изследвания и не се прилага като част от рутинната грижа за пациента. Детерминирането на конкретни хромозомни региони – с дупликация/амплификация свързани с метастатичен потенциал на уроепителните тумори,

чрез молекулно-генетични техники за определяне на копийни варианти (олиго ДНК микрочипове и SNP-микрочипове) рутинно използватни при диагностика на системни генетични заболявания, позволява лесно въвеждането им в клиничната практика при лечение на уроепителни заболявания.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Антонова О, Младенов Б, Рангелов С, и др. Перспективи за таргетна терапия при лечение на злокачествени уроепителни заболявания на пикочния мехур: Годишник по болнична фармация, 2018; 4 (1): 11-17.
- Антонова О. Личен научен опит в стремежа към по-добро лечение на рак на пикочния мехур. НАУКА: 2018, 5: 65-66
- Антонова О. В търсене на невидимите отговори за повлияване на социално-значими заболявания. Европейската нощ на учените, София, България. 27.09.2019. Наука, 2019(5)
- Антонова О, Младенов Б, Рангелов С и др. Възможностите на съвременните генетични методи за подобряване на клиничната прогноза при пациенти с рак на пикочния мехур. XIII Национален конгрес по урология. 30.5-1.6.2019, гр. Правец, България. Уронет, 2019 (2): 81-82
- Antonova O, Mladenov B, Rangelov S, et al. Clinical impact of copy number variation changes in bladder cancer samples. Exp Therap Med 2021; 22: 901
- Antonova O, Mladenov B, Rangelov S et al. Molecular signature for improvement of clinical prognosis accuracy in superficial bladder cancer, ESHG. Gotheborg, Sweden. 15-18.06.2019. Eur J Human Genetics. 2019; 27(2): 1539.
- Antonova O. Personal scientific experience on the quest for better bladder cancer treatment. program Bulgarian Young Scientists, 27-29.06 JRC Ispra.
- Antonova O, Staneva R, Ganev M et al. Detection of CNV's for unbalanced genomic alterations of transient cell carcinoma of the bladder. Second Young Scientists Seminar on Genetics with international Participation. 3-5.10.2018, Sofia, Bulgaria
- Antonova O, Rangelov S, Hammoudeh Z et al. Evolution of chromosomal aberrations in patients with bladder cancer: from blood to bladder tumors. 13 Balkan Congress of human genetics. Edirne, Turkey. 17-20.04. 2019.

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

#### **Договор 61/2018      Роля на канабиноидната и серотонинергичната невротрансмитерни системи върху ноцицепцията, предизвикана от топлинен стрес при плъх**

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

- Проф. Александър Стойнев, дмн
- Доц. Роман Ташев, дм
- Доц. Радка Тафраджийска, дм
- Асист. Мимоза Цветкова
- Асист. Зафер Амед Сабит
- Алфа Матю, студент
- Мартин Диков, студент

**Базова организация:** 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. 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. Получените резултати потвърдиха хипотезата на научния екип: ендогенната канабиноидна и серотонинергичната невротрансмитерни системи си взаимодействат и взаимно повлияват болковата перцепция след топлинен стрес. Съвместното въвеждане на АЕА и DPAT при животни след 1ч топлинен стрес (1 ч ТС) повишава болковия праг на експерименталните животни спрямо този на животните след 1ч ТС. Антагонизирането както на канабиноидните CB1-рецептори с AM251, така и на 5HT<sub>1A</sub>-рецепторите с NAN непосредствено след края на 1ч ТС и преди въвеждането на АЕА и DPAT променя описаното по-горе взаимодействие между агонистите и понижава болковия праг спрямо този на животните след 1ч ТС. 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. Нашите изследвания включваха въвеждането на агонисти/антагонисти на канабиноидните рецептори преди агонистите/антагонистите на серотонинергичните рецептори. Интересно би било да се проследи ефектът върху болковата перцепция при въвеждане на агонисти/антагонисти на канабиноидните CB1-рецептори след агонистите/антагонистите на серотониновите рецептори. Интерес би представлявало също така проследяването на взаимодействието на двете системи – ендогенна канабиноидна и серотонинергична, като въвеждането на агонистите/антагонистите на съответните рецептори става преди индуцирането на стреса, а не след неговия край – както заложено по настоящия проект.

**Научни публикации и прояви:**

- Nocheva H, Sabit Z, Bakalov D, et al. Interactions between the cannabinoid and the serotonergic systems in modulation of pain perception. *Pharmacia* 2021;68:109-115.
- Evtimova Y, Mihaylova V, Angelov I T, et al. Serotonergic and endogenous cannabinoid systems interact in modulation of heat stress-induced analgesia. XVII International Congress of Medical Sciences. Sofia. 09-12 May-2019. p89.

Научният отчет е приет с **ОТЛИЧНА** оценка по скалата на Съвета по медицинска наука.

**Договор 62/2018 miRNA предиктивен профил за оценка на риска от сърдечно-съдови усложнения при захарен диабет тип 2**

**Изследователски екип:** Доц. Иванка Исталианова Димова, Доктор

- Гл.ас. Жейна Чернева
- Гл.ас. Радостина Чернева
- Румяна Додова, Магистър, биолог



- Силва Гирагосян, Магистър, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Откриването на miRNAs като обещаващи нови биомаркери в областта на сърдечно-съдовите заболявания предизвика големи очаквания. Стабилността в кръвообращението, специфичната регулация, както и високата чувствителност и специфичност предполагат, че приложимостта на miRNAs като биомаркери за ССЗ може дори да измести биомаркерите на базата на протеини. Наскоро изследванията на циркулиращи ендотелни клетки и ендотелни прогениторни клетки разшири спектъра на клетъчните биомаркери, способни да предоставят ценна информация в редица клинични състояния, включващи съдови увреждания, които са най-честите усложнения при диабет. В нашето проучване си поставихме за цел да анализираме чрез PCR в реално време: 1) mRNA експресията в клетки от периферна кръв на *VEGFR2*, който в най-голяма степен е признат като специфичен маркер за идентифициране на ендотелната линия, и на *VEGFR1* (маркер за хемопоеични стволови клетки) при пациенти със захарен диабет тип 2 и различна давност на заболяването; 2) miRNA експресията в плазма на пациенти с диабет и ССЗ (таргетна група) и пациенти с диабет и без ССЗ (контролна група). Генно-експресионният анализ показва средни относителни нива от 1.77 за *VEGFR2* при пациентите в сравнение с контролите, без да има статистически значима разлика; за *VEGFR1* беше установено статистически значимо намаление (0.59 пъти) в неговата експресия при пациентите. При подгрупите с различна давност на диабета, установихме средна експресия за *VEGFR2* в клетки от периферна кръв, съответно 1.09 при ново-диагностициран диабет, 2.36 при пациенти под 5 годишна-давност и 2.80 при пациенти с над 5-годишна давност на диабета; за *VEGFR1* съответно – 0.62, 0.49 и 0.59. Установено беше статистически значимо намаление на *VEGFR2* експресия ( $p < 0.05$ ) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без това усложнение – 0.33 срещу 2.18. Ендотелните прогениторни клетки могат да бъдат оптимален кандидат за лечение на диабетната невропатия, тъй като те притежават паракринни свойства, които включват както ангиогенни, така и невротрофични ефекти. Резултатите от miRNA изследването показаха значимо повишена експресия на miR-16, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-210, miR-221 и miR-424 в плазма при пациенти с диабет и ССЗ в сравнение с пациентите без ССЗ. Оценката на риска от ССЗ, подкрепяна от нови циркулиращи биомаркери, като miRNAs, е важна за стратифициране на индивидите с висок риск, за оптимизиране на стратегиите за лечение и за повишаване на разбирането ни за основната биология.

**Научни публикации и прояви:**

- Димова И, Димова Р, Гирагосян С, и др. Експресия на съдово-ендотелния маркер VEGFR2 при пациенти със захарен диабет тип 2. Сп. Военна медицина 2019

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

**Договор 64/2018** Как вроденият системен лупус при мишки влияе на качеството на овоцитната мейоза – експериментален миши модел за изследване на яйцеклетки, добити след хормонална стимулация, и такива, подложени на *in vitro* зреене

Изследователски екип: Проф. 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, дб
- Ас. Никола Младенов
- Доц. Андрей Чорбанов, дб – БАН
- Гл. ас. Калина Николова-Ганева, дб – БАН
- Гл. ас. Николина Михайлова, дб, БАН
- Силвия Брадянова, докторант, БАН

**Базова организация:** Катедра Биология, ул. 'Здраве' 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото изследване беше да се проследи качеството на овогенезата при мишки от линията MRL/lpr, спонтанно развиващи системен лупус. За целта бяха изследвани цитоскелетните и хроматиновите структури на овоцити от мишки в различни стадии от развитието на болестта. Приложени бяха следните методи: хормонално стимулирана овулация и IVM на нераждали и раждали лупусни мишки. Резултатите бяха сравнени с данни от здрави BALB/c мишки. Хроматиновите, тубулиновите и актиновите структури в овоцитите бяха визуализирани съответно с Hoechst 33258, анти алфа-тубулиново антитяло и фалоидин, конюгиран с TRITC. Степента на зрялост на овоцитите, получени от двете групи мишки беше близка – 47,4% за нераждалите срещу 47,1% за раждалите. Качеството на цитоскелета и хроматина обаче драстично се различаваше. Нераждалите мишки имаха нормални вретена при 22% от овоцитите в метафаза I и 16% в метафаза II. Актиновите шапки бяха нормални при около 65% от овоцитите на тази група мишки. Възрастните раждали мишки показаха много по-лоши резултати. При тях само 9% от незрелите и 7,5% от зрелите овоцити имаха нормално вретено. В тази група бяха отчетени и по-голям брой дезорганизиран и разрушен вретена. Качеството на хромозомите за двете групи мишки беше близко, но раждалите имаха по-голям дял дегенерирани хромозоми. След *in vitro* зреене се наблюдаваше влошаване на качеството на овоцитите по всички изследвани показатели. Мишките от линия MRL/lpr с вроден системен лупус могат да заченат и родят само един път през живота си. Нашите резултати показват, че това вероятно е свързано с разстройване на мейозата след първата бременност, водещо до рязко влошаване на качеството на цитоскелета и хроматина.

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

**Договор 65/2018** Изследване на характерни за овогенезата преобразувания на хроматина – хроматидна кохезия и кондензация, съпоставени с ДНК-метиране, при *in vivo* и *in vitro* зреещи миши овоцити

**Изследователски екип:** Доц. Ралица Стефанова Живкова, дб

- Проф. Стефка Делимитрева, дб
- Доц. Майя Маркова, дб
- Ас. Валентина Хаджинешева, дб
- Гл. ас. Венера Николова, дб
- Гл. ас. Ирина Чакърва, дб
- Доц. Милена Мурджева-Андонова, дб, консултант – БАН, ИБИР

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на изследването е да се проследят епигенетични преобразувания на хроматина и връзката им с неговата опаковка в зреещи миши овоцити. За целта са получени овоцити на различен етап от мейотичното зреене, в тях ДНК е оцветена с флуохрома DAPI за оценка на състоянието на хроматина и чрез непряка имунофлуоресценция със специфични антитела са локализирани 5-метил-цитозин, *de novo* метил-трансферази DNMT3a и DNMT3b и кохезини. Реакцията за 5-метил-цитозин в незрелите профазни овоцити е асоциирана с хетерохроматина, но впоследствие при прехода към метафаза силно отслабва. Метил-трансферазите DNMT3a и DNMT3b в началото на овоцитното зреене образуват струпване в областта на ядрената обвивка с проникване към хроматина, впоследствие се разпростират по цялата ядрена периферия (DNMT3a и в цитоплазмата), запазват тази локализация през метафаза I и наново се асоциират с хромозомите през метафаза II. Кохезиновата реакция първоначално е асоциирана с хроматина, но постепенно отслабва с напредването на овоцитното зреене и при прехода към метафаза се измества към периферията на делителното вретено. Не се наблюдават разлики между *in vivo* и *in vitro* зреещи овоцити. От ограничената в хетерохроматина реакция за 5-метил-цитозин в профазните овоцити и допълнителното ѝ отслабване с прехода към метафаза може да се направи извод, че по време на мейотичното зреене геномът на овоцитите се деметилира, за да се отмени епигенетичната репресия и да се постигне тотипотентност. Деметилирането се потвърждава от отдръпването на метил-трансферазите от хроматина към ядрената периферия и цитоплазмата и задържането им в тази област и след разпадането на ядрото, вероятно чрез свързване с неуточнена перинуклеарна структура. Вторичното асоцииране на метил-трансферазите с хромозомите в зрелите овоцити предполага подготовка за модифициране на хроматина при евентуално оплождане. Сходството на резултатите при *in vivo* и *in vitro* зреене показва, че епигенетичните преобразувания на хроматина закономерно и възпроизводимо съпровождат различните етапи на овогенезата независимо от конкретните обстоятелства.

**Научни публикации и прояви:**

- Hadzhinesheva V, Chakarova I, Delimitreva S, et al. Centriolar satellites associate with condensed chromatin in early mouse oocytes and undergo redistribution during transition to dictyate. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2018; 32(6):1622-6

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

**Договор 66/2018 Проучване ефектите на селективния мелатонинергичен препарат агомелатин върху възпалителните процеси и морфологични промени в мозъчни структури при модел на Болестта на Алцхаймер у мъжки плъхове**

**Изследователски екип:** Проф. Николай Еленков Лазаров, дмн

- Доц. Димитринка Атанасова-Димитрова - БАН
- Проф. Яна Чекаларова - БАН
- Гл. ас. Ангел Дандов
- Ас. Тодор Киров
- Мария Динкова, студент
- Алберт Градев, студент
- Събина Митова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на финансирания проект е да се изследва ефикасността на атипичния антидепресант от ново поколение, аналог на мелатонин агомелатин върху поведенческите и морфологични промени в някои мозъчни структури в модел на болестта на Алцхаймер (АД). Проучвания върху експериментални животни и хора показват, че редица невродегенеративни заболявания, включително АД, се характеризират с развитие на възпалителни процеси и морфологични промени в някои мозъчни структури като част от тяхната патофизиология. Нашите предишни резултати, при които е установено, че агомелатинът показва мощен невропротективен, противовъзпалителен и антидепресивен ефект върху съпътстващите поведенчески аномалии в модела на темпоралната епилепсия при плъхове, ни даде основание да изследваме работна хипотеза, според която това лекарство има благоприятен ефект върху емоционален статус и познание, от една страна, и морфологични нарушения, от друга страна, в спорадичен модел на АД, индуциран от icv стрептозотоцин (STZ-ICV) при плъхове Wistar. За постигане на целта бяха приложени следните методи: имплантиране на канюли в двете странични вентрикули и два пъти инфузиран (STZ) (модел на АД), фармакологичен подход, свързан с хронично лечение с агомелатин 40 mg / kg, поведенчески тестове за депресия (захароза) и тест принудително плуване (FST), тревожност (тест повдигнат кръстосан лабиринт, ЕРМ) и пространствена памет (осем раменен радиален лабиринт, RAM), морфологични и хистологични методи. Повтарящото се лечение с агомелатин има благоприятен ефект върху емоционалния статус, зависимата от хипокампуса пространствена памет в STZ-индуцирания АД модел при плъхове Wistar. За разлика от други модели, при които сме открили мощни невропротективни и противовъзпалителни ефекти в лимбичните структури, агомелатинът има ограничен и незначителен ефект върху морфологичните нарушения в мозъчните структури, наблюдавани в STZ-индуциран АД модел. В заключение, агомелатинът влияе върху поведенческите аномалии, чийто ефект не е медиран от невропротекция в лимбични структури. Необходими са бъдещи проучвания, за да се идентифицират специфичните механизми, участващи в ефектите на агомелатина в STZ-индуцирания модел на спорадични АД.

**Научни прояви и публикации:**

- Dandov A, Atanasova M, Tchekalarova J, et al. Influence of agomelatine in the streptozotocin-induced model of rat in Alzheimer's disease. VIIth National Conference with international participation "Morphological Days", Sofia, Bulgaria, June 8 – 10, 2018.
- Atanasova M, Ilieva K, Tchekalarova J, et al. Preclinical evidence for therapeutic potential of antidepressant agomelatine in Alzheimer's disease and epilepsy. Satellite Alzheimer Symposium in partnership with University of Pittsburgh, Varna, Bulgaria, October 19-20, 2017.

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

**Договор 67/2018**    **Изследване на влиянието на мезембринови алкалоиди върху поведенчески и ендокринни изменения при остър и хроничен имобилизационен стрес у плъхове**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Александър Георгиев Стойнев, дмн

- Доц. д-р Радка Хаджиолова-Тафраджийска, дм
- Доц. Даниела Пехливанова, дб, БАН
- Проф. Страхил Берков, дб, БАН
- Доц. Яна Чекаларова, дб, БАН

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Растенията, съдържащи мезембринови алкалоиди, се прилагат за поддържане на чувството за благополучие у здрави хора, както и за третиране при безпокойство, стрес и депресивно разстройство. Ние проучихме ефектите на максимално пречистена фракция мезембринови алкалоиди (MZM) от *Narcissus cv. "Hawera"* върху прояви на остър и хроничен имобилизационен стрес свързани с изследователската активност, състоянието на тревожност, болковата чувствителност, глюкозното ниво, и масата на слезката и надбъбречната жлеза у зрели мъжки плъхове Wistar. Изследователската активност беше определяна чрез open field test, тревожното поведение – чрез elevated plus maze, болковата чувствителност – чрез paw pressure test. Посредством комбинация от газова хроматография с мас-спектрометрия (GC-MS) в алкалоидната фракция екстрахирана от *Narcissus cv. "Hawera"* беше установено 64.1 % съдържание на мезембренон. Острият имобилизационен стрес засили поведението на безпокойство без значима промяна в общата двигателна активност (open field test) и повиши умерено, но значимо, глюкозното ниво. Единично пре-третиране с MZM 20 mg/kg, значимо редуцира поведението на безпокойство в сравнение с контролната и стресираната групи. Хроничният имобилизационен стрес повиши двигателната активност и намали поведението на безпокойство, като пре-третирането с MZM премахна стрес-индуцираната двигателна свръхактивност, но засили анксиолитичния ефект. Пре-третирането с MZM понижи кръвното ниво на глюкозата у стресираните животни. Настоящите резултати свидетелстват, че мезембриновите алкалоиди значимо потискат тревожното поведение и нормализират кръвното глюкозно ниво у плъхове при остър имобилизационен стрес.

**Научни публикации и прояви:**

- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Anxiolytic effects of the mesembrenone in rats. International Congress of Medical Sciences, May 9<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, 2019, Sofia, Bulgaria.
- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, Tafradjiiska R, Nikolova M, Stoynev A, Berkov S. Effects of mesembrenone rich alkaloid fraction from *Narcissus cv. "Hawera"* on the Anxiety and depression-like behavior in stressed rats. European College of Neuropsychopharmacology, 07 - 10 Sep, 2019, Copenhagen, Denmark.

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

**Договор 68/2018**      **Ролята на възпалението, оксидативния и хемодинамичния стрес за развитието на пулмонална хипертония при пациенти с ХОББ**

**Изследователски екип:** Доц. Валентин Стойчев Лозанов, дб

- Ас. Весела Лозанова
- Доц. Росен Петков
- Гл. ас. Радостина Чернева, дм
- Гл. ас. Жейна Чернева, дм -МВР – София

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Проучването бе проведено при 104 клинично стабилни пациенти (64 мъже, 40 жени; средна възраст  $62,9 \pm 7,5$ ) диагностицирани с ХОББ. Всички пациенти бяха подложени на основни клинични изследвания – рентгенография, спирометрия, електрокардиограма, ехокардиография и лабораторни тестове за определяне на нивата на 8-изо простагландин F<sub>2α</sub> и простагландин E<sub>2</sub> в урина и резистин в плазма. Основните изводи от изследването могат да се обобщат в следното: Деснокамерната диастолна дисфункция допринася за екзацербациите, прогресирането и намаления физически капацитет на пациентите с ХОББ, което изисква нейното ранно диагностициране и лечение. Нашите резултати показват, че пациентите с нетежък ХОББ са с висока честота на стрес-индуцирана деснокамерна диастолна дисфункция (78%). Структурните промени на дясното сърце (RAVI, RWT) корелират със стрес-индуцираната деснокамерна диастолна дисфункция и намаления физически капацитет. Тъй като нито един от параметрите на кардио-пулмоналното тестване не корелира с ехокардиографските параметри по време на натоварване, за ранната диагностика на деснокамерната диастолна дисфункция, се препоръчва използването на стрес-ехокардиография.

**Научни публикации и прояви:**

- Чернева Р, Чернева Ж, Господинова М, и др. Деснокамерни структурни промени, деснокамерна дисфункция и физически капацитет при пациенти с нетежък ХОББ, оригинална статия. Българска кардиология. 2019;1:1-11.
- Чернева Р, Чернева Ж, Господинова М, и др. Ролята на стрес ехокардиографията и кардио-пулмоналното тестване за диагностициране на субклинична левокамерна диастолна дисфункция при пациенти с нетежък ХОББ, оригинална статия. Българска кардиология. 2019;1:12-19.
- Чернева Р, Чернева Ж, Господинова М, и др. Ролята на стрес ехокардиографията в комбинация с кардио-пулмоналното тестване за ранна диагностика на диастолна дисфункция при пациенти с нетежък ХОББ, оригинална статия. Съвременни медицински проблеми. 2018;4:5-15.
- Чернева Р, Чернева Ж, Господинова М, и др. Индекс за деснопредсърден обем и стрес-индуцирана деснокамерна диастолна дисфункция при пациенти с нетежък ХОББ, оригинална статия. Съвременни медицински проблеми. 2019;1.
- Cherneva Z, Gospodinova M, Denchev S, et al. Stress echocardiography for left ventricular diastolic dysfunction detection in patients with non-severe chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. Croat Med J 2019;60(5):449-457.
- Cherneva R, Cherneva Z. The Role of Stress Echocardiography in the Early Detection of Diastolic Dysfunction in Non-Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. Arq Bras Cardiol 2021,116(2):259-265.
- Cherneva Z, Gospodinova M, Cherneva R, et al. Prognostic value of hyperglycaemia and inflammation in patients with acute coronary syndrome. Acute Cardiovascular Care Congress, 3-5, March, 2018, Milan, Italy
- Cherneva Z, Cherneva R, Valev D, et al. Cardio-pulmonary exercise test indicators of stress left ventricle diastolic dysfunction in non-severe COPD patients. European Respiratory Society Congress, Paris, 15-19 Sept, 2018, P4048.
- Cherneva R, Cherneva Z, Valev D, et al. Right heart structural changes, exercise capacity and stress induced right ventricle diastolic dysfunction in non-severe COPD patients

without pulmonary arterial hypertension at rest. European Respiratory Society Congress, Paris, 15-19, Sept, 2018

- Cherneva Z, Gospodinova M, Denchev S, et al. The role of combined stress echocardiography and cardiopulmonary exercise stress in non-severe COPD patients. EuroEcho Congress, 5-7, December, 2018, Milan, Italy.
- Cherneva Z, Gospodinova M, Denchev S, et al. Right atrium volume index and stress induced right ventricle diastolic dysfunction in non-severe COPD patients. EuroEcho Congress 5-7, December, 2018, Milan, Italy.

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

**Договор 69/2018** Изследване на комбинираното прилагане на Escitalopram и кетогенна диета върху показатели за депресивност и невровъзпаление при експериментални модели на стрес и депресия

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

- Доц. Весела Райкова, дм
- Ас. Наташа Иванова, БАН

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Въпреки постигнатия напредък в терапията на депресивните разстройства, в 30-40% от пациентите се установява фармакорезистентност. Проучвания в последните години доказват, че невровъзпалението има важна роля в патогенезата на депресията. Видна е необходимост от търсене на терапевтични алтернативи. За разлика от изследванията в неврологията, ефектите на кетогенната диета върху патогенетичните механизми на депресията са непроучени. Цел на настоящия проект е оценка на антидепресивния и имуномодулиращ ефект на антидепресанта есциталопрам при самостоятелно или комбинирано прилагане с кетогенна диета в индуциран с липополизхарид (LPS) модел на депресия при плъхове, порода Вистар. След периода на самостоятелно и комбинирано прилагане на есциталопрам и кетогенната диета, експерименталните животни първо бяха обект на няколко поведенчески тестове за депресивност (тест за принудително плуване-FST, тест за консумация на захароза-SPT и тест за потискане на хранене в нова среда-NSFT), последвани от ELISA на мозъчен хомогенат за определяне нивата на IL-1 $\beta$ . Резултатите от проучване показаха, че в експерименталните групи с комбинирано прилагане на есциталопрам и кетогенна диета се наблюдава най-изразен ефект на потискане на показателите за депресивност в поведенческите тестове (FST, SPT и NSFT), в сравнение със самостоятелното им прилагане. Особено внимание привличат данните от ELISA-метода за статистически сигнификантно (\*\* $p < 0.01$ ) редуциране нивата на проинфламаторния цитокин IL-1 $\beta$  в хипокампусите на експерименталните животни под влияние на комбинираното прилагане на кетогенна диета и есциталопрам в сравнение с самостоятелното им прилагане. Представените резултати дават основание да се заключи, че кетогенната диета и антидепресантите от групата на SSRI<sup>s</sup> действат синергично по отношение потискане на депресивната симптоматика и в основата на това вероятно са техните съвместни редуциращи въздействия върху нивата на проинфламаторните цитокини в ЦНС. Данните от изследването свързват психотропните ефекти на кетогенната диета с нейни непроучени невромодулаторни ефекти. Обект на бъдещи проучвания е изясняването на взаимовръзката

между неврометаболитните ефекти на кетогенната диета и въздействията и върху невровъзпалението при депресивните разстройства.

**Научни публикации и прояви:**

- Харитов Е, Кирков В, Киркова М и др. Метаболитни и невропротективни механизми на кетогенната диета. Неврология и психиатрия. 2019;1:36-52.
- Харитов Е, Нацов К, Станчев К и др. Адитивни антидепресивни и имуномодулиращи ефекти от комбинираното прилагане на есциталопрам и кетогенна диета при LPS-индуциран неонатален модел на депресия при плъхове. Неврология и психиатрия. 2019;2.
- Харитов Е, Нацов К, Гаралова М и др. Нисковъглекхидратна диета и афективни разстройства Метаболитни и невропротективни механизми на кетогенната диета. Българско списание за психиатрия. 2019; 2.

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

**Договор 70/2018      Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия**

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

- Константин Гроздев, дм
- Д-р Десимира Миронова
- Калина Каменова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Затлъстяването е хронично, метаболитно затлъстяване. Бариатричната хирургия е златен стандарт в лечението на затлъстяване с ИТМ $\geq$ 40 кг/м<sup>2</sup> или ИТМ $\geq$ 35 кг/м<sup>2</sup> с придружаващо заболяване. Целта на нашето пилотно изследване беше да проследи и оцени промяната в теглото и телесния състав, както и в хормоните, регулиращи апетита и метаболизма при пациенти с високостепенно затлъстяване един месец след бариатрична интервенция. Общо 20 пациента (11 мъже и 9 жени) бях подложени на бариатрична хирургия (стомашен байпас, n=13; ръкавична резекция, n=2; мини байпас, n=5) чрез лапароскопска техника. Следните променливи параметри бяха проследени преди и един месец след операцията: телесна маса (кг), мастна маса (кг и %), активна мастна маса (кг), плазмените/ серумни нива на следните хормони (лептин, адипонектин, грелин, глюкагон подобен пептид-1, пептид YY 3-36). Антропометричните параметри бяха измерени с биоимпеданс Танита BC 420МА. Нивата на хормоните в кръвта бяха измерени чрез ELISA методика (Биовендор, Чешка република). Резултатите сочат средна редукция на телесната маса с 15 кг и на мастната маса с 9 кг. Не се наблюдава промяна в активната мастна маса. Нивата на лептин в кръвта се повишават, докато на останалите хормони установихме намаление в кръвта, без това да е статистически значимо. В заключение, бариатричната хирургия води до значително намаление на теглото още през първия месец след операцията. Този период се оказва твърде ранен за установяване на значителни промени в регулацията на апетита и метаболизма. Най-вероятно редукцията на тегло се дължи на намаления калориен прием, а не на промяна в ситостта, респ. чувството на глад. Бъдещите изследвания трябва да бъдат насочени към изследване на посочените параметри в дългосрочен план.

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



**Договор 71/2018      Проучване ролята на гени, свързани с фамилни ракови синдроми  
върху развитието на множествени първични тумори**

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

- Проф. Радка Кънева, дб
- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Дарина Качакова-Йорданова, дб
- Румяна Додова, дб
- Силва Гирагосян, докторант
- Вероника Петкова, докторант
- Чл. кор. проф. Чавдар Славов, дм, дмн
- Гл. ас. Симеон Рангелов, дм
- Марчела Колева, дм
- Д-р Мирослава Цекова-Чернополска ”
- Ас. Иван Терзиев
- Д-р Адриана Андреева

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

**РЕЗУЛТАТИ:** През последните десетилетия се наблюдава увеличение в честотата и тежестта на протичане на множествената първична неоплазия. Основна роля за развитието на множествени първични тумори (МПТ) имат генетични фактори, хормонални фактори, начин на живот, фактори на средата, инфекции с онкогенни вируси и др. Целта на настоящото изследване бе да изясни ролята на гени, свързани с фамилни ракови синдроми за развитието на МПТ. В изследването бяха включени 12 пациенти с МПТ, от които 6 жени с метахронни/синхронни тумори на гърдата и яйчниците и 6 мъже, развили първични тумори с различна локализация: пикочен мехур и жлъчни пътища; ректум и панкреас; простата и колон; простата и сигма; сигма и стомах; небце, ларинкс/хипофаринкс и база на език, съответно. Девет (75%) от пациентите имаха фамилна история на онкологични заболявания, а 50% (6/12) - ранно начало (<50г.) Мутационният скрининг беше извършен чрез NGS на панел от 94 тумор-асоциирани гени, свързани с фамилни онкологични заболявания, с платформа MiSeq (Illumina). Сред филтриране на суровите NGS данни в групата пациенти бяха открити общо 82 варианти, от които 18.3% (15/82) бяха оценени като клинично значими според базите данни и/или биоинформатичния анализ. В групата на селектираните варианти 53.3% (8/15) имаха неизяснено клинично значение (VUS); 33.3% (5/15) доказан патогенен, а 13.3% (2/15) вероятно патогенен ефект. Най-голям брой патогенни варианти бяха открити в *BRCA1* гена (20%, 3/15), следван от *BRCA2* (6.7%, 1/15) и *CDH1* (6.7%, 1/15), съответно. Двете вероятно патогенни патогенните мутации бяха установени в гена *MLH1*, а VUS - в тумор супресорните гени *PMS1*, *GPC3*, *DIS3L2*, *PRF1*, *STK11*, *DICER1*, *RET*, и *MSH6*. Въпреки, че всички открити VUS бяха оценени като патогенни с програмите за предикция, необходими са допълнителни изследвания за доказване на техния функционален ефект, както и анализи за сегрегация със заболяването в съответните семейства. Като цяло генетичната причина за възникването на МПТ беше установена при 58.3% (7/12) от изследваната група пациенти.

### Научни публикации и прояви:

- Mitkova A, Dodova R, Koleva M et al. Study on the role of genes associated with familial cancer syndromes on the development of multiple primary tumors in Bulgarian patients. ESMO Congress 2019, Translating science into better cancer patient care, Barcelona, Spain - 27 Sep - 01 Oct 2019

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

### Договор 72/2018 Промоторно хиперметиране на тумор супресорни гени при пациенти с рак на гърдата

Изследователски екип: Проф. Светлана Любомирова Христова, дм

- Акад. проф. Ваньо Митев, дбн
- Проф. Радка Кънева, дб
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Румяна Додова, дб
- Силва Гирагосян
- Доц. Теофил Седлоев, дм
- Доц. Свилен Маслянков, дм
- Славяна Ушева
- Мариела Василева, дм
- Ас. Александрина Влахова
- Ас. Тихомир Диков
- Проф. Иванка Димова, дм

**Базова организация:** МУ-София, МФ, Катедра по обща и клинична патология, ул. Здраве 2, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Метирането в промоторните региони на гените променя нивото на тяхната експресия. Сред гените, които обичайно са метилирани при рак на гърдата са *RB1*, *BRCA1*, *MLH1*, *MGMD*, *CDH1* и др. Поради тази причина целта на настоящия проект беше да се определи степента на хиперметиране в промоторни региони на тумор супресорни гени при 50 туморни проби от пациенти с рак на гърдата. На всички проби беше направен MS-MLPA с ME002-C1 Tumour suppressor mix 2 за метилиране в промоторните региони на гените *TP73*, *MSH6*, *VHL*, *RARB*, *CASR*, *IL2*, *APC*, *ESR1*, *CDK6*, *CFTR*, *CDKN2A*, *PAX5*, *PTCH1*, *CREM*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX6*, *WT1*, *CD44*, *GSTP1*, *ATM*, *CADM1*, *PAH*, *CHFR*, *BRCA2*, *RBI*, *MLH3*, *THBS3*, *TSC2*, *PYCARD*, *CDH13*, *TP53*, *PMP22*, *BRCA1*, *STK11* и *KLK3*. Промоторно хиперметиране. Резултатите бяха анализирани с GeneMapper и Coffalyser Net софтуерни програми. Резултатите показаха промени в 10 гена: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RARB*, *ESR1*, *MGMT*, *CD44*, *GSTP1*, *CADM1* и *PYCARD*. Промоторно хиперметиране беше установено в 26% (13/50) от изследваните тумори на гърдата. Нарушенията в метилирането на тези гени се асоциират с рак на гърдата, и могат да бъдат предложени като диагностичен и предиктивен маркер при лечението на туморите на гърдата. Проучването на честотата на тези нарушения, обяснява генетичната причина и дефектите в репарационната система на клетката, свързани с туморогенезата при част от пациентите, които нямат *BRCA* мутации. Получените резултати разшириха генетичните изследвания, свързани с промени в основните гени, асоциирани с предразположение към рак на гърдата в Българската популация. Въвеждането на метилспецифичен анализ за промоторно

хиперметириране повиши възможностите на генетичния анализ с цел подобряване на диагностиката, профилактиката и лечението на заболяването.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Додова Р, Миткова А, Пенчева Д и съавт. Генетични изследвания при наследствен рак на гърдата, доклад на IX научна конференция на тема „Новости в онкологията – III част. Диагностика и лечение на рецидивиращи и метастазирани тумори, 24 – 26 май 2019 г. Слънчев Бряг, България

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

#### **Договор 73/2018    Генетични фактори и клинични характеристики на съдовите усложнения при български пациенти със захарен диабет тип 2**

**Изследователски екип:** Проф. Радка Петрова Кънева, доктор

- Дарина Качакова-Йорданова
- Гл. Асист. Олга Белчева, дм
- Рени Цвеова, дм - Изпълнителна агенция по околна среда
- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн,
- Проф. Радка Аргирова, дмн
- Гл. асист. Лъчезар Лозанов
- Проф. Милена Станева Станева
- Десислава Горчева
- Бойка Костова-Сякулова
- Радослав Борисов
- Станислава Илиева
- Ивайла Желева-Кючукова
- Веселина Колева-Топова
- Цветомир Цветанов

**Базова организация:** МУ - София, Медицински факултет, катедра „Медицинска химия и биохимия“, Център по молекулярна медицина, ул. Здраве 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В пилотно проучване на 80 болни с Т2Д и 20 здрави контроли бяха изследвани 4 полиморфни маркера в 3 гени, CDKAL1, PPARG и KCNQ1, които са показали връзка с предразположението към Т2Д или някои от усложненията свързани с него. Направено беше подробно изследване на основните микро- и макроваскуларни усложнения при пациенти с Т2Д, и свързани лабораторни показатели. Извадката е балансирана по пол (45 мъже и 35 жени), със средна възраст 67 години и средна продължителност на заболяването от 14 години. Установено беше, че най-честите усложнения са невропатия (88.75%); нефропатия (47.50%) и ретинопатия (32.50%). Затлъстяването (81.25%) и артериалната хипертония (96.25%) са свързани и с дислипидемия (70.00%) и повишен холестерол (63.75%), както и с повишената честота на сърдечносъдови заболявания: ИБС (37.50%), инфаркт на миокарда (28.75%); инсулт (25%); коронарна болест на сърцето (18.75%); диабетна макроангиопатия (16.25%) и др. Поради малкия размер на извадката изследването не показва статистически значима асоциация на маркерите с диабет при българските пациенти. Единствено маркерите в CDKAL1 гена показаха тенденция за разлики между болни и контроли. Направеният корелационен анализ показва връзката между полиморфизмите rs7756992 в CDKAL1 и

rs1801282 PPARG P12A и липидния метаболизъм, заради корелацията с нивата на холестерол и ApoB, докато генотипите на rs231362 в KCNQ1 се свързват с бъбречната функция и корелират с лабораторните показатели за албумин и урея. Регресионният анализ насочва към роля на генотипите на полиморфизмите в CDKAL1 и KCNQ1 гена при затлъстяването; CDKAL1 при нефропатия и коронарна болест на сърцето; PPARG P12A при диабетна микроангиопатия. Необходимо е изследване в разширена кохорта от болни и контроли за прецизиране на ролята на изследваните гени за микро и макроваскуларните усложнения при Т2Д.

**Научни публикации и прояви:**

- Лозанов Л. Асоциация между диabetогенния генотип и основните съдови усложнения на захарния диабет тип 2 Ендокринология, 2018, том XXIII, кн.2/2018, 79-85

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

**Договор 74/2018 Аналитично охарактеризиране на лекарствени продукти прилагани при лечение на заболявания на гастроентерологичния тракт – инхибитори на протонната помпа в комбинации с антиинфекциозни средства**

**Изследователски екип:** Доц. Ваня Николова Масларска, доктор

- Доц. Лили Пейкова, дф
- Доц. Мая Георгиева, дф
- Гл.ас. Станислав Божанов, дф
- Ас. Стефка Иванова
- Мишела Стоименова, студент
- Кетрин Стоименова, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** В резултат от проведените анализи са разработени аналитични тестове за идентичност, чистота и определяне на количествено съдържание на следните синтетични смеси на следните лекарствени форми: Metronidazole и Amoxicillin, Tinidazole и Amoxicillin, Amoxicillin, Metronidazole и Omeprazole, Amoxicillin, Metronidazole и Esomeprazole както и Amoxicillin, Metronidazole и Lansoprazole. Методите са оптимизирани на базата на валидационни процедури, съгласно изискванията на Европейска фармакопея 7.0 и критериите на ICH. Тестовете са високо ефективни течно-хроматографски с използване на специализирани консумативи (RP аналитична хроматографска колона 250x4.6 mm) и се отличават с прецизност, точност, висока чувствителност и селективност. Методите са полезни за аналитичната практика, както и за регулаторните институции при контрола на редица новорегистрирани генерични продукти. ВЕТХ определянето дава възможност за адекватно съответствие на съвременните изисквания към контрола на качеството и нивото на познание, което налага решения като формиране на лекарствени профили вече и за широко приложимите в практиката комбинации съдържащи бета лактамни антибиотици в комбинация с представители на нитроимидазоловите производни и инхибитори на протонната помпа.

**Научни публикации и прояви:**

- Стоименова К. Дипломна работа „ВЕТХ метод за количествено определяне на лекарствени смеси Амоксицилин с Тинидазол и Амоксицилин с Метронидазол“, Студентска сесия – 01.12.2018 г.
- Стоименова М. Дипломна работа „Разработване на HPLC метод за определяне на Амоксицилин, Метронидазол, Омепразол – Самостоятелно и в комбинация“, Студентска сесия - 01.12.2018

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

**Договор 75/2018**      **Фенолни съединения от метанолния екстракт на *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson. – структурно охарактеризиране и изпитване за антиоксидантна, анти- $\alpha$ -амилазна, анти- $\alpha$ -глюкозидазна и антилипазна активност**  
**Изследователски екип:** Доц. Параскев Тодоров Недялков, дф

- Гл. ас. Златина Коканова-Недялкова, дф
- Яна Илиева, дф

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Седем фенолни съединения, съответно кумароилхинна киселина **1**, мирицетин-3-О-глюкозид **2**, мирицетин-3-О-галактозид **3**, хиперцерастозид А **4**, метилов естер на хлорогеновата киселина **5**, хиперцерастозид В **6** и хиперцерастозид С **7** са изолирани от надземните части на *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson. Три от тях, съответно съединения **4**, **6** и **7** са нови природни продукти. Структурите на изолираните вещества са идентифицирани чрез различни спектрални методи (1D, 2D NMR, UV, IR, HRMS-ESI). Най-висока DPPH активност проявяват съединения **2** (84.32%), **3** (82.70%) и **5** (84.57%), сравнена с радикал-свързваща активността на Vit C (59.44%) и Trolox (88.33%). Всички изолирани съединения притежават ABTS радикал-свързваща активност. С най-висока активност са флавоноидите на мирицетина, съответно вещества **2** (97.23%) и **3** (96.04%). Активността им е по-висока от тази на Vit C (66.21%) и Trolox (94.16%). Резултатите от *in vitro* проучванията показват, че съединения **1** ( $IC_{50} = 17.5 \mu M$ ), **3** ( $IC_{50} = 20.63 \mu M$ ) и **6** ( $IC_{50} = 37.13 \mu M$ ) имат близка анти- $\alpha$ -глюкозидазна активност с тази на акарбозата (Глюкобай) ( $IC_{50} = 20.63 \mu M$ ), известно антидиабетно лекарство, използвано за лечение на захарен диабет тип 2. Пет от седемте изолирани съединения, съответно вещества **1-3**, **5** и **6** проявяват пролипазна активност. Най-висока активност проявяват гликозидите на мирицетина, съединения **2** и **3**, които стимулират активността на ензима липаза приблизително пет пъти, когато са приложени в концентрация 20  $\mu M$ . Установено е, че веществата с пролипазна активност биха могли да намерят приложение при лечението на кахексия. Изолираните фенолни съединения **1-7** не повлияват  $\alpha$ -амилазната активност и не инхибират липидната пероксидация. Изследванията на метанолния екстракт от надземната част на *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson потвърждават научната хипотеза за съдържанието на фенолни съединения, които притежават радикал-свързваща и анти- $\alpha$ -глюкозидазна активност.

**Научни публикации и прояви:**

- Nedialkov PT, Ilieva YE, Kokanova-Nedialkova Z. Two New Phenolic Glycosides from aerial parts from *Hypericum cerastoides*. 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019

- Kokanova-Nedialkova Z. Nedialkov PT, Ilieva YE. Phenolic compounds with radical-scavenging, anti- $\alpha$ -glucosidase and prolipase activities from the aerial parts of *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson. 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019

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

**Договор 76/2018 Сапонин-медирано потенциране на цитотоксичността на етопозид върху лимфмна клетъчна линия**

**Изследователски екип:** Доц. Ренета Славова Гевренова, дф

- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб
- Доц. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Чл. кор. проф. Христо Найденски, двмн - БАН
- Гл. ас. Мая Захариева, дф - БАН
- Людмила Димитрова, докторант- БАН
- Снежана Ласкова, студент
- Деспина Балодима, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** GOTSAB сапонините са 3, 28-бисдезмозиди на глюкуронидите на тритерпеновите карбоксилни киселини от олеананов тип, които се натрупват в корените на видове от род *Gypsophila* L. Целта на проучването е да се изследва потенциалният синергичен ефект на набор от GOTSAB изолирани от корените на *Gypsophila trichotoma* и цитостатика етопозид върху клетъчна линия от Хочкинов лимфом HD-MY-Z. Цитотоксичността им при самостоятелно приложение е тествана съгласно ISO 10993-5/2009. Комбинираният ефект е определен с математическия софтуер CompuSyn Inc. Индуцирането на апоптоза и генерирането на ROS са измерени съответно с Cell Death ELISA и ROS китове. С помощта на течна хроматография-мас спектрометрия в екстракта от корени са идентифицирани или е определена предварителната структура на 34 основни сапонина. Сапогенините им са гипсогенин, гипсогенинова, квилая и олеанолова киселина. 15 GOTSAB, образуващи от 2 до 4 изомери се съобщават за първи път в *G. trichotoma*, а 12 сапонина не са съобщени досега в литературата. Изследваните за синергизъм сапонини са производни на гипсогенина с C-28 естерно свързана верига, заместена с ацетилна, *cis/trans* метоксиканелена, ацетилна и сулфатна група или аргинин. До 20  $\mu\text{g/mL}$  нямат цитотоксичен ефект. Етопозидът има  $\text{IC}_{50}$  149.2  $\mu\text{M}$ . В комбинация със сапонини B2 и D2 (20  $\mu\text{g/mL}$ ) етопозидът показва силен синергичен ефект ( $\text{Fa}=0.8$ ,  $\text{CI}=0.2$ ) в концентрации значително по-ниски от 149  $\mu\text{M}$ . Комбинираното приложение индуцира апоптоза, което се доказва със значителното повишаване в цитоплазмата на моно- и олигонуклеозоми свързани с клетъчната смърт. При комбинациите се индуцират реактивни кислородни радикали (ROS), които причиняват апоптоза. Резултатите показват, че наличието на арабиноза в C-3 веригата и ацетилирането на въгледехидратната верига в C-28 на агликона са важни структурни особености на сапонините за да се повиши цитотоксичния ефект на комбинациите. Хемосенсибилизиращият ефект на GOTSAB би могъл да бъде обещаваща стратегия в използването на химиотерапевтици и растителни вещества. Сапонините са важно средство да се повиши ефикасността и поносимостта към цитостатици.

### Научни публикации и прояви:

- Gevrenova R, Zaharieva M, Alexander Kroumov A, et al. Gypsophila saponins enhance the cytotoxicity of etoposide in Hodgkin lymphoma cells. 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Bansko, Bulgaria, May 29-01 June, 2019.

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

### **Договор 77/2018** Синтез, структурно охарактеризиране, антимикобактериална активност и токсичност на нови индолови производни. Определяне химичната им стабилност чрез HPLC метод

**Изследователски екип:** Доц. Виолина Трифонова Стоянова

- Доц. Румяна Симеонова
- Проф. Георги Момеков, дфн
- Проф. Николай Василев, БАН
- Гл.ас. Виолета Русева, БАН
- Доц. Ваня Масларска
- Гл.ас. Станислав Божанов
- Ас. Стефка Иванова
- Надежда Янакиева, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Съобщава се за синтеза и *in vitro* оценка на антимикобактериалната активност на тринадесет нови индол и индазол базирани ароилхидразони, оценени спрямо *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Най-активните съединения 3a (MIC 0.44  $\mu$ M) и 3e (MIC 0.39  $\mu$ M) демонстрират отлична антимикобактериална активност, много ниска токсичност срещу човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK-293T и високи стойности на индекса на селективност. Важно е, че оралното приложение на съединение 3e при най-високата доза от 2000 mg/kg b.w. не води до смъртност или доказателства за нежелани ефекти, което класифицира съединение 3e като нетоксично. Другите производни с индолов и индазолов скелет също проявяват висока антимикобактериална активност, подобна на изониазид и етамбутол. Молекулният докинг, проведен в рецептора еноил-АСР-редуктаза (InhA) с цел изясняване на механизмите на проявена биологична активност на изследваните съединения, показва добри стойности на енергиите на свързване и обещаващи резултати по отношение на възможни взаимодействия с InhA рецептора. Три избрани хидразид-хидразонов производни с мощна антимикобактериална активност бяха оценени за тяхната стабилност с прецизен и точен HPLC аналитичен метод във водна среда с различно рН (2.0, 7.0, 9.0 и 12.0). Изследването описва разработването и валидирането на проста и надеждна HPLC-UV процедура за определяне на хидразид-хидразонов производни. Най-активното съединение проявява най-висока степен на хидролиза при рН7 от приблизително 48% при 40 °C. 1,2,3-Тиадиазол съдържащият хидразон 3e с отлична антимикобактериална активност, ниска цитотоксичност и без токсични ефекти, когато се прилага по орален или интраперитонеален път на експериментални животни, беше избран за определяне на ефектите му върху черния дроб и бъбречните функции при женски мишки. Изследваното съединение не повлиява урината

и серумните хематологични и биохимични параметри като INH, в сравнение с тези на контролните мишки. Резултатите показват, че 1,2,3-тиадиазол съдържащият хидразон е подходящ за по-нататъшно изследване срещу туберкулоза.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Angelova V, Pencheva T, Vassilev N, et al. New indole and indazole derivatives as potential antimycobacterial agents. Medicinal Chemistry Research, 2019, 28(4), 485–497.
- Angelova V, Simeonova R. Effects of a new 1,2,3-thiadiazole containing hydrazone antimycobacterial agent on serum and liver biochemical parameters in female mice. Drug Chem Toxicol. 2019 Sep 9;1-7.
- Yanakieva N, Angelova V, Pencheva T et al. Synthesis of novel hydrazide-hydrazone derivatives with indole and indazole scaffold as antimycobacterial agents. Presented at: Slovenski kemijski dnevi 2018, 19–21 September, Portorož, Slovenija

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

#### **Договор 78/2018 *In vitro* изследване на стабилността и антиоксидантните свойства на новосинтезирани Ga(III) и Pr(III) комплекси на биологично активни урацили**

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

- Проф. Трайко Трайков, дх
- Ас. Мария Трайкова, дх
- Венцеслава Атанасова, докторант
- Лозан Тодоров, докторант
- Катерина Костанцо, студент
- Виктория-Мария Младенова, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Синтезирани са нови комплексни съединения на оротова киселина (НОА) и 5-аминооротова киселина (НАОА). Веществата са охарактеризирани чрез съвременни физикохимични, аналитични и спектрални методи, в т.ч. елементен анализ, УВ, ЯМР, ИЧ- и Раман-спектрални анализи. Извършен е за първи път задълбочен вибрационен анализ на изследваните лиганди и техните метални комплекси, така че идентификацията на характеристичните ИЧ- и Раман-ивиси на функционалните групи да се използва като базоданни за понататъшно приложение при анализа на подобни съединения. ЯМР и УВ 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 металните(III) комплекси. Направена е сравнителна оценка на антиоксидантната активност на изходните нитрати, на лигандите и на техните метални(III) комплекси. Доказано е, че синтезираните комплекси са стабилни съединения, които проявяват антиоксидантни свойства. Антиоксидантната активност на лигандите и комплексите се дължат както на свойствата им да елиминират (прихващат) свободни радикали, така и да подтискат ензимната реакция на превръщане на ксантина в пикочна киселина с участието на ксантин оксидазата. Изследваните съединения реагират с албумина без да се дисоциират, което позволява техния пренос в кръвния поток без компонентите му да са изложени на прооксидантното действие на свободни метални йони. Показаните



антиоксидантни свойства на комплексите на 5-аминооротовата киселина, тяхната стабилност в биологична среда и взаимодействието им със серум албумина, при наличие на цитотоксичност по отношение на ракови клетъчни линии, са предпоставка за тестването им като антиракови агенти.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Todorov L, Valcheva-Traykova M, Kostova I. Impact of 5-Aminoorotic Acid and Its Complex with Gallium(III) on the Luminol Dependent Chemiluminescence in Presence of Sodium Hypochlorite. Am Inst Phys Conf Proc. 2019;2075(1):170004.
- Todorov L, Kostova I, Traykova M. Lanthanum, Gallium and Their Impact on Oxidative Stress. Curr Med Chem. 2019;26(22):4280-95
- Todorov L, Valcheva-Traykova M, Atanasova V, et al. Effect of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex on The Antioxidant Activity of Rat Blood Serum. Bulg Chem Commun. 2019;51:200-3.
- Todorov L, Valcheva-Traykova M, Kostova I. Effect of 5-Aminoorotic Acid and Its Complex with Gallium(III) on The Antioxidant Activity of Rat Blood Serum. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, Varna, 7–10 Sept 2018, page 77.
- Costanzo CRG, Atanasova V, Kostova I. Effects of Pr(III) Complex with 5-Aminoorotic Acid on The Xanthin Oxidase Activity and Free Radicals Accumulation in Rat Blood Serum. 11th Chemistry Conference, Plovdiv, 12-13 Oct 2018.
- Atanasova V, Costanzo CRG, Valcheva-Traykova M, et al. Effect of Bovine Serum Albumin on the UV Spectra of 5-Aminoorotic Acid and Its Complex with Pr(III) in K, Na- Phosphate Buffer of pH 7.45. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, Varna, 7–10 Sept 2018, page 99.

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

#### **Договор 79/2018 *In vitro* оценка възможната невропротективна активност при модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес в изолирани синаптозоми и ефект върху контрактилитета на мозъчни кръвоносни съдове на алцесефолизид и мауритианин, изолирани от надземната *Astragalus monspessulanus* spp. *monspessulanus***

**Изследователски екип:** Доц. Магдалена Спасова Кондева-Бурдина, дф

- Проф. Илина Манова, дф
- Доц. Петранка Здравева, дф
- Гл. ас. Борис Кадинов, дб, БАН
- Гл. ас. Александър Шкондров, дф
- Нели Здравкова, студент
- Еджем Додумова, студент
- Зорница Павлова, студент
- Станислав Праматаров, студент
- Росен Ралчовски, студент

**Базова организация:** Катедра „Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология“, ул. Дунав 2, гр. София 1000

**РЕЗУЛТАТИ:** Оксидативният стрес е в основата на патогенезата на редица заболявания, като невродегенеративни и др. Мозъчната тъкан е една от най-чувствителните на

оксидативен стрес, поради високата консумация на кислород, високото съдържание на полиненаситени мастни киселини и нисък капацитет на антиоксидантните ензими. В тази връзка през последните години се засили интереса към биологично активни вещества с антиоксидантно действие, предимно от растителен произход, които намират приложение както в превенцията на тези заболявания, така и за подпомагане на тяхната терапия. Оценка ефектите на два флавоноида: алцесефолизид и мауритианин, изолирани от надземната част на *Astragalus monspessulanus* spp. *monspessulanus*, при модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес върху изолирани мозъчни синаптозоми от плъх и върху контрактилитета на малки мозъчни съдове. Синаптозомите са получени от мозъка на плъх чрез диференциално центрофугиране, използвайки Percoll градиент. Основните параметри, характеризиращи функционално-метаболитния статус на синаптозомите, които се определят са: синаптозомална жизненост (оценена чрез МТТ-тест) и ниво на редуциран глутатион (GSH). Получените артериални сегменти от *a.basilaris*, с дължина 1.8-2 мм, се монтират и тестват на двуканален жичков миограф (модел 410А, JP Trading, Denmark), като се оценява техния контрактилитет. Върху изолираните синаптозоми, при модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес, двата флавоноида – алцесефолизид и мауритианин, проявяват статистически значим невропротективен и антиоксидантен ефекти, като съхраняват синаптозомалната жизненост и нивото на редуциран глутатион. Върху мозъчните съдове, самостоятелно приложени, алцесефолизид намалява съдовият тонус, а мауритианин – го повишава. Получените резултати доказват невропротективната активност на двата флавоноида алцесефолизид и мауритианин в модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес, която най-вероятно се дължи на тяхното антиоксидантно действие. Ефектът им е съизмерим с този на позитивната контрола силибин, който е с доказан невропротективен ефект, в основата на който е неговата радикал-улавяща активност. Нашите резултати предполагат подобен механизъм на невропротекция и за алцесефолизид и мауритианин. Предстоят допълнителни изследвания, свързани с възможния механизъм на двата флавоноида върху контрактилитета на *a. basilaris*.

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

**Договор 80/2018    Проучване влиянието на модифицирани хранителни среди върху индекса на растеж и продукцията на флавоноиди в *in vitro* култури от застрашения таксон *Gypsophila trichotoma* Wend.**

**Изследователски екип:** Доц. Петранка Крумова Здравева, дф

- Проф. Илиана Йонкова, дфн
- Проф. Илиана Манова, дф
- Гл. ас. Александър Шкондров, дф
- Павлинка Попова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** За първи път са установени *in vitro* култури от застрашения за Българската флора вид *Gypsophila trichotoma* върху хранителни среди, съдържащи минерални добавки. Чрез ВЕТХ метод е изследвано съдържанието на сапонарин във всяка получена култура. В настоящото проучване установихме, че индексът на растеж се повлиява както от съдържанието на натриев хлорид, така и от присъствието на магнезиеви и калциеви йони.

Най-висок добив на биомаса се получава при удвояване количеството на CaCl<sub>2</sub>. Наблюдават се значителни разлики във флавоноидното съдържание на отделните конвенционални култури. Резултатите, получени от това проучване, показват, че проблемът е по-сложен и вероятно всяка една от тези съставки допринася за производството на флавоноиди в клетките. Въпреки че суспензионните култури, отгледани върху G48 среда без Mg<sup>2+</sup>, натрупват почти два пъти по-малко сапонарин от културите, отгледани на MS, ние ги предлагаме като обещаващ източник на този рядък флавоноид. 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. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

**Договор 81/2018      Високорезолуционен фитохимичен скрининг за редки биологично активни вещества в представители от род *Astragalus* L. (Fabaceae)**

**Изследователски екип:** Проф. Илина Николаева Манова, дф

- Доц. Петранка Здравева, дф
- Гл. ас. Александър Шкондров, дф
- Ясмина Хърльова, студент
- Николай Кънчев, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Създаден е метод за скрининг на тотални растителни екстракти чрез UPLC-HRESIMS за наличието на редки БАВ: флавоалкалоиди, ацилирани флавоноиди, сапонини и флавоноиди. Чрез прилагане на метода в проби, получени от *Astragalus* видове, събрани от различни находища в България, са доказани: кемпферолов флавоалкалоид в екстракти от надземни части на *A. onobrychis* var. *chlorocarpus*, *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus* и *A. glycyphyllos*; кверцетинов флавоалкалоид в надземните части на *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus*; ацилирани с хидроксиметилфлутарова киселина флавонолови гликозиди – кверцетинов в екстракт от *A. hamosus* и кемпферолов в *A. hamosus* и *A. depressus*. Редкият тригликозид камелиазид А е доказан в надземни части на *A. onobrychis* var. *chlorocarpus*, *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus* и *A. glycyphyllos*. В допълнение се докладва за наличие на рутин в *A. onobrychis* var. *chlorocarpus*, *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus*, *A. glycyphyllos*, *A. cicer* и *A. ponticus*. Проведено е фитохимично проучване на надземната част на *A. glycyphyllos* за съдържание на сапонини. От бутанолния екстракт чрез различни хроматографски техники е изолирано едно съединение. Структурата на веществото е определена чрез киселинна хидролиза, <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР, COSY, NOESY, HSQC, HMBC и HR-MS като: 17(*R*),20(*R*)-3β,6α,16β-трихидроксициклоартанил-23-карбоксилна киселина 16-лактон 3-*O*-β-D-глюкопиранозид. Изолираният сапонин е ново природно съединение. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

**Договор 82/2018      Фармакологично проучване на тлъсто масло от семена на *Nigella sativa* върху експериментално индуциран колит при мишки**

**Изследователски екип:** Доц. Румяна Любомирова Симеонова, дф

- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф,
- Доц. д-р Ренета Гевренова, дф
- Доц. Нико Бенбасат, дф
- Доц. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дф
- Петър Арнаудов, студент
- Яница Русенова, студент
- Виолина Тотева, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Улцерозният колит е хронично възпалително заболяване на червата, за лечението, на което се прилагат кортикостероиди и други имуномодулиращи лекарства със сериозни странични ефекти. Нараства нуждата от нови средства за лечение на улцерозния колит, с по-малко нежелани реакции. Целта на настоящата работа е да се оцени качествения състав на масло от черен кимион (*Nigella sativa oil*, NSO) и да се изследва противовъзпалителния и антиоксидантен ефект върху експериментално индуциран колит при мишки. За качествения анализ на маслото е използвана газова хроматография-мас спектрометрия с висока резолюция (GC-HRMS). Установени са палмитинова, линолова, олеинова и други мастни киселини. Колитът е индуциран чрез 5-дневно орално приложение на DSS. Измерени са нивата на MDA, GSH, активността на CAT и SOD, както и активността на MPO, маркер за възпаление. Ефектите на NSO са сравнени с ефектите на хидрокситирозол, антиоксидант и улцеропротективен агент от растителен произход. Индуцирането на колит при мишки води до възпаление и оксидативен стрес, оценени чрез редуция на телесното тегло на животните с 33%, наличие на кръв в изпражненията, намалено тегло и дължина на колона с 47% и с 34% съответно, както и с промени в маркерите за оксидативен стрес и възпаление. В сравнение с контролната група, при колит-индуцираните мишки се установяват статистически значимо повишено ниво на MDA с 42%, повишена активност на MPO с 400% и на SOD с 30%, както и намалено количество на ендогенния клетъчен протектор и антиоксидант GSH с 33% и активността на антиоксидантния ензим CAT с 29%. Третирането на мишките с NSO води до запазване на телесното тегло, количеството на GSH и активността на антиоксидантните ензими близки до контролните стойности. Третирането на колит-индуцираните мишки с NSO води до статистически значимо намаляване активността на MPO с 56% и на количеството на MDA с 27%. Ефектите на NSO са сравнени с антиоксидантните и улцеропротективни ефекти на хидрокситирозола.

**Научни публикации и прояви:**

- Simeonova R, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V, et al., Protective effects of *Nigella Sativa* oil on Dextran Sulphate Sodium (DSS) induced colitis in mice. 4th International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2019, May 29 – 01 June 2019, Albena, Bulgaria)

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

**Договор 83/2018      Разработване на RP- HPLC метод за разделяне на геометрични изомери на новосинтезирани пиролови и ксантинови съединения**

**Изследователски екип:** Доц. Лили Пламенова Пейкова, дф

- Доц. Мая Георгиева, дф
- Проф. Александър Златков, дф
- Гл. ас. Станислава Владимирова, дф, - ХТМУ
- Маг. фарм. Диана Цанкова –докторант
- Мария Христова, студент
- Елина Петрова, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Основната цел на настоящото изследване е разработване и валидиране на RP-HPLC метод за разделяне и идентифициране на вероятни геометрични изомери в структурата на нови пиролови и ксантинови съединения. За постигането на тази цел на анализ бе подложен синтезираният в нашата лаборатория 2-(1,3-диметил-2,6-диоксо-2,3-дихидро-1H-пурин-7(6H)-ил)-N'-(3-флуоробензилиден)-пропанхидразид. В допълнение за изследваната структура бе определена и химическата стабилност, както и стабилността при близки до физиологичните условия с допълнително разработеният и валидиран RP-HPLC метод за идентифициране на хидролизните продукти и оценка на стабилността. Приложеният подход показва, че изследваната структура е стабилна при температура от 37°C и неутрално рН и хидролизира в силно кисела и алкална среда, при същата температура, до изходните 2-(1,3-диметил-2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрахидро-7H-пурин-7-ил)пропанхидразид и 3-флуоробензалдеhid. От приложеният хирален RP-HPLC подход успешно бяха разделени двата оптични изомера на изследваният 2-(1,3-диметил-2,6-диоксо-2,3-дихидро-1H-пурин-7(6H)-ил)-N'-(3-флуоробензи-лиден)пропанхидразид. Бе установено, че разработеният и валидиран хирален RP-HPLC метод е подходящ за идентифициране наличието на стереоизомери в структурата на хетероциклически съединения, съдържащи пиролов и ксантинов фрагмент, заедно с хидразонова функционална група.

**Научни публикации и прояви:**

- Peikova L, Tzankova D, Dineva A et al. Development of chiral RP-HPLC method for identification of stereoisomers of 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-purine-7(6H)-yl)-N'-(3-fluorobenzylidene)propanehydrazide. Pharmacia. 2019; 66(1): 1-5.

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

**Договор 84/2018      Проучване на възможностите за приложение на 3D принтиране, чрез екструзия във фармацевтичната практика**

**Изследователски екип:** Професор Милен Венциславов Димитров, доктор

**Членове на изследователския екип:**

- Радослав Ангелов, Софармаси, София
- София Илиева, Софарма, АД

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Събрани са литературни данни за 3D принтиране на лекарствени форми за приложение във фармацевтичната практика. След направения анализ е установено, че в

момента най- често използваните полимери за приложение в 3D принтирането за фармацевтични цели се явяват полимлечна киселина и поливинилов алкохол. Захарният диабет е социално значимо заболяване обхващащо голям контингент от хора, в света около 600 000 000 души, а в България около 600 000. Глипизид е лекарствено вещество използвано в съвременната фармакотерапия при лечение на диабет тип 2, а около 90% от тези болни страдат от неинсулинозависим диабет. С помощта на програмата Google Sketchup 17.0. са създадени модели на класическа таблетка, каплета и капсула. Моделите са експортирани в .stl файл (машинно четим файл) и импортирани в софтуерна програма Simplify3D за последващо 3D отпечатване. Приготвени са филаменти за 3D принтиране по метода на накисване (soaking method) и по метода на гореща екструзия. Проучено е влиянието на основни фактори върху процеса на 3D принтиране, като: При моделните системи приготвени от филаменти на ПВА се наблюдава значимо покачване в скоростта и степента на освобождаване, в сравнение с тези на базата на ПМК. При моделните системи на базата на ПВА, освобождаването протича с относително по-ниска скорост, в сравнение с тези на базата на ПМК, но в по-голяма степен, което ги прави подходящ кандидат за по-нататъшно проучване за потенциално приготвяне на таблетки с удължено действие и желан фармакокинетичен профил на освобождаване. С увеличаване на времето за накисване на комерсиалните филаменти на база ПВА в разтвор на лекарственото вещество, се увеличава и неговото количество в матрицата. От друга страна, използването на този метод не позволява натоварването на по-големи количества лекарствено вещество, което е негов съществен недостатък и прави използването на метода на гореща екструзия по перспективен за приготвяне на филаменти за 3D принтиране на перорални, лекарствоосвобождаващи системи, с удължено освобождаване.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Piieva S, Dimitrov M. Advantages and challenges of 3D printing trough extrusion. First International Paediatric Scientific Practical Conference „Together for children of Bulgaria“, Varna, Bulgaria, 14-16.03.2019
- Piieva S, Piiev M, Dimitrov M. Impact of molecular weight of polyvinyl alcohol on the quality of filaments for three-dimensional (3D) printing. Eight International Conference „Modern Trends in Science“- FMNS-2019, Blagoevgrad, Bulgaria, 26-30.06.2019
- Piiev M, Dimitrov M, Dimitrov T. Preparation and optimization of polymer compositions, with the addition of fillers for extrusion of filaments, potentially applicable in 3D printing of custom drug forms for medicine and pharmacy. 9<sup>th</sup> International Conference on application of Information and communication Technology and statistics in economy and education (ICAICTSEE-2019), Sofia, Bulgaria, October 24-26<sup>th</sup>, 2019

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

#### **Договор 85/2018 Биосинтез на трополонов тип алкалоиди в *in vitro* култури на *Gloriosa superba* L. (Colchicaceae)**

**Изследователски екип:** Проф. Илиана Илиева Йонкова, дфн

- Доц. Петранка Здравева, дф
- Павлинка Попова
- Вилма Пошева

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Приложението на *Gloriosa superba* в традиционната медицина е тясно свързано с основните вторични метаболити за вида – трополоновите алкалоиди. В хода на настоящото изследване е проведен сравнителен анализ на основните алкалоиди, присъстващи в разработените ин витро култури от *G. superba* и нативни грудки. За тази цел получените тотални екстракти от създадените ин витро култури: надземни части, грудки, корени, калус и суспензионни култури и нативни грудки са подложени на предварително нецелево фракционироване върху MCI gel. Химическият профил на получените фракции е определен чрез UPLC-HRESI-MS. Чрез сравняване на получените резултати с база данни (Metlin) и литературни източници са идентифицирани 16 метаболита. Сред тях са охарактеризирани агликони, производни на колхицина: демеколцин; 2,3-дидеметилколхицин; 2-деметилколхицин; 3-деметилколхицин; колхицин; глориозин; 2-деметилколхицилин; 3-метилколхицинова киселина; корнигерин; колхинол; N-ацетил-метилетер; алкалоид А-283; 2-деметилколхицеин и колхицеин. Идентифицирани са и моногликозидирани производни: колхикозид и донгдуенгозид А. Изброените са идентифицирани само в култури с по-висока степен на клетъчна диференциация - ин витро надземни части, както и от ин витро и нативни грудки. Основният метаболит за вида, колхицин, е идентифициран и в диференцирани ин витро корени от *G. superba*. Проведеното проучване доказва значението на ин витро културите от *G. superba* като потенциален алтернативен източник за продуциране на аналози на колхицина с ценна химична структура.

**Научни публикации и прояви:**

- Ionkova I, Popova P, Zarev J, et al. Biosynthesis of tropolone-type alkaloids in in vitro cultures of *Gloriosa superba* L. (Colchicaceae), *Natural Product Communications*, 2019;9(1-2)

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

**Договор 87/2018      Значимост на слюнчените показатели – високо чувствителен С-реактивен протеин, креатин киназа MB-mass, тропонин I за диагностика на остър миокарден инфаркт при пациенти с хроничен пародонтит**

**Изследователски екип:** Доц. д-р Теодора Николаева Болярова-Конова, дм

- Проф. д-р Диана Трендафилова –Лазарова, дм
- Проф. д-р Маргаритка Бончева, дм
- Д-р Мануела Сандова
- Ралица Скробанска, студент
- Кръсто Иванов, студент
- Крум Бодльов, студент
- Мариам Моганло, студент
- Натали Тонева, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е да се изследва промяната в концентрациите на високо-чувствителен С-реактивен протеин (hs CRP), креатин киназа – миокарден банд (СК-MB-mass), hs тропонин I (hsTnI) в серум и в слюнка при пациенти с остър миокарден инфаркт (ОМИ) и хроничен пародонтит във връзка с определянето им като биомаркери за ОМИ в слюнка. В изследването участваха 48 пациента, (34 мъже и 14 жени), на средна възраст

60,43 ±13,606, постъпили за лечение в УМБАЛ „Св. Екатерина“. На всички пациенти бяха проведени кардиологични и пародонтални изследвания; събиране на слюнка; имунологично определяне на hsCRP; СК-МВ-mass; hsTnI в серум и в слюнка; кръвни изследвания. Пациентите бяха разделени на две групи: I група – 28 пациенти с остър миокарден инфаркт (ОМИ); II група – 20 лица без коронарна болест на сърцето (КБС). При съпоставяне на серумните и слюнчените нива на hsCRP, СК-МВ mass и hsTnI при пациентите от двете групи, нашето изследване не установи значими корелации. Има тенденция изследваните биохимични показатели, които се откриват увеличени в серум да са завишени и в слюнка при пациентите с ОМИ, без значими разлики. Тъй като концентрациите на hsCRP, СК-МВ mass и hsTnI в слюнка не се влияят от факторите възраст, пол, тютюнопушене и параметрите на пародонтита при пациенти с и без ОМИ, считаме, че те са високо специфични за ОМИ. При пациентите с ОМИ установихме значима корелация между дълбочината на пародонталния джоб и нивото на триглицериди в кръвта; обратна корелация между кръвенето при сондиране и HDL (high-density lipoprotein). При пациентите без КБС установихме значима корелация между нивото на клиничен аташман и нивата на триглицериди. Потвърждава се зависимостта на компоненти на дислипидемията от тежестта на пародонтита. Настоящото изследване дава насока за ползването на слюнката за по-бърза диагностика в амбулаторна практика, което би могло да е в полза на общопрактикуващите лекари за диагностицирането на ОМИ.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Болярова-Конова Т, Бончева М, Сандова М, и др. Сравнително изследване на биомаркери за остър миокарден инфаркт в биологичните течности серум и слюнка. Сп. Обща Медицина, 2020;(1)
- Болярова Т. Значимост на биомаркери в слюнка за диагноза значимост на биомаркери в слюнка за диагноза на остър миокарден инфаркт на остър миокарден инфаркт. Сп. Обща Медицина, 2018; XX(3):64-70.

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

#### **Договор 88/2018 Промени в кореноканалния дентин при въздействие с високоенергиен диоден лазер (ин-витро изследване)**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Цонко Тодоров Узунов, доктор

- Доц. Елка Радева
- Хон.ас. Рая Грозданова-Узунова
- Ас. Евгения Попова
- Димитър Костурков, докторант

**Базова организация:** Катедра по Консервативно зъболечение, бул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се изследва проникваемостта на лазерната светлина, температурните и ултраструктурните промени които настъпват в кореноканалния дентин при използването на високоенергиен диоден лазер 810 nm с два вида световоди - кварцов световод и органично модифициран такъв. Изследването е проведено на екстрахиран човешки зъби (n=48) с кривина от 10° до 25°, която за настоящето изследване е определена чрез три дигитални метода. Изследваният от нас нов дигитален метод (Screen Protractor) за определяне кривината на кореновия канал на екстрахиран зъби показва много прецизни



результати. След стандартизирана обработка на кореновите канали зъбите са разделени в следните групи: 1 група - кварцов световод, 1 W - 18 зъба; 2 група - кварцов световод, модифициран с органични включения, 1 W – 18 зъба. Контролна група – 12 зъба, само обработка с ProTaper Gold, без въздействие с лазер. На 12 зъб една от повърхностите е изтънена по дължина, с цел да се получат гладки повърхности, през които могат да се правят измерванията на осветеността. Приложен е диоден лазер - DenLase 810 nm и максимална мощност 7W. Използван е протоколът „Pulpotomy”, при който се работи със средна мощност от 1W при максимална мощност за протокола 2 W и импулсен режим с излъчване и пауза от 1ms. Измерванията показаха, че светлината, излизаща от световода на лазера, се разпространява предимно напред в канала, като максималният измерен интензитет е на 2-3 mm от края на световода, след което плавно намалява, а при криви коренови корени - отслабва по-бързо. Измерването на температурата по кореновата повърхност преди и след лазерната обработка е извършено безконтактно с инфрачервена термокамера Flir T 330 с точност на измерване 0,01°C. Според получените резултати от нашето изследване в 90% от случаите повишаването на температурата по външната коренова повърхност е до 8° C. В резултат от обработка с лазер на сканираща електронна микроскопия се наблюдава частично разтапяне на дентина по стената на кореновия канал и много плътно запушване на дентиновите тубули. Разтопеният материал не формира еднороден слой и съдържа явни признаци на прекристализация – зърнест характер, ъгловати форми на отделни зърна и групиране им в зърнести агрегати. Апикалната част на кореновия канал представлява изцяло стопена дентинова повърхност с пълно запушване на дентиновите канали.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Костурков Д, Радева Е, Узунов Ц. Дигитално in vitro изследване на криви коренови канали 19-ти научен конгрес на БЗС, Бургас-Поморие, 6-8 юни 2019

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

#### **Договор 89/2018      Влияние на интраканални медикаменти върху ендодонтски биофилм (ин витро изследване)**

**Изследователски екип:** Доц. д-р Елка Николаева Радева, доктор

- Ас. Десислава Цанова-Тошева
- Ас. Елена Шопова

**Базова организация:** Катедра по консервативно зъболечение, ул Г Софийски 1, София 1431,

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящето ин-витро проучване е да се изследва влиянието на интраканални медикаменти върху микроорганизми изолирани при зъби с персистираща ендодонтска инфекция. За постигане на целта са използвани пет еталонни щамове микроорганизми E.faecalis ATCC 29212, S.mutans ATCC 25175, C.albicans ATCC 90028, F.nucleatum ATCC 25586, P.gingivalis ATCC 33277. Подбрани са четири интраканални медикамента (Ca(OH)<sub>2</sub> + хлорхексидин, Ca(OH)<sub>2</sub>+ наносребро, Ca(OH)<sub>2</sub> и Ca(OH)<sub>2</sub> + йодоформ), като е изследвано тяхното влияние върху микроорганизмите поотделно и върху смесена бактериална суспензия. Приложени са микробиологични методи: агар-дифузионен метод и културелен метод на изследване антибактериалната активност на използваните медикаменти, преброяване на колония образувачите единици за

микроорганизми в аеробна и анаеробна среда; и сканираща електронна микроскопия - за визуализиране на бактериален растеж на ин витро създадения ендодонтски билфилм и степента на отстраняване чрез използване на звукова иригация. Доказани са възможностите за адхезия и растеж на изследваните щамове по кореновата дентинова повърхност. След третиране на ендодонтския биофилм от смесена бактериална култура е направен контрол за наличие на бактериален растеж с аеробни и анаеробни посявки, както и на СЕМ. Доказан е бактериален растеж и наличие на бактериален биофилм въпреки използваните медикаменти. На аеробните посявки се отчете растеж на *E.faecalis*, *S.mutans*, *S.albicans* в количества  $10^{3-4}$  ml. На анаеробните посявки се отчете растеж в количества  $10^5$  на анаеробните видове *F.nucleatum* и *P.gingivalis* и аеробните *S.mutans*, *E.faecalis*. В количества  $10^3$  ml се отчете растеж на *S.albicans*. Най-силно въздействие върху третираните пет микробни щамове показва  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + хлорхексидин - с най-силно въздействие върху *S. albicans*, следвано от *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* и на последно място върху *F. nucleatum*. На второ място по сила е въздействието на  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + наносребро - *S. albicans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. mutans* и на последно място *E. faecalis*.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  има сигнификантно най-силно въздействие върху *S. Albicans* и *P. Gingivalis*.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + йодоформ има сигнификантно най-силно въздействие върху *S. Albicans*.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Радева Е, Шопова Е, Цанова Д, и др. Антимикробен ефект на интраканални медикаменти в ендодонтската инфекция (ин-витро изследване). Проблеми на денталната медицина, 2019
- Радева Е, Шопова Е, Цанова Д: Антимикробна активност на калциев хидроксид самостоятелно и в комбинация със сребърни наночастици. 19-ти научен конгрес на БЗС, 6-9 юни 2019, Бургас-Поморие

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

#### **Договор 93/2018 Биомиметична реминерализация при експериментален модел на емайлов кариес**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Радосвета Иванова Василева, дм

- Ас. Александър Бончев

**Базова организация:** Катедра „Консервативно зъболечение“, ул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящето изследване е да се изследват възможностите за реминерализация при *in vitro* създадени моделни емайлови лезии чрез използване на хибридни гелни микрочастици с *in situ* формирани калциеви фосфати. С помощта на сканираща електронна микроскопия, инфрачервена спектроскопия, рентгено-структурен анализ и лазерна флуоресценция бяха охарактеризирани де- и реминерализацията на образците. Въз основа на резултатите, които получихме от изследванията се установи, че реминерализацията с флуориден гел води до образуването на плътен минерален слой върху централната част на емайловите призми, докато при използването само на изкуствена слюнка се установи, че няма реминерализация, а само загуба на очертанията на призмите. Резултатите потвърждават реминерализиращата способност на флуоридите, но не установихме ориентирана кристализация. Използването на системата

ПДМАЕМА/Карбомер/калциеви фосфати дава обнадеждаващи резултати като потенциален биомиметичен реминерализиращ препарат. От СЕМ се вижда, че има тенденция към образуването на нанометрични кристали, които в известна степен повтарят подредбата на нанометричните апатитни кристали в емайловата призма. При отчитането на данните, получени от инфрачервената спектроскопия, се установи, че е възможно образуването на октакалциев фосфат по повърхността на изследваните образци, а той е междинна фаза, прекурсор при формирането на хидроксилапатита. Използването на системата ПСБ/калциеви фосфати води до образуването ускорен минерализиран слой със зърниста текстура по емайловата повърхност. От данните, които ние получихме, се установява, че новосинтезираните продукти имат потенциал за реминерализиране на зъбния емайл, но не наблюдаваме ориентирана кристализация. Конкретните механизми, които водят до реминерализация не са установени. Предстоят по-задълбочени проучвания, изясняващи начина, по който настъпват процесите, също и доказване на антибактериалния ефект на полимерите в суспензиите.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Bonchev A, Simeonov M, Vassileva R. Biomimetic Approach for Remineralization of Human Enamel. *Int J Sci Res.* 2018;7(10):1416-20.
- Bonchev A, Simeonov M, Vassileva R. Non-fluoride agents for enamel remineralization. *Int J Sci Res.* 2019; 8(4):1765-8.
- Бончев А, Василева Р, Симеонов М. Промени в микротвърдостта на емайла след деминерализация и реминерализиране с хибридни гелни микрочастици (in vitro изследване). 19-и научен конгрес на БЗС, Поморие, 6-8 юни, 2019 г.

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

#### **Договор 109/2018 Идентифициране на генни мутации, водещи до дегенерация на ретината при български пациенти чрез новогенерационно секвениране на прицелни гени**

**Изследователски екип:** Проф. Силвия Здравкова Чернинкова, дмн

- Проф. Ивайло Търнев, дмн
- Д-р Кунка Каменарова
- Калина Михова
- Дарина Качакова-Йорданова
- Д-р Иван Попов
- Радосвета Божилова - докторант,
- Проф. Радка Кънева
- Акад. Ваньо Митев, дбн

**Базова организация:** Катедра по неврология, бул. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Дистрофиите на ретината (ДР) са група заболявания, които се характеризират с разнообразна клинична картина и приблизителна честота 1:4000. Случаите могат да са синдромни или несиндромни, фамилни с автозомно-рецесивно (ар), автозомно-доминантно (ад) и Х-свързано унаследяване, или спорадични. Поради високата генетична хетерогенност, характерна за тази група заболявания, приоритизирането на анализа на над 250-те гени, свързани с наследствени ДР (НДР), е предизикателство. Напредъкът на технологиите за геномен анализ, включително новогенерационно

секвениране (НГС), позволявава подходите за геномен скан да бъдат ефективни за първи път и на диагностично ниво. Информацията относно честотата на НДР и засегнатите гени в българската популация е оскъдна. Целта на нашето изследване беше идентифициране на патогенните мутации и характеризиране на фенотипа при пет неродствени български семейства с различни несиндромни форми на НДР и обогатяване на информацията за тези дистрофии в нашта популация. За тази цел подбрахме пет родословия от български, турски и ромски произход. В групата включихме 2 семейства с болест на Stargardt (STGD), 2 семейства с несиндромна форма на пигментен ретинит (arRP) и една фамилия с аплазия на макулата (arMA). Клиничният екзом е секвениран при пробанда във всяко от петте родословия и откритите патогенни варианти са приоритизирани чрез прилагане на критерии за филтриране. Сегрегационният анализ е проведен посредством директно секвениране. Генетичният анализ установи две известни мутации в гена *ABCA4* (хомозиготна делеция c.5917delG, p.Val1973Terfs, водеща до изместване рамката на четене и създаване на предварителен стоп кодон, установена при двете родословия със STGD, и хетерозиготна миссенс мутация *ABCA4*-c.4771C>T, p.Gly1591Arg, сегрегират с автозомно-доминантната макулна дистрофия в другата фамилия); две хетерозиготни мутации в гена *RPE65* (c.1338+1G>A, p.? и c.272G>A, p.Arg91Gln, установени при пробанда с arRP); хомозиготна миссенс мутация в гена *PDE6C* (c.2141T>A, p.Le714Asn, открита при пациента с arMA).  
Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

### **Договор 115/2018    Анализ за промоторно хиперметиране на тумор супресорни гени при овариален карцином**

**Изследователски екип:** Доц. Румен Георгиев Димитров, дм

- Акад. проф. Ваньо Митев, дбн
- Проф. Радка Кънева, дб
- Гл. ас. Атанаска Миткова, дб
- Румяна Иваова Додова, дб
- Силва Гирагосян –докторант
- Гл. ас. Алън Начев
- Доц. Весела Тодорова, дм
- Ас. Сашка Райчева
- Доц. Иванка Димова, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Метилирането в промоторните региони на гените променя нивото на експресия на гена. Сред гените, които обичайно са метилирани при овариален карцином са *RB1*, *BRCA1*, *MLH1*, *MGMD*, *CDH1* и др. Поради тази причина целта на настоящият проект беше да се определи степента на хиперметиране в промоторни региони на тумор супресорни гени при 50 туморни проби от овариален карцином. На всички проби беше направен MS-MLPA с ME002-C1 Tumour suppressor mix 2 за метилиране в промоторните региони на гените *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RB1*, *MGMT*, *THBS1*, *CADM1*, *STK11*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARB*, *CD44* и *RB1*. Резултатите бяха анализирани с GeneMapper и Coffalyser Net софтуерни програми. В изследваните тумори, най-висока честота на метилиране беше

установена при серозните карциноми (40%, 8/20) следвани от муцинозните (30%,6/20) Резултатите показаха промени в 8 гена: *BRCA1*, *CDH13*, *RARB*, *ESR1*, *PAX6*, *WT1*, *GSTP1* и *MGMT*. С най-висока честота 26% (13/50) беше наблюдавано метилиране в *CDH13* гена, следвано от *BRCA1* гена, 10% (5/50) и *ESR1* гена, 8% (4/50). Нарушенията в метилирането на тези гени се асоциират с рак на яйчника, и могат да бъдат предложени като диагностичен и предиктивен маркер при лечението на туморите на яйчника. Проучването на честотата на тези нарушения, обяснява генетичната причина и дефектите в репарационната система на клетката, свързани с туморогенезата при част от пациентите, които нямат *BRCA* мутации. Получените резултати разшириха генетичните изследвания, свързани с промени в основните гени, асоциирани с предразположение към рак на яйчника в Българската популация. Въвеждането на метилспецифичен анализ за промоторно хиперметилиране повиши възможностите на генетичния анализ с цел подобряване на диагностиката, профилактиката и лечението на заболяването

#### **Научни публикации и прояви:**

- Додова Р, Миткова А, Пенчева Д и др. Генетични изследвания при наследствен рак на гърдата, доклад на IX научна конференция на тема „Новости в онкологията – III част. Диагностика и лечение на рецидивиращи и метастазирани тумори, 24 – 26 май 2019 г. Слънчев Бряг, България

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

**Договор 55/2019** Сравнително изследване на ефектите на сурроheptadine, asenarine, propranolol и diazepam върху серотонинова токсичност у плъхове

Изследователски екип: Доц. Румен Павлов Николов, дм

- Гл. ас. Георги Богданов, дм
- Ас. Милен Христов, дм
- Ас. Калина Колева

**Базова организация:** Катедра Фармакология и токсикология, ул. Здраве 2, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Серотониновият синдром е живото-заstrашаващо състояние, свързано с повишена серотонинергична активност в централните и периферните серотонинергични синапси. Може да се наблюдава при предозирание на серотонинергични лекарства или при комбинирано приложение на две или повече вещества, които повишават нивата на серотонин (5-хидрокситриптамин, 5-НТ). Цел на настоящето проучване е сравнително изследване на ефективността на сурроheptadine, asenarine, propranolol и diazepam върху модел на серотонинова токсичност у плъхове, предизвикана от комбинирано приложение на флуоксетин (селективен инхибитор на рептейка на серотонин) и транилципромин (неселективен МАО-инхибитор). В проведените експерименти бяха наблюдавани специфични симптоми характерни за развитието на серотонинов синдром у плъхове, някои от които са ниска поза на тялото, феномен на Straub, тремор, поклащане на главата, пилоерекция и хипертермия. Всички изследвани вещества (сурроheptadine, propranolol, asenarine и diazepam) предотвратиха проявите на серотонинов синдром при експерименталните животни. Разлика се наблюдава по отношение на хипертермичната реакция, свързана със серотониновия синдром. Сурроheptadine и propranolol потискат развитието на хипертермична реакция. Diazepam намалява хипертермичната реакция, като най-силно редуциране на хипертермията се отчете на 60 и 90 мин след инжектирането на серотонинергичните вещества. Asenarine потиска развитието на хипертермична реакция и дори предизвиква хипотермия. В настоящето проучване у плъховете със серотонинов синдром бяха наблюдавани симптоми, аналогични на тези при хора в същото състояние. Сходството в изявата на синдрома при плъхове и хора може да послужи като основа за по-нататъшно изясняване на механизма на развитие и протичане на серотонинов синдром при човека.

**Научни публикации и прояви:**

- Колева К, Николов Р. Поведенчески, соматични и автономни прояви при експериментален модел на серотонинов синдром. Медицински преглед, 2020; 56 (3)
- Vlahova M, Tzonev A, Koleva K, et al. Serotonin syndrome in rats. International Congress of Medical Sciences, 24-27 September 2020, Sofia.
- Koleva K, Hristov M, Bogdanov G, et al. Effect of asenarine in rat serotonin syndrome. The 36 Balkan Medical week, 24-26 September 2020, Bucharest, Romania.

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

**Договор 56/2019      Участие на ендотелни фактори в регулацията на артериалното налягане при хипертония**

**Изследователски екип:** Доц. Юри Пенков Няголов, дм

- Доц. Мирослава Варадинова
- Петя Маркова
- Лазар Митров- студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото изследването беше проучване на ролята на взаимодействието между ендотелин В рецепторите (ЕТВ) и NO-системата в регулацията на артериалното налягане и сърдечната честота у спонтанно хипертензивни плъхове от линията SHR. Експериментите бяха проведени на мъжки 12-14 седмични, неанестезирани нормотензивни плъхове Wistar и спонтанно-хипертензивни плъхове SHR разпределени в 4 експериментални групи съответно: контролни групи - нормотензивни плъхове Wistar, (W, n=8) и спонтанно хипертензивни плъхове (SHR, n=8); експериментални групи със селективно блокирани ендотелин В рецептори, чрез венозна инфузия на BQ788 в доза 1 mg.kg-1.h: W+BQ788, (n=8) SHR+BQ788, (n=8). Чрез спектрален анализ на вълната на артериалното налягане бяха изследвани бързите колебания на артериалното налягане и сърдечната честота, в характерни спектрални зони, спонтанната барорефлексна чувствителност и симпатико-вагусовия баланс. Активността на ендотелната (eNOS) и невронална (nNOS) изоформи на азотен оксид синтазата (NOS) бяха изследвани в тъканни хомогенати на сърце и аорта. Ние установихме понижена мощност на хуморално медираните, нискочестотни колебания, и на симпатиково обусловените, средночестотни колебания на сърдечно-съдовите вариабилни у спонтанно-хипертензивни плъхове. Нашите резултати показаха променен симпатико-вагусов баланс, както и различия в активността на изследваните изоформи eNOS и nNOS у SHR. Ние считаме, че активността на азотен оксид синтазите у SHR имат модулиращ ефект върху бързите колебания на артериалното налягане и сърдечната честота у SHR. Ние установихме, че ендотелините, чрез ЕТВ рецепторите участват в генерирането на бързите колебания на артериалното налягане у SHR. Получените в нашето изследване резултати ни дават основание да допуснем, че ефектите на ендотелините, чрез ЕТВ рецепторите са медирани от представената в съдовата система невронална азотен оксид синтаза.

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

**Договор 58/2019      Молекулярно-генетични характеристики на заболяването**

**Комплекс туберозна склероза (TSC) в България**

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

- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дб, дбн
- Ас. Ани Митева
- Тихомир Тодоров, дб

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящата работа бе да установим молекулярно-генетичните характеристики на автозомно доминантно мултисистемно заболяване Комплекс туберозна склероза (TSC1 MIM#191100 и TSC2 MIM#191092) в България. Обобщихме данните от 42

пациента/семейства с предполагаема клинична диагноза TSC- 24 изследвани в настоящия проект и 18 от предходна изследователска дейност. За анализ на *TSC1* и *TSC2* гените използвахме PCR, директно секвениране, MLPA. При 38 семейства (90.5%) потвърдихме вероятната клинична диагноза- 15 семейства с *TSC1* (35.7%) и 23 семейства с *TSC2* (54.8%). При 4 семейства (9.5%) не открихме патологична мутация. При 15-те семейства с *TSC1* открихме 15 различни мутации в гена *TSC1*, от които 4 (27%) са неописани в литературата. „Горещи“ за мутации са екзони 15, в които попадат 33% от мутациите, както и екзони 9, 17 и 18, в които попадат 40% от мутациите. При 23-те семейства с *TSC2* открихме 23 различни мутации в гена *TSC2*, от които 11 (48%) са неописани в литературата. „Горещи“ за мутации са екзони 13 и 34, в които попадат 22% от мутациите. При пациентите с *TSC2* по-често се срещат субкортикални тубери, генерализирани тонични клонични пристъпи, субependимен гигантоклетъчен астроцитом, лицеви ангиофиброми, унгални фиброми, сърдечни рабдомиоми и бъбречни ангиомиолипоми, докато при пациентите с *TSC1* по-често се срещат кортикални тубери, кортикална дисплазия и субependимни нодули. При пациенти с frameshift и nonsense мутации в *TSC1* и *TSC2* по-често се срещат хипопигментни петна, кортикални тубери, кортикална дисплазия, субкортикални тубери, епилепсия и гърчове от различен характер, както и тежки генерализирани тонични клонични пристъпи. При големи генни делеции преимуществено се наблюдават бъбречни ангиомиолипоми и кисти. При frameshift, nonsense и missense мутации в еднаква степен се наблюдават Шагренови петна и интелектуален дефицит. Разработеният системен аналитичен подход, осигурява възможности за поставяне на точна молекулно-генетична диагноза, провеждането на адекватна генетична консултация, профилактика и лечение на заболяването при засегнатите семейства.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Georgieva V, Koleva M, Todorov T et al. Molecular-genetic characteristics and genotype-phenotype correlations in Bulgarian patients with tuberous sclerosis complex. Acta medica Bulgarica 2020;48(2).

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

#### **Договор 59/2019 Проучване на герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените, като рискови фактори за развитие на простатен карцином и асоциация с агресивно клинично поведение**

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

- Ас. Анита Кавръкова, дб
- Ас. Ани Митева- ФОЗ
- Гл. ас. Биляна Георгиева, дб
- Янка Дангулова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се проучи ролята на герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените, като рискови фактори за развитие на простатен карцином и асоциацията им с агресивно клинично поведение. Докладваме молекулен герминативен профил на *BRCA1* и *BRCA2* гените и дължина на AR (CAG)<sub>n</sub> при 10 български пациенти с ПК. Бяха приложени



ДНК екстракция, PCR, фрагментен анализ, директно секвениране. Герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените НЕ бяха намерени. В допълнение, при 30% от изследваните пациенти с ПК бяха детектирани *AR* (*CAG*)<sub>n</sub>=22 повтора, което се свързва с вродено предразположение към ПК. Установихме 3' *VDR* Poly A „дълги алели“(18-24/25) в същите пациенти, което също се асоциира с повишен риск от развитие на ПК и дори с по-агресивна клиника. Сигнификантните *AR* и *VDR* алели в профила на тези пациенти съвпадат с наличие на неблагоприятни клинично-патологични характеристики. Възможно е при повторен анализ на *BRCA1/2* гените в същата и по-голяма извадка пациенти с ПК чрез NGS технология, да доведе до откриването на мутантни варианти, включително такива с мозаечен профил. За по-прецизна оценка на герминативния генетичен профил на ПК пациентите е необходимо да се разшири панелът от таргетни гени. *AR*(*CAG*)<sub>n</sub> и *VDR* Poly-A 3' UTR микросателитните маркери имат независима роля, като генетични рискови фактори за поява и клинично развитие на диагнозата ПК. Комплексният анализ на панел от молекулни маркери, участващи в отключване и развитие на ПК заедно с пълната клинично-патологична информация ще допринесе за по-добра диагностика и лечение на засегнатите болни.

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

### **Договор 61/2019 Фармакологично проучване на ефекти на ноцицептинов аналог в експериментален модел на невровъзпаление**

**Изследователски екип:** Доц. Мирослава Георгиева Варадинова, дм

- Петя Павлова Маркова, дм
- Лазар Георгиев Митров, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Приложен е експериментален модел на невровъзпаление в два варианта, като мъжки плъхове са третирани еднократно или многократно (в продължение на 5 последователни дни) с LPS (1 мг/кг, i.p.). Проучиха се ефектите от еднократно и многократно приложение на новосинтезиран ноцицептинов аналог върху: телесно тегло и апетит, показатели на обучение и памет (латентно време и брой грешки в shuttle-box тест), стойности на проинфламаторни цитокини (серумни и хипокампални нива на TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ ) и концентрация на невротрофични фактори BDNF, GDNF, VEGF в серум и хипокамп на опитните животни. След приложение на LPS животните от моделните групи демонстрират понижени жажда и апетит, както и съответно понижено телесно тегло, в сравнение с контролната група. Плъховете, третирани с ноцицептинов аналог показват повишен апетит и съществено по-високо средно телесно тегло в сравнение с контролните животни. При провеждане на shuttle-box тест в началото на обучителните сесии плъхчетата с експериментално невровъзпаление демонстрираха нарушени параметри за обучение и памет в сравнение с контролните плъхчета. Еднократното приложение на новосинтезиран ноцицептинов аналог намалява значително броя на допуснатите грешки в shuttle-box сесиите. Проучените провъзпалителни параметри на животните, третирани с ноцицептиновия аналог са сравними с контролните. Приложението на ноцицептиновия аналог върху LPS-моделните животни съществено понижава серумните и хипокампалните нива на някои от изследваните цитокини. Еднократното приложение на новосинтезирания ноцицептинов аналог понижава нивата на

проучените проинфламаторни цитокини по-изявено в сравнение с многократното му приложение. Регистрират се понижени серумни нива на BDNF и GDNF в LPS-моделните животни. Еднократното приложение на ноцицептинов аналог значително повишава нивата на невротрофичните фактори в серум и хипокамп на контролни животни. В допълнение, стойностите на изследваните невротрофични фактори при LPS-моделните плъхове, приемали ноцицептинов аналог са сравними с тези на контролните животни. В заключение, настоящите резултати показват, че новосинтезираният аналог на ноцицептин има благоприятни ефекти върху нивата на изследваните проинфламаторни и невротрофични фактори в модели на възпаление и би могъл да допринесе за лечението на неврологични и невропсихиатрични състояния, свързани с невроинфламация.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Stefanova J, Markova P, Kamenova K, et al. Effects of a nociceptin analogue on proinflammatory parameters in a LPS-induced model of inflammation. Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 24-27 Sept, 2020.
- Stefanova J, Kamenova K, Markova P, et al. Treatment with a nociceptin analogue after a LPS challenge in rats: neurotrophic aspects. Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 24-27 Sept, 2020.

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

#### **Договор 62/2019      Роля на арилхидрокарбоновите рецептори за невробиологичната активност на нови индолони производни с ароилхидразонов фрагмент**

**Изследователски екип:** Доц. Павлина Ангелова Гатева

- Проф. Славина Сурчева
- Проф. Яна Чекаларова, БАН
- Доц. Радка Тафраджийска
- Доц. Любомир Трайков
- Доц. Виолина Стоянова
- Гл. ас. Зафер Сабит
- Калина Каменова, доктор
- Борис Стоянов, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта беше да бъдат синтезирани и скринирани нови индолони производни с ароилхидразолов фрагмент, притежаващи невробиологична активност, и да бъде проучена ролята на арилхидрокарбоновите рецептори (AhR) за тяхната активност. Във връзка с това: 1. Скринирахме на базата на литературни и биоинформационни източници индолони производни с ароилхидразонов фрагмент. 2. Подбрахме вещества за по-подробно проучване в рамките на настоящия проект, а именно: мелатонин и две новосинтезирани мелатонинови производни с ароилхидразонов фрагмент. Четвъртото подбрано от нас вещество – алфанафтофлавонол, не е индолонно производно, но е избрано с оглед на добре известните му антагонистични ефекти по отношение на AhR, с цел потвърждаване или отхвърляне на основната ни хипотеза за евентуално участие на AhR в механизмите на действие. 3. Проведохме рота-род тест (скрининг за неврологична или мускулна токсичност). 4. Проведохме корнеален киндлинг тест (тест за антиепилептична

20 активност). 5.Проведохме скрининг за аналгетична активност. 6.Определихме нивата на AhR и на kynurenine в мозъчни хомогенати. Тестваните вещества (мелатонин, ANF, 3e и 3f) показаха липса на неврологична и мускулна токсичност с ротарод-теста. За веществата 3e и 3f установихме наличие на антиепилептична активност, сравнима с тази на мелатонина при прилагане на киндлинг-теста и известна аналгетична активност, макар и по-слаба, в сравнение с тази на мелатонина в еквивалентни дози. Независимо че мелатонинът и веществото 3f показаха дозо-зависимо повишаване на нивата на AhR и на kynurenine в мозъчни хомогенати, нашите резултати не подкрепят първоначалната ни хипотеза за участие на AhR в аналгетичните или антиепилептичните механизми на тестваните вещества. Необходими са допълнителни проучвания за евентуални изясняване на ефектите на AhR и на кинуренина в неврофармакологичната активност на индоловите производни със или без ароилхидразонов фрагмент.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Andreeva-Gateva P, Bakalov D, Sabit Z, et al. Aryl hydrocarbon receptors as potential therapeutic targets. *Pharmacia* 2020;67(4):311-5.
- Andreeva-Gateva P, Tchekalarova J, Kamenova K, et al. Aryl hydrocarbon receptors in indol derivative treated mice; neuropharmacological perspectives. *Acta Medica Bulgarica* 2021;48(1)

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

#### **Договор 63/2019      Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху образуването на биофилм от клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia***

**Изследователски екип:** Проф. Таня Василева Стратева, дм

- Чл.-кор. проф. Иван Митов, дмн
- Гл. ас. Иво Сираков, двм
- Ангелина Трифонова, дб - ВМА

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване е да се изследват основните фенотипни и генотипни характеристики на биофилма, образуван от нозокомиални изолати *Stenotrophomonas maltophilia* (n=168), чрез доказване на прикрепен растеж върху полистиренова повърхност, детекция/секвениране на биофилм-асоциирани гени (БАГ) и търсене на корелация между продукцията на биофилм и съответстващите генни профили. При 40 избрани изолата от колекцията, растежът в биофилм беше доказан в 96-ямкови плаки чрез метода „Кристал-виолет”. БАГ, *spgM* (кодиращ бифункционален ензим с фосфоглюкомутазна и фосфоманомутазна активност), *rmlA* (глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза) и *rpfF* (DSF синтаза), бяха откривани чрез полимеразно-верижна реакция. Осем щама *S. maltophilia* бяха подложени на секвениране на цял геном (WGS) посредством HiSeq 2500 платформа (Illumina). Получените прочити бяха филтрирани, подкъсени и сглобени чрез различни инструменти, интегрирани в онлайн платформата Galaxy. Общата честота на БАГ беше висока и както следва: *spgM* – 98.21%, *rmlA* – 85.11%, и *rpfF* – 70.23%. Не беше установена значима корелация между тяхното присъствие и произхода на изолатите (клинични и в контакт с абиотична повърхност). Най-разпространеният генен профил беше *spgM<sup>+</sup>/rmlA<sup>+</sup>/rpfF<sup>+</sup>* (58.33%), като същевременно беше открито неговото значимо преобладаване при изолатите *S. maltophilia* от инфекции

на долни дихателни пътища спрямо тези от инфекции с друга локализация ( $p < 0.001$ ). Всички изследвани щамове бяха охарактеризирани като силни продуценти на биофилм (Оптична плътност при  $\lambda = 570$  nm ( $OD_{570}$ ) в диапазона 0.788–2.064 и  $OD > 4 \times OD_c$  (отрицателна контрола от неинокулирана хранителна среда)), с изключение на един, който демонстрира слаб биофилм-образуващ фенотип ( $OD_{570} = 0.177$  и  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ). Не беше установена пряка корелация между количеството на биофилма и наблюдавания генотип. WGS показва, че наличието на гените *spgM*, *rmlA* и *rpfF* (без инактивиращи мутации в тях) е потенциален индикатор за силна продукция на биофилм. Също така, нуклеотидната последователност на *rmlA* натрупва диспропорционално голям брой секвенционни варианти спрямо останалите два изследвани гена. Това предполага, че неговият продукт има функция, която не е критично важна за процеса на биофилм образуване. В заключение, широкото разпространение на БАГ сред клиничните изолати *S. maltophilia* е в съответствие с важната роля на формирането на биофилми в патогенезата на инфекциите. Получените резултати, че някои от щамовете не притежават един ген (*rmlA* или *rpfF*), но въпреки това са способни на силно образуване на биофилм, подчертават комплексната природа на този адаптивен фенотип, особено при хронични бронхопулмонални инфекции, причинени от *S. maltophilia*.

#### Научни публикации и прояви:

- Трифонова А, Савов Е, Стратева Т. Нарастваща резистентност на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia* към trimethoprim-sulfamethoxazole и терапевтични възможности при инфекциите. Съвременна медицина. 2019;63 (2):3-10.
- Стратева Т, Трифонова А, Сираков И, и др. Молекулярногенетични проучвания върху биофилм-свързаните гени на *Stenotrophomonas maltophilia*. Медицински преглед. 2020; 56 (2):36-42.
- Стратева Т, Трифонова А, Борисова Д, и др. Образуване на биофилм от клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia* – фенотипни и генотипни характеристики. Медицински преглед. 2020; 56 (3): 43-50.
- Strateva T, Trifonova A, Savov E, et al. Characterization of an extensively drug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolate with strong biofilm formation ability from Bulgaria. Infect Dis. 2020;52 (11):841-5.
- Стратева Т, Трифонова А, Савов Е, и др. Клинико-лабораторни аспекти на инфекции, причинени от *Stenotrophomonas maltophilia*. Юбилейна Национална Конференция за ОПЛ и педиатри 115 години Първа Детска клиника, УМБАЛ „Александровска“. ОНЛАЙН. 10-12 септември 2020
- Стратева Т, Трифонова А, Пейков С, и др. Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*: механизми на резистентност към trimethoprim-sulfamethoxazole и терапевтичен подход. XVIII Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции. София, Парк-Хотел „Москва“. 30.09. – 02.10.2020

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

**Договор 64/2019** Проучване на чувствителността на *Helicobacter pylori* към флуорохинолони

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

- Галина Гергова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Увеличаване на резистентостта на *Helicobacter pylori* към флуорохинолони вече се наблюдава в много страни. Цел на настоящето проучване е да сравни, по наше знание за първи път, действието на levofloxacin и на delafloxacin срещу *H. pylori* и анаеробни бактерии, включително при множество щамове, резистентни към levofloxacin и множествено резистентни (MDR) щамове. За *H. pylori*, бяха определени минималните потискащи концентрации (МПК) на 6 антибиотика при 71 последователни клинични щама. МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> на delafloxacin бяха 0.016 и 0.125 µg/mL спрямо 0.125 и ≥32 µg/mL за levofloxacin. Срещу 19-те щама, резистентни към levofloxacin МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> на delafloxacin бяха съответно 0.094 и 0.38 µg/mL. МПК на delafloxacin срещу 21 щам с двойна или MDR бяха ≤0.75 µg/mL. Ниските МПК, активността срещу щамове *H. pylori*, резистентни на levofloxacin и срещу MDR щамове, както и добрата активност в киселинни условия правят delafloxacin препарат, който показва добър потенциал за оптимизация на ерадикационните режими базирани на флуорохинолони. Направена беше и сравнителна оценка на активностите на delafloxacin и levofloxacin срещу 96 анаеробни и някои микроаерофилни щамове. МПК на delafloxacin бяха многократно по-ниски отколкото тези на levofloxacin. МПК<sub>90</sub> на delafloxacin срещу кластридии, други Грам-положителни пръчици, анаеробни/микроаерофилни коки и Грам-отрицателни пръчици бяха съответно 0.75, 0.032, 0.38 и 0.5 µg/mL. Максимални (≥4 µg/mL) МПК на новия флуорохинолон бяха открити само в 4.2% от щамовете спрямо 46.9% за levofloxacin. Настоящите резултати, както и потенциалът му в киселинни условия, показват предимствата на delafloxacin пред levofloxacin по отношение на ползата за лечението на смесени аеробно-анаеробни инфекции и активност срещу *Clostridioides (Clostridium) difficile*.

**Научни публикации и прояви:**

- Boyanova L, Markovska R, Medeiros J, et al. Delafloxacin against *Helicobacter pylori*, a potential option for improving the eradication success? 2020;96(4):114980.
- Boyanova L, Yordanov D, Ouzounova-Raykova V, et al. Activity of delafloxacin versus that of levofloxacin against anaerobic and microaerophilic isolates. Anaerobe. 2020; 62: 102150.

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

**Договор 66/2019**      **Оценка на генетичния риск за сърдечно-съдови усложнения при пациенти с диабет тип 2 чрез ново-генерационно секвениране**

**Изследователски екип:** Проф. Иванка Исталианова Димова, дм

- Доц. Павлина Гатева, дм
- Гл.ас. Олга Белчева, дб
- Ивелина Михалева, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Съществува силна асоциация между захарен диабет тип 2 (ЗДТ2) и сърдечно-съдови заболявания (ССЗ). ССЗ са водеща причина за заболяемост и смъртност сред диабетно болните. Целта на настоящия проект беше да проучим алелните и генотипните честоти на генетични варианти, асоциирани със сърдечно-съдови заболявания при пациенти с диабет тип 2 със и без сърдечно-съдови усложнения, за да

оценим допълнителния принос на генетичните вариации при определяне на риска от такива усложнения. Използвахме платформата CVD StripAssay (Vienna Lab). Изследвани са следните генетични варианти: FV G1691A (Leiden), FV H1299R (R2), Prothrombin G20210A, фактор XIII V34L,  $\beta$ -фибриноген -455 GA, PAI-1 4G / 5G, GPIIb L33P (HPA-1), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, ACE I / D, Apo B R3500Q, Apo E2 / E3 / E4. Анализирахме 36 пациенти с диабет, разделени в 2 групи: 1) 20 пациенти с диабет със ССЗ и 2) 16 пациенти с диабет без ССЗ. Резултати: При всички изследвани пациенти със захарен диабет тип 2 установихме по-висока от популационната честота за следните алели / генотипове - 5.5% за FV Leiden алела, 9.7% за FVR2 алела, 38.9% за  $\beta$ -фибриногеновия генотип -455G/A, 58.9% за PAI-1 4G алела, 36,1% за ACE D/D генотип. Намерена е статистически по-висока честота за  $\beta$ -фибриноген -455 G/A хетерозиготен генотип при пациентите със ССЗ в сравнение с тези без ССЗ (55% срещу 18,7%). Заключение: Установихме висока честота на  $\beta$ -фибриноген -455 G / A генотип при пациенти с диабет тип 2, особено при тези със ССЗ. Въз основа на про-възпалителната роля на фибриногена, това проучване може да предложи възможност за полза от противовъзпалително лечение при диабетно болните, наред с познатите тромботични ефекти на фибриногена.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Andreeva-Gateva P, Mihaleva I, Dimova I. Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular risk; what the pharmacotherapy can change through the epigenetics. Postgrad Med. 2020;132(2):109-125.

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

#### **Договор 67/2019      Значение на катионния канал, активиран от хиперполяризация, за ретиналната функция: електроретинографско изследване**

**Изследователски екип:** Доц. Елка Бориславова Йорданова-Попова, дм

- Доц. Петя Купенова-Шербанова, дм
- Веселина Михайлова, студент

**Базова организация:** Катедра по физиология, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Ролята на ретиналните катионни канали, активирани от хиперполяризация (HCN) за формиране на електроретинографските (ЕРГ) отговори към включване (b-вълна) и изключване (d-вълна) на светлинното дразнене е напълно неясна. В това проучване ние изследвахме ефектите от фармакологичното блокиране на HCN каналите със ZD7288 или ivabradine върху b-вълната (ON отговор) и d-вълната (OFF отговор) в тъмно адаптирани отворени очи на жаба. Първоначално бе изследвана зависимостта доза-ефект на двата блокера върху b- и d-вълните, регистрирани със светлинни стимули с постоянен интензитет. След това бяха изследвани ефектите на 75  $\mu$ M ZD7288 или 30  $\mu$ M ivabradine върху функцията интензитет-отговор на b- и d-вълните в широка област от интензитети на стимула (10 лог. единици). Прилагането на блокерите (ivabradine - 3, 30 и 60  $\mu$ M; ZD7288 - 5, 50, 75 и 100  $\mu$ M) предизвиква доза-зависимо увеличение на амплитудата на d-вълната, докато ефектът върху амплитудата на b-вълната беше много по-слабо проявен. При изследване на зависимостта интензитет-отговор на b- и d-вълните по време на блокирането на HCN каналите бе установено, че абсолютната и относителната чувствителност на ON и OFF отговорите в ЕРГ не бяха променени. Блокирането на каналите доведе обаче до значително увеличение на амплитудата на d-вълна при всички

надпраговите интензитети на стимула, докато амплитудата на b-вълната беше леко увеличена само в областта на високите интензитети. В резултат на по-големия ефект на блокерите върху амплитудата на OFF отговора, амплитудното отношение b/d беше достоверно намалено в цялата интензитетна област. Блокирането на HCN каналите доведе до увеличаване на ширината (времетраенето) на отговора при 1/2 от максималната амплитуда за b-вълната и намаляване на тази ширина за d-вълната само във високо интензитетната област. Нашите резултати показват ясно, че блокирането на ретиналните HCN канали променя баланса между ON и OFF отговорите в дисталната ретина на жаба. Този ON/OFF дисбаланс може да е една от причините за зрителните нарушения при пациенти, лекувани с ivabradine.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Popova E, Kупenova P. Effects of ivabradine on the ON and OFF responses of frog electroretinogram. Comp Rend Acad Bulg Sci 2021.
- Popova E, Kупenova P. Effects of HCN channel blockade on the intensity-response function of electroretinographic ON and OFF responses in dark adapted frogs. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2020;80(2):192-204.

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

#### **Договор 68/2019      Взаимодействие между ендогенната канабиноидна и адренергичната невромедиаторни системи в патогенезата на студовия стрес**

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

- Проф. Александър Стойнев, дн
- Доц. Роман Ташев, дм
- Асист. Димитър Бакалов
- Катерини Дубовина, студент,
- Ана Папанайоту, студент
- Теодор Антониев Ангелов, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Стрес-индуцираното намаление на болковата чувствителност, известно като стрес-индуцирана аналгезия (СИА), се счита за вроден адаптивен отговор, своеобразна защита спрямо непосредствена заплаха. Ранните проучвания са показали, че в развитието на СИА участват различни опиоид-зависими и неопиоидни механизми. Целта на проекта бе да се изследва ефектът върху СИА от съвместното приложение на агонист/антагонист на канабиноидните СВ1-рецептори и агонист/антагонист на  $\alpha_2$ -адренорецепторите, приложени преди излагане на животните на едночасов студов стрес (1ч СС). Експериментите бяха проведени върху 96 мъжки полово зрели бели плъхове порода Wistar, които бяха инжектирани с различни комбинации от вещества преди излагането им на едночасов студов стрес. Болковата перцепция бе определяна посредством методи с прилагане на механично или термично дразнене. Първоначално всеки един от двата агониста (АЕА и Клонидин) и антагониста (АМ 251 и Йохимбин) бе инжектиран самостоятелно. Изследван бе и съвместният ефект на агонистите на двата вида рецептори, инжектирани преди излагане на животните на 1ч СС. С оглед доуточняване ролята на всяка една от двете изследвани системи, бяха използвани съответните антагонисти на канабиноидните и на  $\alpha_2$ -адренорецепторите. От получените резултати можем да

заклучим, че ефектът върху болковата перцепция, отчетен след съвместното въвеждане на двата агониста (на канабиноидните и на адренергичните рецептори), се различава от ефекта след самостоятелното въвеждане на всеки един от двата агониста, което предполага взаимодействие между – канабиноидната и адренергичната системи. От нашите опити може да се предположи, че канабиноидната система има модулиращо влияние в патогенезата на СИА – самостоятелното приложение на агонист на СВ1 повишава първоначално СИА, след което я понижава; антагонизирането на канабиноидните рецептори с едновременно приложение на агонист на адренергичните рецептори съответно повишава СИА до стойности, надвишаващи тези след самостоятелното приложение на клонидин. Обратно – адренергичната система потенцира СИА - антагонизирането на адренергичните рецептори с едновременно приложение на агонист на канабиноидните рецептори понижава СИА до стойности, по-ниски от тези след самостоятелното приложение на анандамид.

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

**Договор 69/2019      Социални взаимодействия, обучение и пространствена памет у млади плъхове при хроничен социален стрес: ефекти на мезембринови алкалоиди**

**Изследователски екип:** Проф. Александър Георгиев Стойнев, дмн

- Доц. Радка Тафраджийска-Хаджиолова, дм
- Доц. Даниела Пехливанова, дм
- Ас. Зафер Сабит
- Ас. Димитър Бакалов

**Базова организация:** Катедра Патофизиология, бул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящия проект беше да характеризира влиянието на хроничния социален стрес (SS) върху основните форми на изследователско поведение и памет у млади мъжки плъхове от порода Wistar, както и ефектите на мезембринова алкалоидна фракция получена чрез екстракция от листата на *Narcissus cv. Hawera* (MZM) върху тези параметри. SS се предизвиква чрез хронично (20 дни) излагане на Resident-Intruder Paradigm на подрастващи мъжки плъхове Wistar. Обособените групи: Контролите, SS и SS + MZM (20 mg/kg/ден, 20 дни) бяха подложени на поведенчески тестове: Open field test (OFT), Elevated plus maze (EPM) за оценка на тревожно поведение и обща двигателна активност; Novel Object Recognition Test (NORT) за изследване на работната памет, Paw pressure test (PPT) за остра ноцицепция и биохимична оценка на карбонилирани протеини в кръвната плазма и хипокампус и ELISA за оценка на плазмената концентрация на тестостерона. Получените данни показват, че прилагането на SS води до тревожно поведение и намалено изследователско поведение изразени с драстичен спад на общата двигателната активност, намален брой повторни влизания в аверсивната централна зона и увеличен престой в защитените ъглови зони при OFT, както и намален престой в отворените рамене при EPM. Третирането с MZM премахна напълно стрес-индуцираната хиполокомоция и поведение на безпокойство в стресирания животни при двата теста. Хроничният SS понижи способността за разпознаване на обекти, предизвиквайки увреждане на работната памет при NORT и повише нивата на увредения карбонилиран протеин както в хипокампуса, така и в кръвната плазма. Хроничното третиране с MZM премахна стрес-индуцираната амнезия и нормализира нивата на



увредения протеин в мозъчната структура. Едновременното прилагане на SS и MZM понижи болковия праг, в сравнение с контролите, но двете третираня не оказаха влияние върху нивата на тестостерон в кръвна плазма. Представените данни подкрепят нашата хипотеза за потенциалните благоприятни ефекти на MSM върху индуцираните от SS отклонения в тревожното и когнитивно поведение и работната памет при ювенилни плъхове.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Ameliorative effects of alkaloid fraction from *Narcissus cv. Hawera* on the deleterious impact of chronic social defeat stress in adolescent rats. FENS 11-15 July 2020
- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Prevention of social stress-induced memory decline in adolescent rats by alkaloids from *Narcissus cv. Hawera*. ICMS 2020, 24-27 September

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

#### **Договор 70/2019      Анализ на соматични мутации в първични тумори с различна локализация на пациенти с множествена първична неоплазия**

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

- Проф. Радка Кънева, дб
- Акад. проф. Ваньо Митев, дмн, дб
- Даниела Пенчева, дб
- Румяна Додова, дб
- Силва Гирагосян, докторант
- Вероника Петкова, докторант
- Чл. Кор. проф. Чавдар Славов, дм, дмн
- Гл. ас. Симеон Рангелов, дм
- Марчела Колева, дм
- Мирослава Цекова-Чернополска
- Ас. Иван Терзиев
- Доц Теофил Седлоев, дб
- Славяна Ушева - докторант
- Адриана Андреева

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Основна роля за развитието на множествени първични тумори (МПТ) имат генетични фактори, хормонални фактори, начин на живот, фактори на средата, инфекции с онкогенни вируси и др. Целта на настоящото изследване бе анализ на соматичните мутации в първични тумори с различна локализация на пациенти с множествена първична неоплазия. В настоящото изследване бяха включени общо 5 пациенти с МПТ, трима мъже и две жени, развили първични тумори с различна локализация: МПТ16-пенис/бъбрек; МПТ23-черен дроб/бял дроб; МПТ34-простатата/пикучен мехур; МПТ24-ГИСТ/яйчник; МПТ43-ендометриум/гърда/пикучен мехур. Анализът на соматични мутации беше осъществен с помощта на генен панел Ion Torrent AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, на

платформа Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific). Откритите варианти с патогенен/вероятно патогенен ефект и VUS, представляваха 28% (23/82) от всички открити варианти. В първичните тумори на изследваните пациенти бяха открити соматични варианти в следните гени: МПТ16-1 – патогенен вариант във *VHL*, МПТ16-2 – 5 VUS в гените *ALK* (2) *VHL* (1), *PIK3CA* (1) и *ERBB4* (1), съответно, герминативна мутация в *CHEK2*; МПТ23-1 - не бяха открити варианти с клиничен ефект; МПТ23-2 - 1 патогенен и 1 вероятно патогенен вариант в *TP53*, 1 патогенен вариант в *CTNNB1*, герминативен VUS в *JAK3*; МПТ24-1 - 2 VUS в *RET*, МПТ24-2 – не бяха открити варианти с клиничен ефект, герминативен VUS в *TP53*; МПТ34-1 - не бяха открити варианти с клиничен ефект, МПТ34-2 - 1 патогенен вариант в *FGFR3*, 1 VUS в *PIK3CA*, герминативен VUS в *TP53*; МПТ43-1: един патогенен вариант в *RBI*, два вероятно патогенни варианти в *CDKN2A* и *SMARCB1*, два VUS в гена *JAK3*; МПТ43-2 - 1 VUS в *KDR*, МПТ43-3 - патогенен вариант с в *PIK3CA*, герминативен VUS в гена *MET*. При всеки от първичните тумори на пациентите с МПТ се откриват различни соматични варианти, които биха могли да повлияят различни сигнално-трансдукционни пътища. Молекулното профилиране на пациентите с МПТ чрез NGS открива нови възможности за персонализирано лечение.

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

**Договор 71/2019 Проучване на чувствителността към нови антимикробни средства при полирезистентни изолати *Klebsiella pneumoniae* и на механизмите на резистентността им към колистин**

**Изследователски екип:** Проф. Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм

- Петя Станкова, дм
- Калина Михова
- Юлия Мартева-Проевска
- Член-кор проф. й Иван Митов,

**Базова организация:** Катедра Медицинска микробиология, бул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Бяха проучени общо 68 имипенем нечувствителни клинично значими изолати от разред *Enterobacterales*, получени от две болници във София и по една във Варна и Плевен, предимно при изследване на урокултура. В допълнение бяха изследвани и 98 фекални изолата, продуценти на ESBL/карбапенемаза. Бяха доказани 63 от 68те получени изолата като продуценти на карбапенемази. Те бяха 55 *Klebsiella pneumoniae* (вкл фекалните изолати), 2 *C. freundii* complex, 1 *Enterobacter cloacae* complex, 3 *Proteus mirabilis*, 2 *Providentia stuartii*, 3 *Serratia marcescens*. Те произвеждаха предимно NDM-1 (57%, 36 изолата), KPC-2 (24%, 15 изолата) и VIM-1 (9.5%, 6 изолата). Три изолата имаха различни комбинации карбапенемази. Двадесет и пет изолата произвеждаха CMY ензими, основно CMY-4 (20 от тях). Установихме *bla*<sub>CTX-M-15</sub> при 67% (42/63) от изолатите, като *bla*<sub>CTX-M-3</sub> беше доказан при 7.9% (5/64) от изолатите, основно *K. pneumoniae*. При проучените 52 изолата *K. pneumoniae* установихме 8 клона, като първия имаше 15 представителя, принадлежеше на ST11 MLST типа и произвеждаше основно NDM-1, CMY-4 и CTX-M-15. При фекалното носителство установихме три изолата ST15 *K. pneumoniae* продуценти на KPC-2 и CTX-M-15. Клиничните изолати бяха с много висока

устойчивост – резистентни 100% на amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, cefotaxime, cefoxitine, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin. Много ниска е чувствителността към fosfomycin – 19% (за оралната форма), tigecycline – 3%, tobramycin – 1.5%, co-trimoxazole – 8%. Възможно е да се използват аминогликозидите, но препоръчително в комбинация, чувствителност към gentamicin – 36.5%, amikacin – 27%. Чувствителността към колистин е отлична (82%). От новите антимикробни средства delafloxacin нямаше добра активност (0%), много по-добър беше eravacycline – (78% чувствителни) и plazomicin (89%). Ceftazidime/avibactam беше активен в 40% от изолатите и meropenem/vaborbactam при 23,8%. Трите фекални изолати бяха чувствителни на всички нови антимикробни средства с изкл на delafloxacin. Изолатите не показаха наличие на mcr гени, кодиращи плазмидна колистинова резистентност. Резултатите показват необходимост от строги мерки, за да се предотврати разпространението на тези проблемни микроорганизми и продължаващо мониториране. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

### **Договор 73/2019    Генетични фактори обуславящи промени в нормалната функция на системата на комплемента и свързани с тях бъбречни увреждания**

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

- Кунка Каменарова, дб
- Доц. Мария Гайдарова, дм
- Гл. ас. Димитър Русинов, дм
- Калина Михова
- Ас. Галя Златанова-Рашкова
- Даниела Пенчева, дб
- Доц. Полина Митева-Шумналиева, дм
- Кремена Димитрова
- Грета Михнева-Кирилова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване бе да се изясни характера на генетичните мутации свързани с повишен риск от заболявания на бъбреците, резултат от нарушения във функцията на системата на комплемента, по-конкретно атипичен хемолитичен синдром и С3 гломерулопатия. Използвахме секвениране от ново поколение на клиничния екзом за идентификация на точкови мутации и малки делеции/инсерции при 9 педиатрични пациента, последвано от секвениране по Сангер за потвърждаване на откритите варианти и сегрегационен анализ, а така също и на MLPA за откриване на по-големи структурни промени. С помощта на биоинформатични методи и средства бе оценена патогенността на ново описани варианти. В хода на проучването бяха открити няколко патогенни мутации и генетични варианти, свързани с повишен риск от патологии. Установена бе генетична основа на заболяването при две от изследваните деца. Патогенни мутации бяха открити в гените *TREX1*, свързан с предразположение към системен лупус еритематозус и с автозомно доминантната ретинална васкулопатия с церебрална левкоенцефалопатия и системни изяви RVCL-S; в *COL4A5*, кодиращ верига от молекулата на колаген тип IV; в *C3*, отговорен за синтеза на едноименния фактор на комплемента.

Мутацията в колагеновия ген е нова, непозната в литературата, но въз основа на критериите на ACMG, чрез биоинформатичен и сегрегационен анализ бе определена като патогенна. Едновременното унаследяване на патогенните варианти в *COL4A5* и *C3*, т. нар. олигогенен ефект, вероятно обяснява особеностите на клиничната картина при болното дете – ранна изява и относително тежко протичащ X-свързан синдром на Алпорт при дете от женски пол. При други две деца, анализът на резултатите доведе до идентифициране на рискови фактори, свързани с нарушения във функцията на бъбреците, което даде насока за провеждане на допълнителни изследвания и оптимизиране на терапията. Резултатите от проведеното секвениране на клиничния екзом при пациенти, при които има съмнения за наличие на нарушения в системата на комплемента, показаха още веднъж голямото разнообразие в гените и генетичните варианти отговорни за тези патологии.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Белчева О, Каменарова К, Михова К, и др. Приложение на новогенерационното секвениране за изясняване на молекулните основи на нарушенията в гломерулната функция. X Национална конференция за редки болести и лекарства сираци. Пловдив. 13-15 септември 2019.

- Beltcheva O, Kamenarova K, Mihova K, et al. Application of NGS sequencing for improved diagnosis in the pediatric nephrology setting European Society of Human Genetics Conference, European Human Genetics Virtual Conference, ESHG 2020.2, June 6-9, 2020  
Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

#### **Договор 74/2019    Микробиологични, молекулярно-биологични и епидемиологични проучвания върху *Lactococcus garvieae* – нов патогенен причинител на локални и системни инфекции**

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

- Гл ас Иво Сираков, доктор
- Проф. Таня Стратева, доктор
- Гл ас Даниел Йорданов, доктор
- Доц. Петя Орозова, доктор

**Базова организация:** Катедра „Медицинска микробиология”, ул. Здраве 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целите на проекта са свързани с апробирането на класически и молекулярно-биологични методи за диагностика и диференциране на *L. Garvieae* от близкородствени бактериални видове, епидемиологично типичане на щамове *L. garvieae*, изследване на антибиотичната чувствителност на щамове изолирани в периода 2002–2019 г., тяхното генотипиране и доказване разпространението на генетични детерминанти за резистентност и фактори на вирулентност. За постигане целите използвахме класически и молекулярно - генетични методи. Успешно са апробирани методи за изолация и идентификация на *L. garvieae*, включително и чрез MALDI-TOF технология, която понастоящем е трудно достъпна. Въпреки това, в рутинната диагностика *L. garvieae* е възможно да бъде погрешно идентифициран, поради прилика с бактерии род *Enterococcus*. Ето защо освен класическите биохимични методи за идентификация са използвани оптимизиран от нас PCR протокол на Zlotkin и разработен от нас серологичен слайд аглутинационен метод за оптимална диагностика на този патогенен причинител при водните животни и човека. Определена е антибиотичната чувствителност на изолираните

*L. garvieae* показва запазена чувствителност към Ampicillin, Erythromycin, Tetracycline, Levofloxacin, Chloramphenicol, Vancomycin, Linezolid и развитие на резистентност към Oxolinic acid, Nalidixic acid, Ampicillin; Oxacillin, Colistin и Tiamulin, а пет изолата показва устойчивост към Novobiocin. Серологичните изследвания показват принадлежност на щамовете с изключение на един към Европейски капсулен серотип KG-, капсулните варианти на които са значително по-вирулентни от безкапсулните, определени като KG+ серотип. Изследванията с PCR показват запазена вирулентност на изолатите. С изключение на три щам в останалите 22 е доказано наличие на основния фактор – капсулният ген. Създаден е протокол за епидемиологичното типичане на изолатите. Чрез RAPD е доказано разпространение на два основни клъстера в страната и клонални различия с щамовете изолирани от Гърция и Сърбия. С помощта на метода е установено движението на вирулентен щам от рибарник до търговската мрежа. Епидемиологичното типичане чрез секвениране на подбрани изолати по 16s рРНК гена потвърди принадлежността на изолатите към вида *L. garvieae*. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

**Договор 75/2019 УНPLC-HRMS охарактеризиране на корените от *Chenopodium bonus-henricus* L. за съдържание на сапонини, екдистероиди и флавоноиди и изпитване на главните компоненти за наличие на анти- $\alpha$ -амилазна, анти- $\alpha$ -глюкозидазна и антилипазна активност**

**Изследователски екип:** Доц. Параскев Годоров Недялков, дф

- Гл. ас. Златина Коканова-Недялкова, дф

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

**РЕЗУЛТАТИ:** С помощта на УНPLC-HRMS в корените на *Chenopodium bonus-henricus* L. са установени общо 45 съединения: 31 сапонина на олеанолова киселина, 2 $\beta$ -олеанолова киселина, 2 $\beta$ -хидроксигипсогенин, медакагенова киселина, байогенин и фитолакагенин; 12 флавоноидни гликозиди с агликони 6-метоксикемпферол, изорамнетин и спинацетин и 2 екдистероида (20-хидроксиекдизон и Полиподин В). Шест сапонина и три флавоноида са тествани за наличие на анти- $\alpha$ -амилазна, анти- $\alpha$ -глюкозидазна и антилипазна активност: 3-О- $\beta$ -глюкуронопиранозил-медакагенова киселина-28- $\beta$ -ксилопиранозил (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -рамнопиранозил (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -арабинопиранозил естер (Chbhs-01), Бонусхенрикозид А (Chbhs-03), 3-О- $\beta$ -глюкуронопиранозил-байогенин-28-О- $\beta$ -глюкопиранозил естер (Chbhs-04), 3-О-L- $\alpha$ -арабинопиранозил-байогенин-28-О- $\beta$ -глюкопиранозил естер (Chbhs-05), 3-О- $\beta$ -глюкуронопиранозил-2 $\beta$ -хидроксигипсогенин-28-О- $\beta$ -глюкопиранозил естер (Chbhs-06), Бонусхенрикозид В (Chbhs-07), 6-метоксикемпферол-3-О-[ $\beta$ -апиофуранозил(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -глюкопиранозил(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -глюкопиранозид (Chbhf-01), спинацетин 3-О-[ $\beta$ -апиофуранозил (1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -глюкопиранозил(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -глюкопиранозид (Chbhf-02) и спинацетин-3-О- $\beta$ -генциобиозид (Chbhf-03). Анти- $\alpha$ -глюкозидазната и пролипазната активност са установени чрез LC-MS. Пет от тестваните вещества проявяват анти- $\alpha$ -глюкозидазна активност. Флавоноид Chbhf-03 (IC<sub>50</sub>=260  $\mu$ M) притежава най-висока анти- $\alpha$ -глюкозидазна активност сравнима с активността на акарбозата (IC<sub>50</sub>=206  $\mu$ M), известно антидиабетно лекарство, използвано за лечение на захарен диабет тип 2. Всички сапонини и флавоноиди стимулират активността на ензима липаза и проявяват пролипазна активност. Най-висока пролипазна активност проявяват сапонините Chbhs-06,

Chbhs-07, Chbhs-01 и флавоноида Chbhf-03, които стимулират ензима съответно с 62.10%, 46.08%, 36.56% и 38.40% в концентрация 200  $\mu$ M. Тестваните сапонини и флавоноиди не повлияват  $\alpha$ -амилазната активност. Настоящото проучване задълбочено изследва химичния състав на корените от *C. bonus-henricus* L. за съдържание на сапонини, флавоноиди и екдистероиди с помощта на UHPLC-HRMS и доказва преспективността на видовете от род *Chenopodium* като източници на вещества с пролипазна и анти- $\alpha$ -глюкозидазна активност.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Kokanova-Nedialkova Z, Kondeva-Burdina M, Nedialkov PT. Neuroprotective, anti- $\alpha$ -glucosidase and prolipase active flavonoids from Good King Henry (*Chenopodium bonus-henricus* L.). *Nat Prod Res.* 2020 Jun 27:1-5.
- Kokanova-Nedialkova Z, Kondeva-Burdina M, Nedialkov PT. Saponins from the roots of *Chenopodium bonus-henricus* L. With neuroprotective and anti- $\alpha$ -glucosidase activities. *Pharmacia* 2021;68(2):387-392.

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

#### **Договор 76/2019      Разработване на ефективен метод за изолиране на мауритианин от растителни източници и *in vivo* изследване за протективна активност**

**Изследователски екип:** Проф. Илина Николаева Манова, дф

- Доц. Петранка Здравева, дф
- Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф
- Гл. ас. Александър Шкондров, дф
- Димитър Димитров, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Мауритианин е сравнително рядък флавоноид, но няколко изследвания разкриват неговия фармакологичен потенциал. В това проучване бяха изследвани надземни части от десет вида *Astragalus* за съдържание на мауритианин, за да се намери надежден източник на съединението. Количеството на флавоноида във всеки екстракт се определя чрез новоразработен високоефективно течно хроматографски метод с мас спектрометрична детекция с висока разделителна способност. За първи път мауритианин се доказва в *A. cicer*, *A. onobrychis*, *A. glycyphyllos*, *A. glycyphylloides*, *A. corniculatus* и *A. ponticus*. Само при *A. depressus* съединението не е намерено. Наблюдавани са значителни разлики в съдържанието на мауритианин (от 4 до 1642 ng / mg сухо тегло) на пробите. Интересно е, че *A. onobrychis* var. *chlorocarpus* и *A. cicer* могат да се разглеждат като потенциален източник на съединението, замествайки редкия *A. monspessulanus* subsp. *monspessulanus*. При *in vivo* модел на тетрахлорметан индуцирана хепатотоксичност в плъх, мауритианин показва статистически значим хепатопротективен и антиоксидантен ефект, съизмерим с този на силимарин.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Shkondrov A, Krasteva I, Kozuharova E, et al. Bulgarian species of genus *Astragalus* as potential sources of mauritianin. *Pharmacia* 2020;67:229-232.
- Shkondrov A, Krasteva I, Kondeva-Burdina M. Plant sources of mauritianin and evaluation of its protective potential. Seventh Congress of Pharmacy with International Participation. Borovetz, Bulgaria. 21-24.11.2019

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

**Договор 77/2019    Експериментално и числено изследване на супернасищащи наноразмерни лекарство-доставящи системи на основата на поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид) дихидрофилни съполимери за повишен мембранен транспорт на малкоразтворими лекарствени вещества**

**Изследователски екип:** Гл. ас. Виктория Искова Михайлова, дф

- Проф. Деница Момекова, дф
- Гл.ас. Ива Вълкова, дф
- Маг.фарм. Весела Ганева
- Ас. Вилиана Гуглева, докторант – МУ-Варна
- Росица Михайлова,
- Доц. Асен Недев, дт, БАН

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящия проект е експериментално и числено изследване на супернасищащи нано-размерни лекарство доставящи системи на основата на поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид) (PNIPAM-g-PEO) дихидрофилни съполимери за повишен мембранен транспорт на малко разтворими лекарствени вещества. Като моделно лекарствено вещество бе използван индометацин (ИМС), който е практически неразтворим във вода. Установено бе, че в комплексната система етанол-вода могат да се образуват супернаситени мицелни структури от типа ядро-корона, стабилизирани от активните взаимодействия между молекулите на ИМС, етанол и PNIPAM. С помощта на изотермна титрационна калориметрия бе доказано, че характерът и силата на тези взаимодействия се определя от взаимния синергистичен ефект на ИМС и етанол, който подпомага акомодирането на лекарственото вещество между веригите PNIPAM. Последното беше подкрепено и от данните от термо-реологичното проучване, проведено при динамичните условия на неструктивен осцилационен тест. На базата на пряката зависимост между еластичната деформация при фазовия преход и количеството свързан етанол беше направена сравнителна оценка на солватационното състояние на PNIPAM при различни температури и съотношение етанол:вода (5-30% v/v). Установено бе, че присъствието на ИМС значително отслабва междуфазовите взаимодействия PNIPAM-етанол-вода, индуцирайки преференциална абсорбция на етанол в полимерната система. За тези системи бе установено и високо-ефективно включване на лекарственото вещество във формираните мицелни структури. Независимо от приложния метод на получаване и количеството добавен етанол най-високо съдържание (DLC) и ефективност на супернасищане с лекарствено вещество бе постигнато при системи със съотношение ЛВ:полимер 1.5:1 (DLC ~ 130 -140% (w/wp)). Тези условия продуцираха малки по размер частички (<50 nm) със сферична морфология от типа ядро-обвивка и подчертано аморфни свойства, което определи и общия кинетичен модел на освобождаване на лекарственото вещество. С помощта на цифрово моделиране беше установено, че кинетиката на *in vitro* освобождаване е ускорена и се контролира от разтварянето на малко разтворимото аморфно лекарство. Скоростта на процеса се определя от рН, процентното съдържание на етанол и температурата. Получените резултати дефинират самоасоциираните мицелни

частички PNIPAM-g-PEO като перспективни високо ефективни наноразмерни лекарство доставящи системи за постигане на повишен мембранен транспорт по механизма на супернасищане.

**Научни публикации и прояви:**

- Вълкова И, Михайлова В. Калориметрично изследване на медираните от разтворителя взаимодействия между индометацин и биосъвместим съполимер поли(N-изопропилакриламид)-поли(етилен оксид). VII-ми конгрес по фармация с международно участие. Хотел Рила, Боровец 21-24 ноември 2019

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

**Договор 78/ 2019    Виртуален скрининг на бази данни природни продукти с афинитет към ацетилхолинестеразата**

**Изследователски екип:** Гл. ас. Марияна Димитрова Атанасова

- Проф. Ирини Дойчинова, дхн
- Доц. Иван Димитров
- Гл. ас. Ива Вълкова

**Базова организация:** Катедра Химия, ул. Дунав № 2, София 1000

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящето изследване е откриване на структури с природен произход, проявяващи афинитет към ензима ацетилхолинестераза. В изследването са използвани методите на структурния лекарствен дизайн молекулен докинг и молекулна динамика. В настоящото изследване, 12 ZINC бази данни с природни съединения (почти 150 000 съединения) бяха скринирани виртуално за афинитет към АХЕ чрез молекулен докинг с програма GOLD версия 5.2.2 при следните настройки: оценъчна функция ChemPLP, ригиден протеин и гъвкав лиганд. След това, съединенията бяха скринирани за пермиабилитет през кръвно-мозъчната бариера (КМБ), лекарствено подобие и още три критерия на сървъра SwissADME. Комплексите с ChemPLP оценка, по-висока от 70, бяха инспектирани визуално по отношение на размера на лиганда и позицията му в мястото на свързване. Избрани бяха 32 лиганди от 23 структурни групи и 10 от тях бяха подложени на молекулно-динамични симулации за оценка на стабилността на комплексите им с АХЕ. Наличните до момента резултати за три от тях показват, че съединенията образуват стабилни комплекси с ензима.

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

**Договор 79/2019    Етерични масла от инвазивни, чуждоземни растителни видове - неизчерпаем евтин ресурс за фармацевтичната практика**

**Изследователски екип:** Доц. Екатерина Кръстева Кожухарова, дбн

- Проф. Илиана Йонкова, дфн
- Доц. Нико Бенбасат, дф
- Кристина Стойчева, студент
- Маргарита Георгиева, студент

**Базова организация:** Катедра Фармакогнозия, Дунав 2, София 1000



**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е извличане и проучване на етерични масла, липофилни и летливи компоненти от инвазивни, чуждоземни растителни видове с оглед използване във фармацевтичната практика или за подобряване качеството на живот. За оценка на ресурсите от *Ailanthus altissima*, *Amorpha fruticosa*, *Erigeron canadensis* и *Xanthium strumarium* следвахме „Методиката за оценка на лекарствените растителни ресурси“, разработена от Шрьотер и съавтори (Shroeter et al. 1986), която е официално приета за нашата страна за оценка на ресурсите от лечебни растения и се препоръчва от МОСВ. Получаването на етеричното масло е извършено посредством парна дестилация и растителен материал от всички обекти е подложен на екстракция с хексан за получаване на конкрет. Разредените проби от етерични масла (1:1000) бяха анализирани с ГХ/МС система. Ресурсите от четирите изследвани растителни вида са изобилни. Мозаичният характер на петната на популациите им предполага използване на ръчен труд за събирането на реколтата. Това ще допринесе за намаляване на количеството им и опазване на биоразнообразието. Тъй като, така се оскъпява производството на етерично масло, големите производители предпочитат засяване на големи площи и механизирана обработка. Това е извънредно рисково при работа с инвазивни видове. Ако се пристъпи към такова начинание е необходимо изключително внимание и строг режим на агротехническите мероприятия. Изключително важно е недопускане на разселване на плодовете. В противен случай ще се стигне до задълбочаване на екологичния проблем и риска за биологичното разнообразие. Перспективни за бъдещи разработки с цел практическо приложение са *Ailanthus altissima*, *Amorpha fruticosa* като източник на био-пестициди. Също така *A. fruticosa* е перспективен обект за разработване на продукт, който да бъде внедрен в практиката и да спомага лечението на хронични рани.

**Научни публикации и прояви:**

- Kozuharova E, Benbassat N, Berkov S, et al. *Ailanthus altissima* and *Amorpha fruticosa* - invasive arboreal alien plants as cheap sources of valuable essential oils. *Pharmacia* 2020;67(2):71-81.
- Kozuharova E, Benbassat N, Ionkova I. The invasive alien species *Amorpha fruticosa* in Bulgaria and its potential as economically prospective source of valuable essential oil. *Pharmacia* 2020;67(2):357-62.
- Kozuharova E, Benbassat N, Ionkova I. Invasive alien species - cheap sources of valuable essential oils. 7th Congress of Pharmacy. Borovetz, Bulgaria. 21-24 November 2019, 74.
- Kozuharova E, Benbassat N, Ionkova I. The invasive alien species *Amorpha fruticosa* - a cheap source of valuable essential oils. 7th Congress of Pharmacy. Borovetz, Bulgaria. 21-24 November 2019
- Стойчева К, Кожухарова Е, Йонкова И, и др. Етерично масло от инвазивния растителен вид *Xanthium strumarium* L. – състав и фармакологичен ефект. Студентска научна сесия, Фармацевтичен Факултет, МУ-София, София, ноември 2019

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

**Договор 80/2019**      **Разработване на подходи за стимулиране продукцията на полифеноли в ин витро клетъчни системи от *Astragalus glycyphyllos* L.**

**Изследователски екип:** Проф. Илиана Илиева Йонкова, дфн

- Доц. Петранка Здравева, дф
- Ас. Янчо Зарев, дф
- Павлинка Попова
- Вилма Пошева

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Създадени са калусни, суспензионни и надземни *in vitro* култури от *Astragalus glycyphyllos*, като са определени количествата натрупана биомаса и е извършен анализ на тотални биосинтезирани флавоноиди, както и на рутин и камелиязид А. За увеличаване на производството на флавоноиди са изследвани различни комбинации от растителни хормони и режим светлина/тъмнина. Оценена е възможността за стимулиране продукцията на флавоноиди чрез използване на екзогенно добавен кверцетин в нарастващи концентрации. Рутин и камелиязид А са доказани в най-голямо количество в надземните култури. Калус, култивиран на модифицирана среда G48, с двойно количество Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, постига по-високо общо съдържание на флавоноиди (2.37 и 2.03 mg/g DW). Суспензиите, култивирани на модифицирана среда G48 с добавяне на 10, 20 и 30 mg/mL кверцетин, биосинтезират по-високо общо съдържание на флавоноиди (0.09, 0.10 и 0.13 mg/mg DW). Постигната е биотрансформация на кверцетин до изокверцитрин. Най-високата концентрация на изокверцитрин (56.73 ng/mg DW) се наблюдава при суспензии, култивирани на модифицирана среда G48, с 20 mg/mL кверцетин.

**Научни публикации и прояви:**

- Popova P, Zarev Y, Shkondrov A, et al. Induction of flavonoid biosynthesis by *in vitro* cultivation of *Astragalus glycyphyllos* L. *Pharmacia* 2020;67:95-99
- Popova P, Zarev Y, Shkondrov A, et al. Quantification of flavonoids in *in vitro* cultures of *Astragalus glycyphyllos* L. 7 congress of pharmacy with international participation, November 21-24 2019, Borovets

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

**Договор 81/2019** Изследване на метаболитите на Metamizole (4-Methylaminoantipyrine; 4-aminoantipyrine; 4-Formyl-aminoantipyrine; 4-acetylaminoantipyrine) за *in vitro* анти туморна/антипролиферативна активност в експериментални моделни системи

**Изследователски екип:** Гл. ас. Любомир Трифонов Маринов, дф

- Гл. ас. Иванка Костадинова, дф
- Гл. ас. Ани Георгиева, доктор - БАН
- Мартин Малчев, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Metamizole, принадлежи към групата на НСПВл и притежава антипиретична активност и аналгетична. Той е предлекарство, което се метаболизира до два активни метаболита 4-Methylaminoantipyrine и 4-Aminoantipyrine и два не активни 4-Formyl-aminoantipyrine и 4-acetylaminoantipyrine. За изясняване спектъра на анти туморна активност на метаболитите на Metamizole върху перманентни човешки (аденокарцином на млечна жлеза (MCF-7), аденокарцином на дебело черво (HT-29) и цервикален карцином

(HeLa)) туморни клетъчни линии беше проведен МТТ - пролиферативен тест и светлинно микроскопски изследвания, включващи инвертен микроскоп, интравитално двойно флуорохромиране с акридин оранж и етидиев бромид и оцветяване с DAPI за оценка на ядрената морфология. Пригответни бяха два сток разтвора – в стерилна дестилирана вода (50 µл) и в DMSO (50 µл). От тях са пригответни работни разтвори в стерилна стандартна хранителна в концентрации: 400, 200, 100 и 50 µg/ml при разтвора с стерилна дестилирана вода и 800, 400, 200 и 100 µg/ml за DMSO. При 4-aminoantipyridine беше използван само разтвор пригответен стерилна дестилирана вода. Чрез МТТ тест беше установено, че водните разтвори на изследваните метаболити не понижават пролиферацията на използваните клетъчни линии на 24 ч и 48 ч. Разтворените в DMSO метаболити понижават в различна степен пролиферацията на туморните клетъчни линии, отчетено с МТТ тест на 24 ч и 48 ч след прилагането. Налюдаваният ефект е по-силно изразен на 48-ми час при всички метаболити. Отчетеното понижение е статистически значимо при повечето изследвани концентрации на метаболитите, но понижението не пада под 50%, което пък възпрепятства възможността за определяне на IC50 концентрациите на метаболитите при тези туморни клетки. Цитоморфологичните изменения в клетъчните линии (HT-29; MCF-7; HeLa), третирани с метаболитите на Metamizole (разтворени в DMSO), установени чрез флуоресцентни методи на изследване, показват увреждане на ниво клетка и ядро, характерни за загиване на третираните туморни клетки по пътя на апоптоза. В опити in vitro е установен антипролиферативен и апоптозо-индуциращ ефект на разтворените в DMSO метаболити на Metamizole.

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

**Договор 82/2019 Имунохистохимично изследване на демиелинизацията на corpus callosum при модел на множествена склероза на мишки, третирани с производни на 4-аминопиридина**

**Изследователски екип:** Гл ас Иванка Иванова Костадинова, дф

- Проф. Николай Данчев, дм
- Проф. Бойчо Ланджов, дм
- Гл. ас. Любомир Маринов, дф
- Проф. Любомир Везенков, дхн

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Множествената склероза (МС) е демиелинизиращо заболяване, при което е увредена миелиновата обвивка на невроните в главния и гръбначния мозък. Целта на това проучване беше да се оцени ефекта на новосинтезираните производни на 4-аминопиридин (4-AP) върху индуцирания от купризон модел на демиелинизация при мишки. Една от важните физикохимични характеристики на лекарствата е техният разпределителен коефициент logP, който характеризира разпределението им между водна и липидна фаза в тялото. Може да се определи както експериментално, така и чрез компютърни програми. Моделът на демиелинизация е осъществявен чрез прилагане на медния хелатор купризон на мишки. Шест от групите са получили купризон с питейна вода в продължение на 6 седмици, за да се индуцира демиелинизация. Освен купризон, 4-AP производни и 4-AP са прилагани перорално с цел да се оцени техния протективен ефект върху

демиелинизацията. За визуализация на промените в мозъка използвахме имунохистохимия. Използване на софтуера Molinspiration cheminformatics за изчисляване на молекулни дескриптори. Прилагането на купризон предизвика почти пълна загуба на зрели олигодендроцити (OLs), която е установена при имунохистохимичен анализ. Броят на зрите OLs в групите, третирани със съединения 4b, 4c и 4-AP, е по-близо до този в контролната група. От получените данни можем да направим заключението, че най-висока стойност на  $\text{miLogP}$  от производните на 4-AP има съединение 4b (4.49), следвано от 4d (4.34), 4c (4.12) и 4a (3.81). Резултатите от нашите проучвания показват, че новосинтезираните съединения 4b и 4c имат протективен ефект спрямо индуцираната от cuprizone демиелинизация, като този ефект е по-значим в групата, третирана със съединение 4c. При пептидните производни на 4-AP, всички съединения изпълняват критериите на правилото на Липински, което ги прави подходящи за ефективно лечение на заболявания на ЦНС.

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

### **Договор 83/2019    Дизайн, оценка на лекарственото подобие и синтез на нови хидрокси-заместени хидразони с потенциална цитотоксична активност**

**Изследователски екип:** Доц. Боряна Иванова Николова-Младенова, дх

- Проф. Георги Момеков, дфн
- Теодора Атанасова
- Габриела Митев, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Проведено е *in silico* проучване на фармакокинетичните свойства и лекарственото подобие на серия от 14 моно-, ди-, три- и тетраhydroкси-заместени хидразони с цел намирането на най-перспективните съединения. Изчислени са редица молекулни параметри, необходими за оценка на мембранната дифузия и фармакокинетичното поведение. Липофилността и водоразтворимостта са анализирани чрез няколко алтернативни предсказващи модела. Виртуалният скрининг показва, че хидрокси-заместените хидразони имат малки молекули, малък брой донори (2-5) и акцептори (3-6) на водород, балансирана липофилност и стойност на TPSA по-малка от  $140 \text{ \AA}^2$ , което предполага добра пропускливост на съединенията през клетъчната плазмемембрана. Оценката на лекарственото подобие е извършена с валидирани правила, използвани като високопроизводителни филтри във фармацевтичната индустрия. Всички хидрокси-хидразони имат подходящи фармакокинетични свойства за лекарствени кандидати според формулираното от Lipinski „Правило на петте“ и останалите методики за оценка на лекарствено подобие. Установено бе, че най-перспективни за синтез са хидразоните, които съдържат две или три хидрокси-групи в алдехидното ядро, като една от ОН-групите е с орто-разположение. Синтезирани са 8 нови хидрокси-заместени хидразони чрез кондензация в етанол на 2,3-дихидрокси-, 2,4-дихидрокси-, 2,5-дихидрокси- и 2,3,4-трихидроксибензалдехид с хидразидите – бензхидразид и 4-хидроксибензхидразид. Съединенията са охарактеризирани чрез елементарен анализ, HR ESI-MS мас-спектри, термогравиметрични изследвания, ИЧ-спектроскопия,  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР. Определени са брутните формули и структурата на хидрокси-заместените хидразони. Цитотоксичното действие на хидрокси-заместените хидразони е изследвано

върху човешки туморни клетъчни линии, за определяне на антипролиферативната активност и стойностите на  $IC_{50}$  с помощта на МТТ тест. Резултатите показват, че въвеждането на втора хидрокси-група в алдехидното ядро води до получаването на съединения с изразена цитотоксична активност и стойности на  $IC_{50} < 10 \mu M$ . Позицията на втората хидрокси-група в алдехидното ядро има значение и променя активността на дихидрокси-заместените хидразони. Най-активен е хидразон **4**, при който двете хидрокси-групи са разположени една до друга на 2-ро и 3-то място в алдехидното ядро. Това съединение може да се разглежда като подходящ кандидат за по-задълбочени проучвания.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Nikolova-Mladenova B. Molecular properties and bioactivity score of hydroxy-substituted hydrazones, Proceedings of the 56th meeting of the Serbian chemical society, Nis, Serbia, June 7-8, 2019
- Nikolova-Mladenova BI. Molecular properties and bioactivity score of hydroxy-substituted hydrazones, 56th meeting of the Serbian chemical society, Nis, Serbia, June 7-8, 2019,
- Nikolova-Mladenova B, Ivanov D. Estimation of molecular properties of dihydroxybenzaldehyde based hydrazones, 7th Congress of Pharmacy with international participation, Rila Hotel, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G. Synthesis and cytotoxic activity of dihydroxy-substituted hydrazones, 7th Congress of Pharmacy with international participation, Rila Hotel, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Georgieva N, Nikolova-Mladenova B. Сравнително изследване на хидразони, получени от дихидроксибензалдехиди, Студентска научна сесия, Фармацевтичен факултет, МУ-София, София, България, 30 ноември 2019.

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

#### **Договор 84/2019 Синтез, изследване и проучване на цитотоксичната и ксантин оксидазна активност на нови метални комплекси с N,O,S съдържащи органични лиганди**

**Изследователски екип:** Проф. Адриана Георгиева Бакалова, дх

- Доц. Емилия Чернева, дх
- Проф. Георги Момеков, дфн
- Гл. ас. Марияна Атанасова, дх
- Росица Михайлова, докторант “
- Антония Янева, студент

**Базова организация:** катедра „Химия“, ул. Дунав 2, София -1000

**РЕЗУЛТАТИ:** Синтезирани са три нови органични съединения: 3'-метил тетраhydro-4H-тиопиранспиро-5'-хидантоин (лиганд), две нови производни на диетиловия естер на  $H_2Sq$ : бензимидазол естерамид (съединение 1), 5-нитро-2-амино естерамид на  $H_2Sq$  (съединение 2) и четири нови комплекса със следните химични формули: *cis*-[PtL<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (комплекс 1), *cis*-[PtL<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>] (комплекс 2), *cis*-[PtL<sub>2</sub>I<sub>2</sub>] (комплекс 3) и *cis*-[PtL(NH<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>] (комплекс 4). Съединенията бяха охарактеризирани чрез елементарен анализ, вибрационна и ЯМР спектроскопия. Данните от ЯМР спектрите доказаха, че комплексообразуването се осъществява чрез серния атом от тетраhydroтиопирановия фрагмент. Теоретичният

анализ показва, че комплекси (1), (3) и (4) се характеризират с квадратна структура, докато комплекс (2) представлява леко изкривен октаедър. Лигандът и комплексите (1-4) бяха тествани за цитотоксична активност *in vitro* върху няколко човешки туморни клетъчни линии при използване на МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолов бромид] анализ. Комплекси (2) и (3) имат същата цитотоксична активност както референта cisplatin върху аденокарцином на дебелото черво HT-29. *In vitro* инхибиращата активност спрямо XO в говеждо мляко бе определена спектрофотометрично чрез образуване на пикочна киселина. Комплекс (2) инхибира XO и може да се разглежда като ново противотуморно средство с потенциална инхибиторна активност срещу XO. За установяване на възможното свързване на лиганда и комплекси (1-4) в ензима XO бе използван молекулен докинг. Само комплекс (2) показва активност срещу говежда XO. Това може да се обясни с предсказаната поза на молекулата в мястото на свързване на ензима, която достига молибденовия център и може да го инхибира. Изчислени са дължините на връзките, валентните ъгли и др. на (съединение 1) и (съединение 2) и те са практически същите или са подобни на тези, установени при други естерамиди на H<sub>2</sub>Sq. Оптимизирани са геометриите на молекулите. Двете съединения са изследвани за 15 цитотоксичност *in vitro* върху две човешки туморни клетъчни линии. Резултатите показват, че съединенията са биологично активни при микромолярни концентрации.

#### Научни публикации и прояви:

- Cherneva E, Atanasova M, Buyukliev R, et al. 3'-Methyl-4-thio-1*H*-tetrahydropyranspiro-5'-hydantoin Platinum Complex as Novel Potent Anticancer Agent and Xanthine Oxidase Inhibitor, Arch Pharm. 2020;353(7).
- Bakalova A, Buyukliev R, Atanasova M, et al. Design, Synthesis, Molecular Docking, Theoretical and Cytotoxic Investigation of New Pt(II) Complexes with 3'-methyl-tetrahydro-4*H*-thiopyranspiro-5'-hydantoin, Medicinal Chemistry Research, 2020
- Tirolski G, Bakalova A, Cherneva E, Synthesis, spectral, theoretical and pharmacological investigation of ester amides of squaric acid, XVI Scientific poster session for young scientists, PhD students and full-time students, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria, May 23, 2019
- Bakalova A, Buyukliev R, Michailova R, et al. Design, synthesis, theoretical and cytotoxic investigation of new Pt(II) complexes with 3-methyl-8-thia-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione, 7th Congress of Pharmacy with International Participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Cherneva E, Tomović K, Šmelcerović T, et al. 3-Methylthiocyclohexanehydantoine Pt(IV) and Pd(IV) complexes as novel potent xanthine oxidase inhibitor, 7th Congress of Pharmacy with International Participation, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Cherneva E, Šmelcerović T, Tomović K, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of thiocyclohexanespiro-5'-hydantoine and 3-aminothiocyclohexanespiro-5'-hydantoine and their Pt(II) complexes, 7th Congress of Pharmacy with International Participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019

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

**Договор 85/2019** *In silico* и *in vitro* изследване на ксантинови производни, проявяващи МАОВ инхибиторна активност

**Изследователски екип:** Гл.ас. Ива Вангелова Вълкова. дтх

- Проф. Ирини Дойчинова – Цекова, дн
- Гл.ас. Марияна Атанасова
- Гл.ас. Явор Митков
- Станислав Сотиров, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е количествено изследване на зависимостта структура-МАОВ инхибиторна активност на серия производни на кофеин-8- $\alpha$ -метил тиогликоловата киселина и молекулен докинг на съединенията, с цел идентифициране на ключовите за афинитета взаимодействия лиганд-рецептор. Определен е пермеабилитета на производните, през стомашно-чревна и кръвно-мозъчна мембрана, за да се отсеят само тези, с перспективно фармакокинетично поведение. Използвани са *in silico* изчислителни подходи за разработване на линейни модели на зависимостта структура-МАОВ инхибиторна активност – методи на Hansch и Fudjita Van. Проведен е молекулен докинг, за да се установят предпочитаната взаимна ориентация на двете структури и най-подходящите им конформации за формиране на комплекс между тях. Резултатите от различните *in silico* анализи се съгласуват добре и очертават по-ясно насоките за дизайн на нови съединения с МАОВ инхибиторна активност. Изяснено и потвърдено при докинг експериментите е, че присъствието на S или O атом на 8-мо място в ксантиновото ядро е важно за проява на активността. Включването на втори атом кислород в страничната верига. води до увеличаване на полярността на молекулите, което е благоприятно с оглед на възникващите диполни взаимодействия в мястото на свързване. Увеличаването на полярността на молекулите чрез удължаване на веригата при C8 би позволила осъществяването на повече взаимодействия във входната кухня. Присъствието на фенилов остатък като заместител в другия край на веригата е от значение за взаимодействието с Pe197, който регулира вместимостта на свързващия джоб. Също така трябва да се прецизира броя и вида на заместителите в бензолното ядро, за да се постигне баланс между полярност и липофилност. Резултатите от *in vitro* теста за пермеабилитет показваха, че пасивната дифузия е възможен механизъм за транспорт в стомашно-чревния тракт само за половината от изследваните съединения. По отношение на кръвно мозъчния пермеабилитет всички съединения показваха стойности за  $pP_e \geq 6$ , което е индикация за липса на такъв. Въз основа на тези разглеждания беше направен дизайн на 10 нови съединения. съдържащи сяра като свързващ атом с ксантиновия пръстен. шест атомен семикарбазиден или тиосемикарбазиден мост и различни терминални заместители.

**Научни публикации и прояви:**

- Valkova I, Mitkov J, Georgieva M et al. *In silico* analysis of monoamine oxidase B inhibitory activity of 8-substituted xanthine derivatives. Macedonian Pharmaceutical Bulletin vol. 66 (Suppl 1) 2020.

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

**Договор 89/2019**      **Компютърно рентгеново микротомографско изследване на адаптацията на композитни инлеи към твърдите зъбни тъкани, изработени по три различни метода**

**Изследователски екип:** Проф. Радосвета Иванова Василева, дм

- Доц. Жанет Николова, дм
- Виктория Петрова-Пашова

**Базова организация:** Катедра по „Консервативно зъболечение”, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящето изследване бе да се определи маргинална и вътрешна адаптация на композиционни инлеи към вътрешната повърхност на кавитетите, като инлеите са изработени по три различни метода и изследвани чрез компютърно рентгеново микротомографско изследване. При 30 екстрахирани човешки премолара бяха изработени 30 МОД композиционни инлеи: n=10 чрез стандартна лабораторна техника, n=10 чрез лабораторен скенер и CAD/CAM технология и n=10 чрез интраорален скенер и CAD/CAM технология. След циментиране на конструкциите бе извършено компютърно микротомографско изследване. По отношение на маргинална адаптация и абсолютно маргинално несъответствие лабораторните и CAD/CAM инлеите, изработени чрез интраорален скенер, показват статистически значими по-добри резултати сравнени с CAD/CAM инлеи, изработени чрез стандартен отпечатък и лабораторен скенер. Що се отнася до вътрешната адаптация, най-точни са конструкциите, изработени чрез послойно нанесен композиционен материал. Директните методи на дигитализация, чрез които са изработени образците от група 3, са с по-добри резултати относно точността на конструкциите в сравнение с индиректните – група 2. Не се откри съществена разлика в стойностите за маргинален процеп и абсолютно маргинално несъответствие при сравняване на лабораторни с изцяло дигитални конструкции. От клинична гледна точка, трите групи индиректни възстановявания показват приемливи резултати и биха могли да намерят приложение в клиничната практика на лекаря по дентална медицина.

**Научни публикации и прояви:**

- Petrova V, Vassileva R, Kirilova J. Micro-CT evaluation of the adaptation of composite inlays. Sylwan 2020; 164(4): 224-235.
- Petrova V, Vassileva R, Kirilova J. Influence of the impression techniques on the accuracy of dental restorations. Medinform 2020; 7(1): 1184-1189.

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

**Договор 90/2019** Изследване на микротвърдост и грапавост на дентиновия матрикс след въздействие с иригационни разтвори

**Изследователски екип:** Доц. Емилия Гошова Карова

- Ас. Ирина Ценова-Илиева

**Базова организация:** Катедра Консервативно зъболечение, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на изследването бе да се проследи въздействието на различни иригационни протоколи с и без ултразвукова активация върху грапавостта и микротвърдостта на кореновия дентин. Влиянието на промивните разтвори върху дентиновата грапавост се наблюдава върху срезове от 40 горни резеци, а на микротвърдостта – върху 20. И при двете изследвания беше използвана отрицателна контролна група. След подготовката образците бяха срязани надлъжно до получаване на общо 120 коренови половини. Всички срезове бяха полирани и включени в студенополимеризираща пластмаса преди началото на експериментите. Оценката на



грапвостта на дентиновата повърхност се извърши чрез атомно-силова микроскопия в нанометричната скала като най-представителните образци бяха допълнително сканирани чрез сканираща електронна микроскопия. Микротвърдостта се измери чрез апарат на Викерс. Сравнителният анализ между отделните протоколи, използвани за химична обработка на корено-каналното пространство показва способността на всички ендодонтски разтвори да увеличават грапавостта и значително да намаляват микротвърдостта на кореновия дентин. Използваните промивни разтвори увеличават грапавостта на дентина на кореновия канал в различна степен в зависимост от концентрацията, времето за приложение и активацията на им. Протоколите с допълнителна ултразвукова активация водят до значително разграпавяване на дентиновата повърхност. Всички изследвани ендодонтски разтвори значително намаляват микротвърдостта на кореновия дентин като различията между тях са несъществени. Атомно-силовата микроскопия и методът на Викерс са възпроизводими и надеждни методи за оценка на влиянието на различни химични агенти върху биомеханичните качества на дентина като грапавост и микротвърдост.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Tsenova-Ilieva I, Karova E. Application of atomic force microscopy in dental investigations. Int J Sci Res. 2020;9(3):1319-1326.
- Tsenova-Ilieva I, Karova E. Effect of endodontic irrigants on root dentin microhardness: a systematic review. Int J Sci Res. 2020;9(4):491-496.
- Tsenova-Ilieva I, Karova E. The effect of different irrigants with or without ultrasonic activation on root dentin microhardness. J of IMAB. 2021;27(2)
- Tsenova-Ilieva I, Karova E. Effects of endodontic procedures on the integrity of root canal dentin. 4<sup>th</sup> International Biomedical Congress – Sofia, Sofia, Bulgaria, 15 – 17 Nov 2019

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

#### **Договор 94/2019 Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Изследване на генетичен полиморфизъм на FcγR3A и изследване на анти-цитрулинирани протеинови антитела в слюнка**

**Изследователски екип:** Доц. Теодора Николаева Болярова-Конова, дм

- Проф. Златимир Коларов, дмн
- Проф. Алексей Савов, дм
- Ас. Петя Янкова
- Ас. Любомир Стефанов –докторант
- Спасимир Писаровски, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е изследване на връзката между пародонтит (П) и ревматоиден артрит (РА), на базата на определяне на генния полиморфизъм на FcγR3A при двете заболявания. Определяне на Анти-цитрулинирани протеинови антитела (АСРА) в слюнка. В изследването участват 105 пациента на средна възраст 50,6 г. (SD±13,07), разделени в четири групи: I група – с П и остеоартроза – 26; II група – с П и РА – 28; III група – с пародонтално здраве и с РА – 26; IV група – с пародонтално здраве и без РА – 25. На всички пациенти са приложени методи за диагностика на РА и П; определяне на:

ревматоиден фактор (RF-IgM) и АСРА в серум; АСРА в слюнка чрез ELISA. Използвани са епителни клетки от орална мукоза за FcgRIIIa – генотипизиране чрез гнездова полимеразно-верижна реакция (nested PCR). Установихме, че хетерозиготен генотип – FcgRIIIa-158VF, мъжки пол и нарастване на възрастта с една година увеличават риска от развитие на П съответно (OR = 7.2 (1,4 – 37,3), (OR = 3,5 (1,1 – 11,3), (OR = 1,9 (1,3 – 27). Генетичните изследвания по отношение на FcgRIIIa-158 ген не показаха общ рисков фактор за П и РА. Пациентите с П имат значимо по-високи нива на АСРА в слюнка спрямо здравите лица; показват значима корелация между слюнчената концентрацията на АСРА и възпалена пародонтална повърхност; дълбочина на джоба; кървене при сондиране. Пациентите с РА имат значимо по-високи нива на АСРА в слюнка спрямо здравите лица, показват значима корелация между слюнчените нива на АСРА и серумните нива на АСРА и RF и активността на заболяването DAS-28 (CRP). Установената връзка между показатели на П и АСРА в слюнка потвърждава влиянието на пародонталното възпаление върху този показател и обосновава лечението на П като начин за превенция и контрол на РА. Концентрацията на АСРА в слюнка може да се обмисли като леснодостъпен показател за РА, но са необходими допълнителни изследвания за да се верифицира.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Болярова-Конова Т, Стефанов Л, Коларов З, и др. АСРА в слюнката и връзката им с пародонтит и ревматоиден артрит. Ревматология. 2020; XXVIII(1)
- Стефанов Л, Болярова-Конова Т. Генетични аспекти на връзката между пародонтит и ревматоиден артрит. Български медицински журнал. 2020; XIV(1)
- Стефанов Л. Връзка между пародонтит и ревматоиден артрит. Клинични, имунологични, микробиологични и генетични изследвания. Дисертация за придобиване на ОНС „доктор”, София, 2020.

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

#### **Договор 99/2019 Проучване на ролята на субкласовете на ИгГ в поствакциналния имунен отговор към полизахаридни и протеинови антигени в българската популация**

**Изследователски екип:** Проф.Елисавета Йорданова Наумова, доктор на науките

- Проф. Анастасия Михайлова
- Доц. Снежина Кандиларова,
- Ас. Петя Янкова
- Невена Гешева
- Ас. Спаска Лесичкова
- Валентина Атанасова

**Базова организация:** Катедра Клинична имунология, бул. Г. Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящия проект е да се проучи Т-независимия поствакцинален имунен отговор към полизахаридни (*S. pneumoniae* и *H.influenzae*) и Т-зависимия отговор към протеинови антигени (дифтериен и тетаничен анатоксин) в различни 3 възрастови извадки от българската популация и да се сравнят с промените в субкласовете на ИгГ, имунизационния статус и клиничната симптоматика. В проучването са включени 210 лица, разделени в пет възрастови групи: 0-3г., 4-5г., 6-11г., 12-16г., 17-50г., съобразени с

имунизациите извършени по имунизационния календар на Р.България. Резултатите показват възрастова динамика на нивата на основния имуноглобулин Г и неговите четири подкласа. Протективният отговор към протеинови антигени намалява с възрастта. Нивото на серопротекция е по-добро към тетаничен, отколкото към дифтериен анатоксин във всяка възраст. В малките възрастови групи има по-слаб протективен титър към капсулирани пневмококови полизахаридни антигени от ИгГ и ИгГ2 субтип. При възрастните отговорът към пневмококови антигени нараства, вероятно свързано с естествения имунен отговор към серотипове в околната среда. В заключение, настоящето проучване дава комплексна оценка на поствакциналния отговор към протеинови и полизахаридни антигени и корелацията му със субкласовете на ИгГ и клиничното състояние на индивидите. Резултатите от това първо по рода си изследване за българската популация предоставят съществен информация за нивото на протекция срещу тези антигени и позволяват отдиференциране на лицата суспектни за имунен дефицит. В допълнение получената информация може да послужи за персонализирана вакцинална програма при рискови групи от населението.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Наумова Е. Първични имунни дефицити- постижения и предизвикателства. X-та юбилейна конференция за редки болести и лекарства сираци, 13-15.09.2019, Пловдив

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

#### **Договор 104/2019 Изследване на полиморфизмите rs2279115 и rs956572 в Bcl2 гена като фактор за развитието на дерматомиозит у възрастни**

**Изследователски екип:** Доц. Любомир Асенов Дурмишев, дм

- Проф. Радка Кънева, дб
- Мария Христова, дм
- Радосвета Божилова, докторант
- Йоана Пожарашка, докторант

**Базова организация:** Катедра по дерматология и венерология, бул. „Георги Софийски” 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Бяха изследвани 47 (16 мъже и 31 жени) пациента с дерматомиозит и 100 (26 мъже и 74 жени) здрави контроли посредством PCR в реално време. Генотипното и алелното разпределение демонстрира асоциация на генотипа rs956572 GG ( $p=0.04$ , OR 2, 95% CI 1-4.1) и на аела G ( $p=0.02$ , OR 1.8, 95% CI 1-3) с развитието на ДМ. При прилагане на свръхдоминантен модел на анализ, се наблюдава по-висока честота на генотипа rs2279115AC сред контролите ( $p=0.04$ , OR 0.5, 0.2-1). Проведеният хаплотипен анализ показва по-висока честота на хаплотипа GA сред пациентите с ДМ ( $p=0.07$ ). Получените резултати демонстрират, че полиморфизмите в Bcl2 гена имат влияние за развитие на дерматомиозит при български пациенти.

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

**Договор 116/2019    Генетичен анализ за мутации на гена **UMOD** за доказване на автозомна доминантна тубуло интерстициална бъбречна болест**

**Изследователски екип:** Доц. Мария Симеонова Гайдарова, дм

- Гл. ас. Олга Белчева, дб, Център по молекулна медицина, катедра „Медицинска химия и биохимия“
- Кунка Каменарова, дб
- Ас. Стефка Цочева
- Ас. Васил Василев

**Базова организация:** катедра „Педиатрия“, бул. Акад. Иван Гешов 11, София 1606

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящия проект бе изясняване на генетичната етиология на тубулоинтерстициалните увреждания – хетерогенна група от социално значими, нефрологични заболявания свързани с остро и/или хронично възпаление на тубулната система или интерстициума на бъбреците. В рамките на разработката използвахме метода на прицелното екзомно секвениране с панел от 4 813 гена (генен панел TSO, платформа MiSeq, Illumina) за идентификация на генетични варианти с потенциален принос към патогенезата на заболяването при четирима пациенти от български произход – трима мъже и една жена. Анализът на резултатите от проучването очаквано извади на показ голямото разнообразие в молекулната патология на тази група заболявания. Идентифицирани бяха генетични варианти с доказано или потенциално патогенен ефект в 4 различни гена – *SERPINA6*, *COL4A5*, *B3GLCT* и *PAX2*, които кодират съответно кортикостероид-свързващ глобулин (транскортин),  $\alpha 5$  веригата на колаген тип IV, гликозилиращият ензим  $\beta$  1,3 галактозилтрансфераза и транскрипционния фактор Paired Box Gene 2. Описани бяха три еднонуклеотидни замени, които водят до промени в аминокиселинната последователност на кодираните полипептидни вериги и делеция, обхващаща цял екзон, вероятно свързана с отсъствие на белтъчен продукт или производство на такъв с променени структура и функция. Аминокиселинните замени засягащи *SERPINA6* и *COL4A5* са опасни в литературата и са отговорни съответно за намалена активност на кортикостероид-свързващия глобулин и X-свързан синдром на Алпорт. Изясняването на ролята на другите два варианта, новоописаната делеция в *B3GLCT* и аминокиселинната замяна в *PAX2* за появата на заболяването ще бъдат обект на бъдещи научни разработки на колектива. Настоящото проучване бе първи по рода си опит за проучване на генетичните основи на тубулоинтерстициалните увреждания на бъбрека в България. Очаква се резултатите от него да бъдат от ключово значение за терапията на пациентите и генетичното консултиране на техните семейства, а така също и да допринесат за изясняване на молекулярните механизми отговорни за поддържането на нормалната функция на бъбрека.

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

**Договор 148/2019    Молекулярно-генетичен анализ за носителство на мутации в *TERT*, *BRAF* и *NRAS* гените при пациенти с папиларен щитовиден карцином**

**Изследователски екип:** Проф. Радка Петрова Кънева, дб

- Доц. Атанаска Миткова, дб
- Румяна Додова, дб
- Гл. ас. Калин Видинов, дм

- Проф. Радина Иванова-Боянова
- Инна Димитрова, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Карциномът на щитовидната жлеза е най-често срещаният вид ендокринен рак. Наскоро бяха идентифицирани някои соматични мутации в гени (като *BRAF*, *NRAS* и *TERT*), участващи в ключови сигнални пътища и стабилността на генома, които играят важна роля в неговото развитие. Въпреки това са направени много малко изследвания върху тяхната честота и клинична значимост при български пациенти с папиларен рак на щитовидната жлеза (РТС). Това проучване е фокусирано върху изследване на честотата на соматичните мутации при български пациенти с РТС и тяхната връзка с клиничнопатологична характеристика. Проучването включва 58 РТС проби от български пациенти, анализирани за мутации в гени *BRAF* (V600E), *NRAS* (Q61K), гените на единичния нуклеотиден полиморфизъм (SNP) rs2853669 и *TERT* (C228T и C250T) чрез Sanger секвениране. Резултатите бяха интерпретирани с помощта на софтуер Benchling и SeqScape и статистическия анализ извършен със SPSS. В изследваната РТС група мутации *BRAF* (V600E), *NRAS* (Q61K) и *TERT* (C228T) са открити с честота съответно 29,31 %, 2% и 2%. Съвместната поява на двете мутации *BRAF* (V600E) и *TERT* (C228T) бе открита при 1 пациент. Мутация C250T (*TERT*) не беше открита. SNP rs2853669 е открит при 23 пациенти (51,1%). Корелационният анализ с клиничните характеристики на пациентите показва статистически значима връзка с по-голям размер на тумора за *BRAF* (V600E) и по-малък размер на тумора за rs2853669. В настоящото пилотно проучване открихме, че *BRAF* (V600E) и rs2853669 в *TERT* са често срещани сред пациенти с РСТ. Поради потенциално модифициращата роля на rs2853669 върху активиращите мутации на *TERT* и комбинирания ефект на *BRAF* и *TERT* мутация върху туморната агресивност, оценката на техния ефект трябва да се извършва едновременно при различните тумори. Необходим е по-обширен анализ на мутации в *TERT*, *BRAF* и *RAS* в по-голяма група пациенти за по-нататъшното изясняване на клинично важните диагностични и прогностични биомаркери за рак на щитовидната жлеза.

**Научни публикации и прояви:**

- Vidinov K, Dodova R, Mitev P, et al. Clinicopathological significance of BRAF (V600E), NRAS (Q61K) and TERT (C228T, C250T and SNP rs2853669) mutations in Bulgarian papillary thyroid carcinoma patients., Endocrine Pathology 2021;48(1).
- Dodova R, Mitev P, Mitkova A, et al. Analysis of BRAF, NRAS, TERT mutations in Bulgarian papillary thyroid carcinoma patients, EACR-OECI Joint Conference: Molecular Pathology Approach to Cancer: Lisbon, Portugal, 18-20 May, 2020

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

**Договор 52/2018** Проучване на корелационната зависимост между показатели за обмяната на желязо и ИМТ при пациенти със сънна апнея**Изследователски екип:** Проф. д-р Огнян Борисов Георгиев, дм

- Гл. ас. Виктор Манолов, дм
- Гл. ас. Венцислава Пенчева-Генова, дм
- Гл. ас. Радослава Грозданова, дб - НЦЗПБ
- Акад. проф. Лъчезар Трайков, дмн
- Проф. Юлия Петрова, дмн
- Проф. Камен Цачев, дмн
- Доц. Савина Хаджидекова, дм
- Гл. ас. Мариета Караджова, дм
- Силвия Волева - НЦЗПБ
- Проф. Мария Николова, дмн - НЦЗПБ
- Гл. ас. Георги Ангов, дм
- Ас. Ирен Петрова-Иванова
- Тодор Кунчев, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Проучиха се серумните нива на хепсидин при 35 пациента със сънна апнея и се потърси зависимостта им с показатели за мозъчно-съдови атеросклеротични промени. Получените резултати са сравнени с аналогичен брой здрави доброволци без сънна апнея и без мозъчно-съдови атеросклеротични нарушения, установени с идентични клинично-лабораторни и функционални изследвания. Установено е статистически значимо: Повишено серумно ниво на хепсидин при пациенти със сънна апнея и с установени мозъчно-съдови атеросклеротични промени ( $101.9 \pm 10.1 \mu\text{g/l}$ ) спрямо здрави доброволци ( $18.5 \pm 2.5 \mu\text{g/l}$ );  $P < 0.001$ . Повишаване на серумния хомоцистеин при пациенти със сънна апнея ( $29.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/l}$ ) спрямо контролната група ( $1.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$ );  $P < 0.001$ . Серумните нива на витамин В12 показаха статистически значимо намаляване при пациенти със сънна апнея ( $71.7 \pm 9.9 \text{pmol/l}$ ) спрямо контролната група ( $449.7 \pm 21.4 \text{pmol/l}$ );  $P < 0.001$ . Повишени показатели за съдово-мозъчни атеросклеротични изменения (ИМТ и АВІ) при пациенти със сънна апнея ( $1.22 \pm 0.19$  и  $1.71 \pm 0.14$ ) спрямо здравите доброволци ( $0.34 \pm 0.07$  и  $1.11 \pm 0.06$ );  $P < 0.005$ . Определянето на корелационна зависимост между серумните нива на хепсидин и хомоцистеин показа  $r = -0.849$ , при  $P < 0.001$ . Степента на намаляване на серумно ниво на витамин В12 при пациенти със сънна апнея показва отрицателна зависимост спрямо хепсидина, като  $r = -0.844$ , при  $P < 0.001$ . Изследваните серумни концентрации на СRР допълниха състоянието на системно възпаление при пациенти с обструктивна сънна апнея ( $14.7 \pm 1.3 \text{mg/l}$ ). Наличието на връзка между нивата на хепсидин с наличието на плаки и АВІ, потвърждава участието на хепсидина в развитието на атеросклерозата. Пептидът има установена роля при прогреса на сърдечно-съдови и метаболитни заболявания. Установихме значителна положителна корелационна зависимост между серумен хепсидин и АВІ и ИМТ при пациенти със сънна апнея, като  $r = 0.913$

(общо), при  $P < 0.001$ . Повишените нива на хомоцистеин, както и понижените концентрации на витамин В12 корелират с кардиоваскуларни фактори като хиперхолестеролемия, артериална хипертония, захарен диабет, хронична сърдечна недостатъчност, както и с ИМТ на кръвоносните съдове. Количественото определяне на хепсидин в серум играе роля на маркер за ранна диагностика на нарушената хомеостаза на желязото, микроелемент участващ в патогенезата на атеросклеротичните изменения на кръвоносните съдове при пациенти със сънна апнея.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Manolov V, Georgiev O, Pencheva-Genova V, et al. Sleeping apnea changes IMT and FMT causing atherosclerosis. Int Conference on Biomarkers and Clinical Research. 30-31.01.2019, Abu Dhabi, UAE
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Evaluation of serum hepcidin concentrations in patients with obstructive sleep apnea. 11<sup>th</sup> International Conference on Vascular dementia. 15-16.02.2019, Amsterdam, Netherland
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. IMT, FMT, homocysteine and serum hepcidin in obstructive sleep apnea. BrainTech 2019. 04-05.03.2019, Tel Aviv, Israel
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Homocysteine, IMT and FMT correlates to iron homeostasis changes in obstructive sleep apnea patients. 5<sup>th</sup> International Conference on Neurology and Neurological Disorders. 04-05.03.2019, Amsterdam, Netherland
- Manolov V, Georgiev O, Pencheva-Genova V, et al. Serum hepcidin correlates to atherosclerotic a. carotis changes in obstructive sleep apnea patients. 3<sup>rd</sup> Annual Neuroscience in Intensive Care International Symposium. 08-09.03.2019, Washington DC, USA
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Serum hepcidin concentrations and atherosclerotic changes in patients with obstructive sleep apnea. 3rd World Nephrology Congress. 20-21.03.2019, Amsterdam, Netherlands
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Serum hepcidin correlates to IMT and FMT changes in obstructive sleep apnea. Haematology Summit-2019. 09-10.04.2019, Kuala Lumpur, Malaysia
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Atherosclerotic changes in patients with obstructive sleep apnea. 4<sup>th</sup> Edition of International Conference on Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 15-16.04.2019, Paris, France
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Atherosclerotic changes of a. carotis and serum hepcidin in patients with obstructive sleep apnea. 2<sup>nd</sup> International Conference on Dementia & Dementia Care. 15-16.04.2019, Toronto, Canada

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

#### **Договор 63/2018      Статус на микроелементи и витамин Д при бременни жени с гестационен захарен диабет**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Добрин Аврамов Свиначков, дн

- Доц. Бисера Атанасова, дм
- Доц. Марианка Петрова –Яначкова, дм
- Д-р Ирена Иванова, дм

- Доц. Виолета Димитрова, дм
- Д-р Яна Христова
- Доц. Катя Годорова, дм

**Базова организация:** Катедра по клинична лаборатори, ул. Г. Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на проекта е да се проучат промените в нивото на вит. Д, микроелементите желязо, мед, цинк и селен; да се оцени статуса им във връзка с ефектите на адипокинините лептин и адипонектин при бременни с риск от гестационен захарен диабет /ГЗД/. В проучването са включени 61 бременни жени ( $n_1=31$  здрави,  $25.9\pm 4.5$  г.с и  $n_2=30$  бременни с ГЗД,  $26.87\pm 5.3$  г.с). При всички пациентки беше извършен 2 ч ОГТТ с трикратно определяне на глюкоза чрез ензимен амперометричен метод; желязо, мед и цинк-пламъкова атомно-абсорбционна спектроскопия; селен-електротермична ААС; имунотурбидиметричен метод-CRP, феритин, церулоплазмин, трансферин; тандем-маспектрометрия, TSQ Quantum (Discovery Max)-вит. Дз и имунологичен метод ELISA – лептин, адипонектин и хепсидин. При определяне на глюкозата се получиха значими разлики за двете групи бременни жени:  $n_1$ - 0 мин  $4.32 \pm 0.38$  ммол/л; 60 мин -  $6.42\pm 1.48$ ; 120 мин  $-5.1 \pm 1.27$ ; ;  $n_2$ -0 мин  $-5.23 \pm 0.4$ ; 60 мин  $-8.57 \pm 2.29$ ; 120- $6.56 \pm 2.22$  ( $P<0.01$ ;  $P<0.002$ ;  $P<0.02$ ). Изследвания на лептин, адипонектин, хепсидин, желязо, ГЖСК и статус на вит Д за  $n_1$  -  $23 \pm 13.3$  ng/ml;  $7.62 \pm 4.3$   $\mu$ g/ml;  $2.54\pm 0.46$  ng/ml;  $17.4\pm 5.9$   $\mu$ mol/l;  $75.6\pm 11.62$   $\mu$ mol/l;  $60\pm 22$  nmol/l; за  $n_2$  -  $31.74 \pm 24.7$  ng/ml;  $5.4\pm 1.41$   $\mu$ g/ml;  $2.81\pm 0.57$  ng/ml;  $15.01\pm 5.7$   $\mu$ mol/l;  $80.9\pm 11.0$   $\mu$ mol/l;  $52.7\pm 24.4$  nmol/l ( $P<0.02$ ;  $P<0.04$ ;  $P=0.69$ ;  $P=0.07$ ;  $P<0.04$ ;  $P=0.47$  ( $P<0.02$ ;  $P<0.04$ ;  $P=0.69$ ;  $P=0.07$ ;  $P<0.04$ ;  $P=0.47$ ). Определяне на мед, цинк, селен и церулоплазмин за  $n_1$  -  $31.0\pm 4.09$ ;  $13.8\pm 3.6$ ;  $730 \pm 196$ ;  $0.59\pm 0.14$ ; за  $n_2$ - $34.1 \pm 4.4$   $\mu$ mol/l;  $14.3 \pm 3$   $\mu$ mol/l;  $718 \pm 158$   $\mu$ mol/l;  $0.58\pm 0.08$  g/l ( $P<0.02$ ;  $P=0.61$ ;  $P=0.83$ ;  $P=0.7$ ). ГЗД групата се характеризира с по-ниски серумни стойности от здравите бременни в комбинация със значително повишаване на % насищане на трансферин/  $P < 0.016$ /, без разлика за хепсидин, което предполага дефицит на желязо. Установени са значими разлики между адипонектин и лептин, потвърди се хиперлептинемията като характерен метаболитен признак при бременни с ГЗД в българска популация жени, значима негативна връзка с нивото на желязото, висока позитивна корелационна връзка с вит Д, за разлика от  $n_1$ . Здравите бременни имат по-високо ниво на вит Дз в сравнение с бременните с ГЗД и група здрави - отчасти и поради чисто физиологични механизми. Силно повишена серумна мед по време на бременност може да бъде във връзка с повишен афинитет за свързване на медните йони към церулоплазмин и стимулиран от естрогените синтеза на белтъци. Наблюдаваната тенденция за намаляване на съотношението Cu: Ср може да отразява крайното изчерпване на медния лабилен пул поради стимулирания трансфер на медни йони към плода и увеличен синтез на апоцерулоплазмин. Съотношението при ГЗД предполага противоположни комбинирани ефекти на сложни молекулярни механизми: от една страна физиологично изчерпване поради бременност и от друга - увеличаване лабилния меден пул поради инсулиновата резистентност при бременност, по-изразена при ГЗД. Съотношението Cu/Zn, без значима разлика са CRP и селен при двете групи бременни, са потвърждение за липсата на значима патология на бременността, без прояви на оксидативни и възпалителни усложнения.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Genova M, Atanasova B, Ivanova I et al. Status na vitamin D pri sdрави bremenni geni. XI Nationalna konferencia po Klinichna laboratoria. Plovdiv. 27-29.09.2018. p-47



- Genova M, Atanasova B, Todorova-Ananieva K. In: Önal AE (Ed.), Body-mass index and health, vol. 2. IntechOpen, London, 2019, pp 19-53
- Ivanova I, Ivanova-Tododrova E, Kyurkchiev D et al. 25-OH Vitamin D3/D2 insufficiency in healthy subjects and patients with autoimmune disorders. 1st IFCC, EFLM, AFCB, FIFBCML CONFERENCE. ROME. 02-04.07.2018.
- Genova M, Atanasova B, Ivanova I et al. Copper, ceruloplasmin and copper:ceruloplasmin ratio in healthy pregnancy and gestational diabetes. 23rd IFCC-EFLM European congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Barcelona. 19-23.05.2019
- Genova M, Atanasova B, Ivanova I et al. Copper levels, copper:ceruloplasmin ratio and body mass index in normal pregnancy and GDM. The 10th International Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome and Pregnancy. Florence. 29.05-01.06.2019.

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

### **Договор 86/2018 Провизорите като протетичен инструмент за управление на меките тъкани около дентални импланти**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Андон Димитров Филчев, дн

- Доц. Димитър Филчев
- Ас. Нели Николова

**Базова организация:** Катедра „Протетична Дентална Медицина”, ул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Заместването на липсващите естествени зъби с дентални имплантати изисква планирано и прецизно манипулиране на меките и твърди тъкани в зоната на имплантиране, водено от биологични, функционални и естетични критерии. Използването на имплантатни провизори с подходящ преходен профил е необходимо не само за скулптиране на супраимплантатните меки тъкани, но и за гарантиране на тяхната стабилност във времето, а от там и на цялата имплантатна протеза. Настоящото изследване има за цел да представи: 1) протетична карта на имплантатно дентално лечение, която систематизира и архивира детайлно информацията, касаеща протетичният аспект от имплантатното лечение, 2) метод за детайлно планиране и изработване на индивидуализирана временна имплантатна протеза, 3) създаване на оптимална супраимплантатна мекотъканна архитектуроника. Допитване до 31 лекари по дентална медицина с опит в имплантатното дентално лечение за значението на конкретни характеристики на периимплантатните меки тъкани (ПИМТ) при изработването на имплантатната супраструктура (ИСС). Практически тест за разпознаване на специфични характеристики на ПИМТ, извършен от четирима зъболекари с различно ниво на опит в имплантатното протезиране, които бяха подробно информирани и инструктирани как да отчитат параметрите за състоянието на ПИМТ в 10 места за имплантиране. Изработване на 20 винтово фиксирани имплантатни провизора, следвайки специално разработен клинично-лабораторен протокол. Създаване на протетична карта, състояща се от паспортен раздел, съдържащ кратка информация за пациента; раздел, съдържащ информация за импланта; раздел, съдържащ информация за ПИМТ; раздел, съдържащ информация за планираното имплантно възстановяване. Постигнатата конфигурация на провизор/меки

тъкани демонстрира стабилност за времето на наблюдение-3м. и доказва ефективността на приложената методика. Организацията и оформянето на картата позволяват много точно отбелязване на всички важни за имплантатното протезиране данни, както и проследяването им във времето. От практическа гледна точка това е един много удобен способ за съхраняване на информация и последващ анализ както за клинициста така и за пациента. Описаната техника за изработване на имплантатен провизор и управление на ПИМТ е лесна, точна, предвидима и използваема от голям кръг лекари по дентална медицина.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Nikolova N, Filchev D, Filchev A. Prosthetic Implant Map (PIM) –Accurate and Convenient Assistant in Successful Implant Treatment. Journal of IMAV. 2020;26(1)
- Nikolova N, Filchev D. Method for provisional implant supra-structure creation and transference. Infodent. 2019;3

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

#### **Договор 90/2018 Създаване на протокол за оценка на екстраорален статус на ортодонтски пациенти по фотографски анализ и база данни за ортодонтски архив**

**Изследователски екип:** Доц. Мирослава Милети Динкова, дм

#### **Членове на изследователския екип:**

- Д-р Нели Дилкова
- Гл. ас Мартин Мариянов
- Гл. ас Виктория Гургуриева- Иванова

**Базова организация:** Катедра „Ортодонтия“, бул. Г Софийски 1

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е създаване на протокол за оценка на екстраорален статус на ортодонтски пациенти по фотографски анализ на лице и база данни за ортодонтски архив. Изследвани са общо 105 пациенти, разпределени както следва: 32 със смесено съзъбие, 38 растящи пациенти с постоянно съзъбие (12 – 18 год.) и 35 възрастни нерастящи пациенти (19 – 45 год.). При тези три възрастови групи се изследват промените на основните параметри за анализ. За проучване на статистическа зависимост между ляв и десен профил са изследвани 60 пациенти между 16 и 45 годишна възраст. На всички пациенти са изработени клиничен, биометричен, цефалометричен (профилна телерентгенография, ортопантомография) и фотографски ортодонтски анализ. Направена е пълна фотодокументация – екстраорални фотоснимки (фас – покой, фас – усмивка, профил – ляв и десен, полупрофил и полупрофил в усмивка) и интраорални фотоснимки. Разработихме протокол за изработване на профилна фотоснимка в пет стъпки и метод за оценка, включващ 3 линейни и 5 ангуларни измервания. Установихме степента на корелация на ляв и десен профил. Пълно съвпадение на измерващите показатели наблюдаваме при 30,36% от изследваните пациенти. При 42,86% има разлика от  $\pm 1\text{cm}$  и  $\pm 2^\circ$ . При 26,79% разликата е повече от  $\pm 1\text{cm}$  и  $\pm 2^\circ$ . Установихме значими промени при долна лицева височина, ъгъл на пълна мекотъканна конвексност, фронтоназален и назолабиален ъгъл от смесено към постоянно съзъбие в изследваните възрастови групи. Методиката позволява съпоставка на ляв и десен профил на изследваните пациенти и установяване на степен на симетрия. Създадените протоколи позволяват стандартизиране на методите за диагностика, което би подпомогнало създаване на стандарт и правила за

добра практика по ортодонтия. Предложеният от нас метод за анализ на профилна фотоснимка е клинично приложим и дава възможност за диагностика, планиране, проследяване и оценка на ортодонтското лечение.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Динкова М, Дилкова Н, Мариянов М и др. – Оценка на екстраорален статус на ортодонтични пациенти по профилна фотоснимка, сп. „Ортодонтични преглед” 2019;21(1):13-21.
- Dilkova N, Dinkova M, Comparison between left and right profiles by using extraoral photo analysis”, SIDO Congress, Rome, Italy, 10-12.10.2019

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

#### **Договор 91/2018      Епидемиология на деформациите и оценка на различията в ортодонтичните подходи на проведените лечения от студенти и специализанти във ФДМ – София за период от 5 години**

Изследователски екип: Доц. Грета Русанова Йорданова-Костова

#### **Членове на изследователския екип:**

- Гл. ас. Виктория Гургуриева- Иванова
- Д-р Айше Вехова
- Д-р Лилия Ангелова
- Марио Грънчаров, студент
- Сибела Сандева, студент
- Велина Милушева, студент

**Базова организация:** Катедра Ортодонтия, София 1608, ул. Г Софийски 1

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта, която си поставихме е създаване на система за дългосрочно проследяване честотата на ортодонтичните деформации, архивиране и класифициране на диагностичната информация на пациентите; въвеждане на нови лекционни и семинарни занятия повишаващи клинична компетентност на студентите и специализантите съответстващи на тези деформации. В изследването са включени 661 пациента с екзактна документация, лекувани в катедрата от специализанти – 365 и от студенти – 296. Пациентите са разпределени в подгрупи по вид на съзъбие и етапност на проведеното им лечение. Прилагана е методика на отдеференциране, класифициране и честота на различните ортодонтични деформации, етапите на тяхното лечение и разликите в лечебните подходи. Установихме, че най-разпространената ортодонтична деформация е дисталната захапка (55.20%), следвана от дълбоката захапка (48%), кръстосана във фронта (11.6%) и в страничния участък (15%), медиална захапка (9.1%). За диагностицирането на повечето от тези деформации се изисква доказване с параклинични методи (рентгенологични), което прави чисто клиничните епидемиологични методи неточни. Установено беше, че при значим процент от леченията на тези пациенти са прилагани лечебни методи и техники, които не се преподават в учебните програми. Това са нови апарати (MIA, Pendulum, FROG, Twin block и други), които масово се ползват при нашите лечения благодарение на високата компетентност на водещите лечението преподаватели, но не са изцяло теоретично познати на студентите и специализантите. В учебната програма не е включена семинарна подготовка за работа със СВСТ изследване, а това се налага при пациентите с ретенирани зъби, които са 12.9% от тези лекувани при специализантите. От изследването

се наложи извода, че се провеждат лечения с няколко апарата, но в един растежен период (основно пубертет), което намалява продължителността на ортодонтското лечение. Данните от нашето изследване налагат допълване и адаптиране на учебните програми с нови тематики и клинични дейности. Анализирани са актуалните данни за честотата на ортодонтските деформации е основата за тяхната превенция.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Йорданова Г, Гургуриева В. Проучване на малоклузиите с най-голяма честота, лекувани при студентско и специализантско обучение във ФДМ – София. Ортод. Преглед 2018; 20(2):16-26.
- Yordanova G, Mladenov M, Gurgurova G, V Gurgurieva. Assessment of Treatment Phases of Class II Malocclusion Treatment. IJSR, 2019; 8(2): 43-46.
- Младенов М, Гургуриева В, Йорданова Г. Ефективност на апарата Twin block при лечение на дистална захапка в студентско обучение. Постерна презентаци, II научен конгрес „Наука и практика – ръка за ръка“ 12-13.04.2019, Пловдив

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

#### **Договор 92/2018 Създаване на софтуерен продукт за дигитален анализ на данните при работа с лицева дъга „Face bow Mini-Maxi”**

**Изследователски екип:** Доц. Жанина Стамова Павлова

- Проф. Андон Филчев, дмн
- Ас. Антон Тумбалов

**Базова организация:** Катедра „Протетична дентална медицина“, ул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на изследването е създаване на компютърна програма за прецизно дигитално обработване на данни от регистри, направени с лицева дъга „Face-bow Mini-Maxi” и улесняване на трансферирането на информацията в артикулатор. Беше разработен идеен проект за създаването на нов софтуерен продукт и бяха формулирани изисквания за възможностите му, които да служат за ръководна насока при създаването му. С помощта на компютърен програмист проектът беше реализиран. Програмата беше апробирана чрез обработка на данните на 101 пробанти (52 мъже и 49 жени). С помощта на лицева дъга „Face-bow Mini-Maxi” бяха регистрирани сагиталният кондилен път, вляво и вдясно и беше определена централната позиция на долната челюст чрез интраорално графично регистриране. Данните на всеки пробант бяха въведени в програмата и чрез нея отново бяха изчислявани индивидуалните стойности на регистрираните параметри. След това беше направен сравнителен статистически анализ на данните получени чрез ръчното измерване и тези установени чрез компютърната програма. Беше създадена компютърна програма “Facebow Mini-Maxi Analyzer”. Програмата осигурява автоматично разпознаване, разчитане, калибриране и измерване с максимална прецизност на данни по снимка на регистри, снети с лицева дъга „Face-bow Mini-Maxi”. Главният модул на програмата дава възможност за измерване на стойностите на сагиталния кондилен път, съответно вляво и вдясно; на стреловидния ъгъл намерен чрез интраорално графично регистриране и на дължината на осреднената хоризонтална сатван ос. След завършване на изчисленията софтуерът автоматично е генерира схема с визуализация на параметрите, която подпомага значително зъботехника при определяне на правилната позиция на

работните модели при включването им в артикулатор. Чрез изследването бяха установени средните стойности на важни параметри за протетичното лечение: дължината в милиметри на аурикуларната ос – 117.54 mm; на кондилната ос – 138.13 mm; на осреднената хоризонтална ставна ос -127.41 mm; на сагиталния кондилен път, съответно вляво -35.86° и вдясно - 34.89°; големината на стреловидния ъгъл – 107.52°. Компютърната програма осигурява прецизен анализ на данните снети с лицева дъга. Проведеният сравнителен анализ, относно точността на параметрите, определени чрез програмата и чрез конвенционален мануален метод показва висока надеждност на продукта. Софтуерът позволява създаване и съхранение на голяма база данни за научни изследвания.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Тумбалов А, Филчев Д, Павлова Ж, Филчев А. Дължина на аурикуларната, кондилната и осреднената хоризонтална ставна ос. Дентална медицина, 2018
- Pavlova Zh, Tumbalov A, Filtchev A. Computer program for digital data analysis of facebow records. Part 1. Acta Medica Bulgaria 2020;47(1):36-44.
- Pavlova Zh, Tumbalov A, Filtchev A. Computer program for digital data analysis of facebow records. Part 2. Examination of a sagittal condylar pathway and an arrow point angle. Acta Medica Bulgaria 2020;47(2):12-17.
- Pavlova Zh, Tumbalov A, Filtchev A. Computer program for digital data analysis of “Facebow Mini-Maxi”. 24<sup>th</sup> BAASS Congress, May 9-11, 2019, Tirana, Albania, PP 337<sup>4</sup>

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

#### **Договор 103/2018 Маркери на костната обмяна и сърдечно-съдови рискови фактори при синдром на поликистозните яйчници**

Изследователски екип: Гл. асистент Антоанета Трифонова Гатева, дм

- Проф. Здравко Каменов, дмн
- Ас. Аделина Цакова

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

**РЕЗУЛТАТИ:** FGF23 and Klotho са широко проучени във връзка с костния метаболизъм и прогресията на хроничното бъбречно заболяване. Има обаче много оскъдни данни по отношение на ролята им при синдром на поликистозните яйчници (СПЯ). Целта на настоящето проучване е да се изследват някои костни маркери (FGF23, Klotho, Osteopontin, RANKL, витамин К2, 25(OH)D) и връзката им със затлъстяването и сърдечно-съдовия риск при жени със СПЯ. В проучването включихме 80 пациентки, разделени в три групи, сходни по възраст – СПЯ без затлъстяване (n=40); СПЯ със затлъстяване (n=20) и контролна група със затлъстяване без СПЯ (n=20). Проведени бяха антропометрични и биохимични изследвания. Костните маркери (FGF23, Klotho, Osteopontin, RANKL, витамин К2, 25(OH)D) бяха изследвани с помощта на ензимно-свързан имуносорбентен метод (ELISA). Пациентките със СПЯ и затлъстяване имаха по-високи нива на FGF23 и sRANKL, по-ниски на 25(OH)D и по-висока честота на витамин Д дефицит в сравнение с жените без затлъстяване. Участничните с абдоминален обезитет (обиколка на талията >80 см) имаха значимо по-високи нива на FGF23 (112.5±86.5 vs. 73.4±37.9 pg/ml; p=0.023) и по-ниски на 25(OH)D (35.8±21.4 vs 47.8±26.5 nmol/l; p=0.034). Пациентките със СПЯ и повишен сърдечно-съдов риск също имаха значимо по-високи нива на FGF23 (111.6 ±84.5 vs. 66.5±35.1 pg/ml; p= 0.031) и намалени

на 25(OH)D ( $31.9 \pm 16.8$  vs.  $47.1$  vs  $28.4$  nmol/l;  $p = 0.017$ ) в сравнение с тези без риск. По отношение на останалите костни маркери не бяха установени такива разлики. Нивата на витамин К2 имаха тенденция към по-високи нива при жените без затлъстяване макар и да липсваше статистическа значимост. Не се установи разлика между жени със и без абдоминален обезитет или повишен сърдечно-съдов риск. Не се установи корелация между костните маркери и нивата на кръвна захар, инсулиновата резистентност и хормоналните нива с изключение на негативната корелация между 25(OH)D и тестостерона. В заключение при пациентки със СПЯ FGF23 and 25(OH)D са свързани с абдоминалното затлъстяване и сърдечно-съдовия риск.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Gateva A, Tsakova A, Hristova J, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and 25(OH)D levels are related to abdominal obesity and cardiovascular risk in patients with polycystic ovarian syndrome. Gynecological endocrinology. 2019 Nov 10:1-4.

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

### **Договор 104/2018 Серологични и молекулярно-генетични проучвания върху участието на хепатит Е вируса в патогенезата на неврологични заболявания**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Ивайло Людмилев Търнев, дмн

#### **Членове на изследователския екип:**

- Гл.ас. Сашка Желязкова-Главеева, дм
- Д-р Тенчо Тенев - НЦЗПБ
- Гл.ас. Елица Голкочева-Маркова, дб - НЦЗПБ
- Доц. Евелина Шикова-Лекова - НЦЗПБ

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящето изследване бе да се определи участието на хепатит Е вируса в патогенезата на възпалителни заболявания на централната и периферна нервна система, като синдром на Гилен-Баре, брахиална невралгична амиотрофия и менингоенцефаломиелити. За изпълнение на така поставената цел бяха изследвани кръвни серумни проби и церебро спинална течност (ликвор) на пациенти с проявена неврологична симптоматика. Антитела срещу HEV (anti-HEV IgM и IgG) в серумните проби бяха доказани чрез прилагане на имуноензимни методи - ELISA. Всички проби бяха тествани и за наличие на антитела и срещу инфекция с останалите хепатотропни вируси, цитомегаловирус и Епщайн-Бар вирус с цел точен подбор на таргетната популация и детекция на пациенти с ко-инфекции и вирусни инфекции, даващи фалшиво положителни резултати при използване на серологичните тестове за детекция на антитела срещу HEV. Серумните проби и ликвора бяха тествани допълнително посредством полимеразно верижна в реално време за определяне вирусната концентрация на HEV. От 40, включени в проучването пациенти, 21 (53%) са дали положителен резултат за наличие на антитела срещу HEV като 8 (40%) от тях са положителни за anti-HEV IgM и за anti-HEV IgG. Само при един anti-HEV IgM и IgG положителен пациент се доказва наличие на HEV RNA в серума с концентрация  $115$  [IU/ml]. Изследвани за наличие на HEV RNA са и 12 ликвора, като никой от тях не е дал положителен резултат. Положителните за HEV пациенти се характеризират с преобладаваща неврологична симптоматика и със слабо раздвижена серумна биохимия. Установи се преобладаващо хронична форма на Гилен-Баре с умерено

тежко засягане на сетивно-моторните нерви. При всички пациенти е приложена терапия с Имуновенин, като пълно възстановяване е постигнато само при един пациент, който е със серологичен профил на остра HEV инфекция. Кръстосана реактивност се установява при един пациент и то по отношение на CMV. От получените резултати може да се заключи, че навременото диагностициране на HEV инфекция, като причинител на неврологична симптоматика, е решаващо за прилагане на адекватно лечение, а от там и за постигане на терапевтична успеваемост при съответните пациенти.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Голкочева-Маркова Е, Желязкова С, Тенев Т, и др. Участие на хепатит Е вируса в патогенезата на неврологични заболявания. Мед. Преглед., 2019; 55 (3): 19-23.

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

### **Договор 105/2018    Органокини при мъже с късен хипогонадизъм и метаболитен синдром**

**Изследователски екип:** Проф. д-р Здравко Асенов Каменов, дмн

- Ас. Явор Асьов, дм
- Гл .ас. Антоанета Гатева, дм
- Цветан Гатев, докторант
- Ас. Аделина Цакова, дм
- Ас. Вера Карамфилова, докторант
- Ивета Недева, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Късният хипогонадизъм е клиничен и биохимичен синдром, зависещ от възрастта, характеризиращ се с намалено либидо, еректилна дисфункция, повишена мастна маса и намалена мускулна маса. Ползите от тестостерон-заместителното лечение върху мускулната маса са добре описани, но механизмите на тази асоциация не са напълно изяснени. Потенциално обяснение може да произтича от концепцията, че напречно-набраздените мускули и мастната тъкан произвеждат хуморални фактори – миокини и адипокини, наречени обобщено органокини, които се изменят в хода на лечението и комуникират с други органи и системи. В настоящата студия изследвахме 40 мъже с късен хипогонадизъм и метаболитен синдром изходно и в хода на тестостерон-заместително лечение за промените, настъпващи в метаболитните и антропометричните параметри, а също така и в циркулиращите нива на някои органокини: лептин, адипонектин, резистин, висфатин, оментин, хемерин, васпин, иризин и миостатин. Лечението с тестостерон доведе до статистически значимо подобрене в телесния състав, общото благосъстояние и сексуалната функция и не бе свързано със значими странични ефекти. По отношение на изследваните органокини, лечението бе свързано със статистически значимо повишение в циркулиращите нива на серумния иризин и миостатин и редукция на серумния резистин, след корекции за потенциални интерфериращи фактори. Сред значимите корелации, които установихме са позитивната корелация на серумния хемерин с ИТМ и с обиколката на талията и серумния лептин; негативната корелация на серумния иризин с чернодобрните ензими, пикочната киселина и серумния резистин и позитивната корелация на същия със серумния тестостерон, серумния лептин, ежедневната физическа активност и свободната от масти маса, измерена с импеданс. Необходими са

допълнителни, проучвания, за да разяснят потенциалните физиологични механизми, подлежащи на наблюдаваните асоциации.

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

### **Договор 106/2018 Назофарингеален микробиом при деца с хронични белодробни заболявания**

**Изследователски екип:** Гл.ас. Ирен Стоянова Цочева, дм

- Доц. Гергана Стоянова
- Д-р Снежана Парина
- Проф. Пенка Переновска, дм
- Доц. Райна Гергова, дм
- Снежина Лазова, дм - УМБАЛСМ „Пирогов“

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

**РЕЗУЛТАТИ:** За постигане целите на проекта за период от 6 месеца (април-септември 2018 г.) включихме изследвахме 144 деца, разделени в 4 групи: 42 деца с бронхиална астма (БА), 34 деца с хронична влажна кашлица (ХВК) и липса на подлежащо заболяване, 38 с остър бронхиолит или бронхит (ОБ) и 20 здрави деца (ЗК) като контрола. От всяко дете бяха взети кръв за серология, както и назофарингеален и дълбок гърлен секрет за откриване на специфичен патоген (културелно изследване, PCR, ELISA). В групата на здрави деца не открихме патогени в гърлен секрет, а в 20% от назалните проби бе изолиран *Staphylococcus aureus*. При 33% от пациентите от групата на ОБ се откриват само вируси (RSV, hRV и hMPV), при 25% е налице комбинирана инфекция от вируси и бактерии (главно *Moraxella catarrhalis* и *Streptococcus pneumoniae*). В групата на БА при 25% открихме само вируси (аденовирус, hRV и RSV). В 56% от случаите *Streptococcus pneumoniae* се изолира от гърлен секрет срещу само 33% при изолирани *Moraxella catarrhalis*. Само в 10% от групата на ХВК открихме вирусна инфекция (hMPV, аденовирус и RV), 50% имаха *Streptococcus pneumoniae*, а останалите 40% - полимикробна етиология, включително *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*. Една пета от здрави деца са носители на *Staphylococcus aureus*, което не налага антибиотично лечение. При имунокомпетентни деца най-честите инфекциозни тригери на кашлицата извън зимния сезон са *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, hRV, RSV и аденовируси, което трябва да се отчита при терапията и може да се изчака с антибиотика. При ХВК трябва да се проведе задължително поне двуседмично антибиотично лечение в адекватни дози.

**Научни публикации и прояви:**

- Петрова Г, Митева Д, Папочиева В, и др. Хронична влажна кашлица в детска възраст. GPNews, 2018;10:7-10
- Цочева И, Лазова С, Переновска П, и др. Роля на белодробния микробиом за респираторното здраве. GPNews, 2018;10:39-42
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Infectious Pathogens That Could Trigger Cough in Children outside Winter Epidemic Season. Annals of Microbiology and Infectious Diseases 2019;2(1):52-57.



- Георгиева Б, Гергова Р, Циту В-М, и др. Инфекциозни патогени, които могат да предизвикат кашлица при деца извън сезона на зимните епидемии, сп. Наука пулмология 2019;1(50):12-17
- Георгиева Б, Гергова Р, Переновска П, и др. Протрахиран бактериален бронхит в детска възраст, сп. Практическа педиатрия 2019 (под печат)
- Георгиева Б, Гергова Р, Циту В-М, и др. Инфекции и хронична влажна кашлица при деца - постер представен на 20-та Юбилейна Национална Конференция за ОПЛ и педиатри, Сл. бряг – 23-26 май 2019-та
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Bacteria and viruses that trigger cough in children outside epidemic seasons постер представен на 18<sup>TH</sup> International Congress on Pediatric Pulmonology – 27-30 June 2019; Chiba- Tokyo, Japan
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Chronic and acute infectious triggers in immunocompetent children - постер представен на 37<sup>TH</sup> Annual Meeting Of The European Society For Paediatric Infectious Diseases – 6-11 May 2019; Ljubliana, Slovenia

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

**Договор 107/2018 Динамичната картина на респираторните пневмококови инфекции при деца след въвеждане на рутинна пневмококова ваксинация в България**

**Изследователски екип:** Доц. Гергана Петрова Стоянова, дм

- Д-р Снежана Парина
- Проф. Пенка Переновска, дм
- Проф. Лена Сечанова, дмн
- Д-р Светомира Бижева
- Д-р Юлия Мартева-Проевска
- Доц. Цветан Велинов, дм
- Ирен Цочева, дм - УМБАЛСМ „Пирогов“
- Снежина Лазова, дм - УМБАЛСМ „Пирогов“

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

**РЕЗУЛТАТИ:** За период от три години (декември 2015 г. - ноември 2018 г.) бяха анализирани анамнестични, клинични и лабораторни данни на 285 имунокомпетентни деца, хоспитализирани в клиниката по повод на рентгенологично потвърдена пневмония. Специално внимание бе обърнато на предварителна антибиотична употреба и имунизационен статус. От лабораторните показатели са проследени - CRP, пълна кръвна картина, микробиологично изследване на храчка, PCR и серология за респираторни вируси, хламидия и микоплазма. В 44.9 % от случаите не беше доказан етиологичен агент. В 41,6% бяха потвърдени бактериални причинители, а в 16,2% - вируси (в 4,6% бе доказана смесена инфекция от бактерии и вируси). По отношение на предварителната антибиотична употреба, значими разлики установихме само по отношение на изолирането на *Streptococcus pneumoniae* ( $p = 0,015$ ), но никаква друга зависимост с другите етиологични причинители не бе открита ( $p = 0,36$ ). Очаквано *Mycoplasma pneumoniae* бе изолирана при по-големи деца и главно през лятото и есента, докато *Streptococcus pneumoniae* бе предимно изолиран при по-малките деца, без определен сезонен пик.

Средната възраст за деца с бактериална пневмония е 6,54 години, за тези с вирусна пневмония - 4,34 години а за за комбинирани (вирусни + бактериални) 3,08 години ( $p = 0,000$ ). Почти 2/3 от децата са имунизирани с пневмококова ваксина (66 %). Имунизирани пациенти са с по-голям брой вирусни и по-нисък брой бактериални изолати 25.7 % и 37.23 % срещу неимунизирани такива - 4.12 % и 48.45 % респективно ( $p = 0,002$ ). Не се установи разлика в изолирането на *Streptococcus pneumoniae* спрямо ваксинационния статус, но е наличен голям спад на *Mycoplasma pneumoniae* изолати при ваксинираните такива (6.9 % срещу 32.98 %,  $p = 0,000$ ). В бъдеще може да очакват повече случаи с вирусна пневмония с увеличаване на ваксинационното покритие и може би трябва да се направи преоценка на ръководствата за лечение на придобитата в обществото пневмония при децата.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Петрова Г, Цочева И, Лазова Сн, и др. Пневмококите и инфекциите на дихателните пътища. сп. Наука пулмология 2018, бр 3 (48); 21-28
- Petrova G, Miteva D, Parina S, et al. Etiological profile of community acquired pneumonia in hospitalized children in Bulgaria in the era of the pneumococcal vaccine. Lung Breath J, 2019, Vol. 3(1): 1-5
- Петрова Г, Митева Д, Переновска П, и др. Етиологичен профил на пневмония, придобита в обществото, при хоспитализирани деца в България в ерата на пневмококовата ваксина. сп. Наука пулмология 2019, бр 1 (50); 4-10
- Георгиева Б, Гергова Р, Циту В-М, и др. Инфекциозни патогени, които могат да предизвикат кашлица при деца извън сезона на зимните епидемии. сп. Наука пулмология 2019, бр 1 (50); 12-17
- Петрова Г, Переновска П, Митева Д, и др. Етиологичен профил на пневмонията придобита в обществото при хоспитализирани деца. сп. Практическа педиатрия 2019
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Infectious Pathogens That Could Trigger Cough in Children outside Winter Epidemic Season. Annals of Microbiology and Infectious Diseases 2019, vol 2(1): 52-57.
- Митева Д, Переновска П, Еленчева Е, и др. Ефект на предходна антибиотична употреба върху етиологичен профил на пневмония придобита в обществото при хоспитализирани деца – постер представен на 20-та Юбилейна Национална Конференция за ОПЛ и педиатри, Сл. бряг – 23-26 май 2019-та
- Petrova G, Parina S, Miteva D, et al. Etiological profile of pneumonia in hospitalized children – effect of the pneumococcal vaccine постер представен на 18<sup>TH</sup> International Congress on Pediatric Pulmonology – 27-30 June 2019; Chiba- Tokyo, Japan
- Petrova G, Miteva D, Parina S, et al. Seasonal variations of etiology of pneumonia in hospitalized children in Bulgaria, 37<sup>th</sup> Annual Meeting Of The European Society For Paediatric Infectious Diseases – 6-11 May 2019; Ljubliana, Slovenia

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

**Договор 108/2018** Хормонален статус и нарушение в костния метаболизъм при пациенти с обструктивна сънна апнея и метаболитен синдром и ефект от лечението с неинвазивна вентилация

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

- Проф. Огнян Георгиев, дм
- Ас Даниела Милетиева
- Гл. ас Аделина Цакова
- Ас Радослав Билюков, дм
- Ас Цанко Мондешки
- Доц Венцислава Пенчева-Генова, дм
- Ас Севда Найденска-Грудкова
- Ас Петко Шошков
- Мартин Николов, докторант – СУ “Св.Климент Охридски“-София

**Базова организация:** Катедра по пропедевтика на вътрешни болести, бул. Г Софийски 1, 1431 София

**РЕЗУЛТАТИ:** Синдромът на обструктивна сънна апнея (СОСА) се характеризира с нарушен циркаден ритъм на различни хормони. За влиянието върху костната обмяна резултатите са противоречиви. Лечението с СРАР повлиява хормоналния и костен метаболизъм. Цел на проучване е да се оцени костния метаболизъм при пациенти с новодиагностицирана сънна апнея и да се проследят костните маркери след започване лечение с СРАР между 6 и 12 месец. Включени 100 пациенти с новодиагностицирана сънна апнея (82 мъже и 18 жени) и 22 здрави контроли (8 мъже и 14 жени). Пациентите са проследени между 6-ти и 12-ти месец след начало на лечението. Осъществени са антропометрични, кръвни изследвания, полисомнографски запис, количествена оценка на дневната сънливост с ESS. Остеоденситометрия е осъществена при 41 пациенти с ОСА и при 10 пациента от контролната група, определен е фрактурен риск по програмата FRAX, базираща се на клиничните рискови фактори за остеопороза. Изследвани са пациенти с умерена и тежка степен на ОСА. Те има значително по-високи резултати на ИТМ, висцерална мастна тъкан и обиколката на шията. Резултатите от ESS показват статистически значимо различие между ОСА и контролната група. Пациентите със СОСА са с тежък дефицит на витамин Д и подтиснато костно формиране, това е причина за повишен фрактурен риск. Тежката степен на ОСА се асоциира с по-голяма продължителност на сатурация под 90% и тежък дефицит на витамин Д. Лечението с СРАР благоприятно повлиява костното ремоделиране с доминиране на костното формиране. Ниските нива на 25(ОН) Д се асоциират с по-голяма продължителност на сатурация под 90%. СОСА е рисков фактор за вторична остеопороза и повишен фрактурен риск при двата пола. По тежко се засягат тръбестите кости. Препоръчително е при СОСА скрининг за остеопороза. Данните са сравними с изнесените данни в международен мащаб. Резултатите потвърждават връзката между нивата на витамин Д, тежестта на сънна апнея и лечението с СРАР.

**Научни публикации и прояви:**

- Красимирова Д, Билюков Р, Николов М, и др. Нарушение на костния метаболизъм при пациенти с Обструктивна сънна апнея и метаболитен синдром. Торакална медицина 2018;10(3):32-49
- Красимирова Д, Билюков Р, Николов М, и др. Нарушение на костния метаболизъм при пациенти с Обструктивна сънна апнея и метаболитен синдром. Торакална медицина 2018;10(4):22-33

- Красимирова Д, Петрова Д, Георгиев О, и др. Параметри на костния метаболизъм при пациенти със Синдром на обструктивна сънна апнея и ефект от едногодишно лечение с неинвазивна вентилация Торакална медицина 2019;11(2)

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

**Договор 110/2018 Радиационни поражения на гастроинтестиналния тракт след лъчелечение-оценка на тежестта на заболяването и дефиниране на терапевтичен подход**

**Изследователски екип:** Проф. Борислав Георгиев Владимиров, дм

- Проф. Лилия Гочева-Петкова, дмн
- Доц. Васка Василева-Кодейх, дм
- Доц. Пламен Пенчев, дм
- Станислава Керемидчиева-Христова
- Радислав Наков, дм
- Надя Накова
- Пламен Гецов, дм
- Мирослав Новоселски
- Стефани Чакърва
- Спаска Ковачева

**Базова организация:** Катедра по Гастроентерология, Катедра по Нуклеарна медицина, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Настоящото проучване включи 25 пациенти с остри и хронични лъчеви поражения на ГИТ– 10 мъже, 15 жени, на средна възраст 65.60г (44-84), насочени за видеоколоноскопия към Клиниката по гастроентерология в УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ между май 2018 и октомври 2019 г. и 50 здрави контроли (средна възраст 40.45г). При всички бе извършена илеоколоноскопия, оценена клинична активност по RTOG/EORTC скалата, направени са пълни лабораторни изследвания и е изследван фекален калпротектин (ФКП) чрез бърз количествен имунохроматографски метод (Quantum Blue® Calprotectin). При ROC анализ гранична стойност от 85 микрогр/гр разграничи пациенти след ЛЛ от здравите контроли с 61% чувствителност и 100% специфичност при зона под кривата (AUC 0.745, 95% CI, 0.579-0.912). Имаше статистически значима разлика между стойностите на ФКП на контролите и пациентите след проведено лъчелечение (Mann-Whitney non-parametric test, U=167, Z=-2.948, p=0.003). Не се установи корелация между ФКП и СУЕ, ФКП и WBS(ФКП и СУЕ – няма сигнификантна корелация (p=0.298); ФКП и WBS – няма корелация (p=0.497) ). Не се откриха корелации между степента на изява на клиничната симптоматика оценена по RTOG/EORTC и ФКП( ФКП и EORTC - няма корелация (p=0.921)

**Научни публикации и прояви:**

- Керемидчиева-Христова С, Пенчев П, Владимиров Б. Радиационен колит и проктит-участие на IV Национален конгрес за Млади гастроентеролози, гр. София, Умбал „Царица Йоанн-ИСУЛ“, МУ-София, 23-24.03. 2018
- Керемидчиева С, Пенчев П, Наков Р, и др. Фекален калпротектин- неинвазивен метод за оценка на пациентите с радиационни поражения на долен ГИТ- участие на

V Национален конгрес за Млади гастроентеролози, гр. София, Умбал „Царица Йоанн-ИСУЛ“, МУ-София, 29-31.03.2019

- Керемидчиева С, Пенчев П, Наков Р, и др. Радиационен колит и проктит- клиничен случай- постер, Първа европейска конференция на младите гастроентеролози, гр. Загреб, Хърватия, 6-9.12.2018

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

**Договор 111/2018** Количествено определяне на исхемично-модифициран албумин в серум и проучване значението му като диагностичен и прогностичен биомаркер при пациенти с транзиторна исхемична атака (ТИА) и хеморагичен/исхемичен мозъчен инсулт

**Изследователски екип:** Проф. Евгения Василева Русчева, дмн

- Наира Мурадян
- Марина Кръстева

**Базова организация:** Катедра по неврология, ул. „Бяло море“ 8, София, 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** целта на проекта е да се изследва диагностичното значение на исхемично модифицирания албумин /ИМА/ при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт /ИМИ/, като се проучи връзката между ИМА и неврологичния дефицит и се проследи неговата динамика. Изследвани са 67 пациента (33 мъже и 34 жени) с остър ИМИ (ср. възраст  $71.7 \pm 12.7$ ), последователно включени от 1 август 2018 до 17 февруари 2019. Снета е анамнеза, неврологичен статус, оценка на неврологичния дефицит по NIHSS. Проведена е КТ с оценка посредством ASPECT. Осъществена цветно кодирана дуплекс сонография, ЕКГ, ехокардиография, холтер мониториране. В първите 12 часа е изследвано серумното ниво на ИМА. При 43 болни е проведено повторно изследване на ИМА – след 72 часа. Кръвните проби са замразени при температура  $-80^{\circ}\text{C}$ . Определянето на ИМА е извършено с ELISA. Резултатите показват връзка между тежестта на неврологичния дефицит, измерена с NIHSS скалата и стойността на ИМА, измерена в първите 12 часа след възникване на ИМИ (Spearman 0,466) ( $p < 0.001$ ). Налице е сигнификантна разлика между двете групи пациенти с лек (NIHSS  $< 3$ ) ( $n=30$ ) и с тежък (NIHSS  $> 3$ ) ИМИ ( $n=41$ ), по отношение на стойностите на ИМА, измерени до 12-я час ( 2.27 (IQR 0.5-134.3), (IQR 3.7-719.2),  $p=0.004$ ). Установява се динамика в нивото на ИМА в острата фаза. Доказа се значима промяна между 12-ия час и 72-ия час в посока намаление ( $p=0,017$ ). Серумното ниво на ИМА при пациентите на 12-я час е с медиана 3,9 и интерквартилен размах 0,8-291,0, а на 72-я час - медиана 2,3 и интерквартилен размах 0,8-78,0. Мозъчната исхемия предзвиква увеличение на ИМА в острата фаза на ИМИ, като неговото ниво е в зависимост от обема на мозъчния инфаркт. ИМА намалява с увеличаване на времевия интервал, което потвърждава значението на първоначалния оксидативен стрес и тъканна исхемизация. ИМА може да бъде включен в биомаркерни панели, чието приложение да диференцира инсулт-имитиращите състояния.

**Научни публикации и прояви:**

- Кръстева М, Мурадян Н, Насева Е, и др. Динамика на исхемично модифицирания албумин във фазата на остра мозъчна исхемия. Българска неврология. 2019;3 (20)

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

## **Договор 112/2018    **Качество на живот, обезитет и метаболитен синдром в контекста на хроничното субклинично възпаление****

**Изследователски екип:** Доц. Атанаска Петрова Еленкова

- Гл. ас. Ралица Робева, дм
- Бойка Милчева, дм
- Илияна Борисова, дм
- Семра Мустафа

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Основна цел на проучването беше да се оцени ролята на хроничното субклинично възпаление за влошаване на метаболитните показатели и качеството на живот при пациенти със затлъстяване. Качеството на живот, свързано със здравето (HRQoL) беше определено при 30 здрави жени с нормално тегло и 110 пациентки с наднормено тегло или затлъстяване чрез въпросника SF36. Сред обезната група 35 от жените бяха метаболитно здрави, докато при останалите 75 жени се установи метаболитен синдром. При пациентките бяха изследвани антропометрични и подробни биохимични показатели, както и маркери за възпаление (С-реактивен протеин, интерлевкин-1 $\alpha$ , интерлевкин-1 $\beta$ , интерлевкин-6, интерлевкин-10 и интерлевкин-17А и интерлевкин-17F). Метаболитно здравите пациентки показаха по-лошо качество на живот от здравите жени по отношение физическия компонент за качество на живот ( $p < 0.001$ ), но по-добри показатели при сравнение с жените с МС ( $p = 0.022$ ). Не се установиха различия в концентрацията на проинфламаторните цитокини интерлевкин-1 $\alpha$ , интерлевкин-1 $\beta$  и интерлевкин-6 между метаболитно здравите затлъстели жени и тези с разгърнат метаболитен синдром ( $p > 0.05$  за всички), докато обратно анти-инфламаторният интерлевкин-10 беше със значимо по-ниски стойности при пациентките с МС в сравнение с метаболитно здравите жени ( $p = 0.035$ ). Нивата на интерлевкин-17F, но не и на интерлевкин-17А, бяха със значително по-високи стойности при пациентките със захарен диабет тип 2. Нивата на интерлевкин-1 $\alpha$  бяха обратно пропорционални на субективната оценка за физическо функциониране ( $r = -0.417$ ,  $p = 0.003$ ) при пациентките с метаболитен синдром. Проучването показва, че развитието на метаболитен синдром влошава допълнително усещането за физическо благосъстояние при пациентките със затлъстяване. Потвърди се важната протективна роля на антиинфламаторния интерлевкин-10 за развитието на МС. Установи се, че нивата на интерлевкин-1 $\alpha$  може да повлияят субективната оценка за качество на живот при пациентки с метаболитни нарушения. Бъдещи проучвания ще покажат, дали медикаментите, насочени към модуляция на тези интерлевкини може да подобрят метаболитното здраве и качеството на живот при жени със затлъстяване.

### **Научни публикации и прояви:**

- Робева Р, Милчева Б, Еленкова А, и др. Метаболитен синдром и качество на живот – факти и загадки. Ендокринология. 2018; 23, 4, 179-186.

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

## **Договор 113/2018    Оценка на връзката между островноклетъчните, тиреоидните и трансклутаминазните антитела при захарен диабет тип 1**

**Изследователски екип:** Проф. Цветалина Иванова Танкова, дмн

- Доц. Илияна Борисова, дм
- Гл. ас Грета Грозева-Дамянова, дм
- Гл. ас Невена Чакърлова, дм
- Гл. ас Румяна Димова-Драганова, дм
- Ани Годорова, докторант
- Мина Сердарова, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на изследването е да се установи честотата и диагностичната стойност на антитяло към ZnT8 при възрастни пациенти със захарен диабет тип 1 (ЗД тип 1) с малка давност, както и да се направи разширена оценка на аутоимунитета при тази популация като се определи честотата на носителство на антитела за най-честите съпътстващи аутоимунни заболявания – аутоимунно тиреоидно заболяване (АИТЗ) и целиакия, и се изследва връзката им с островноклетъчните антитела. Анализирани са 160 пациенти със ЗД тип 1, на средна възраст  $36.3 \pm 10.9$  години, среден ИТМ  $23.0 \pm 4.2$   $\text{kg/m}^2$  и средна давност на заболяването  $1.35 \pm 1.69$  години. Изследвани са островноклетъчни антитела - антитела към декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD 65-Ab), антитела към тирозин фосфатаза (IA 2-Ab) и антитела към цинков транспортер 8 (ZnT8-Ab), трансклутаминазни антитела (TTG-IgA-Ab) и тиреоидни антитела – антитела към тиреопероксидаза (TPO-Ab) и антитела към тиреоглобулин (TAT-Ab) с метод ELISA. При 87.5% от изследваните се установява наличие на едно или повече от островноклетъчните антитела. 78.1% имат положителни GAD 65-Ab, 53,1% - ZnT8-Ab и 34.4% - IA 2-Ab. 5% от изследваните са монопозитивни към ZnT8. GAD 65-Ab диагностицира 90.6% от антитялопозитивните пациенти със ЗД тип 1. Добавянето на IA 2-Ab като втори имунологичен маркер идентифицира 94.4% , а използването на ZnT8-Ab като втори маркер идентифицира 98.8 % от случаите. При 34.9% от изследваните лица се установяват тиреоидни антитела, а 36.3% имат АИТЗ. Не се установява значима връзка между позитивността за отделно островноклетъчно антитяло и наличието на АИТЗ. Не се установяват пациенти с позитивни TTG-IgA-Ab. Липсва корелация между изследваните типове антитела – островноклетъчни, тиреоидни и трансклутаминазни. При възрастни пациенти със ЗД тип 1 антителата към ZnT8 са важен и независим диагностичен маркер, заемащ второ място по честота и диагностична значимост след GAD 65-Ab. АИТЗ засяга около 1/3 от тази популация, което налага рутинен скрининг, докато скринингът за целиакия не е оправдан.

### **Научни публикации и прояви:**

- Chakarova N, Dimova R, Serdarova M, et al. Islet, thyroid and transglutaminase antibodies in adult Bulgarian patients with type 1 diabetes. Endocrine 2020;70(2):299-306.
- Чакърлова Н, Димова Р, Сердарова М, и др. Аутоимунно тиреоидно заболяване при възрастна популация пациенти със захарен диабет тип 1 – данни на един специализиран център. III-и Специализиран Научен Симпозиум „Редки заболявания на щитовидната жлеза и калциево-фосфорната обмяна”, 19-20 Юни 2020, София

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

**Договор 114/2018    Антивирусен имунен отговор при деца с вирус-индуцирани  
bronхообструктивни прояви**

**Изследователски екип:** Гл. ас. Екатерина Иванова Иванова-Тодорова, дм

- Ас. Сирма Димитрова, дм
- Д-р Милена Иванова-Кръстанова
- Калина Тумангелова-Юзеир

**Базова организация:** Катедра по клинична имунология, бул. Акад. Ив. Гешов 15, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Бронхиолитът е най-честа причина за хоспитализация в кърмаческа възраст и респираторният синцитиален вирус (RSV) е свързан с повечето от тези случаи. IFN- $\gamma$  е есенциален цитокин на вирус- индуцираният имунния отговор, а като представител на Th2- цитокините се използва периостинът. Настоящото проучване оценява нивото на антивирусния имунен отговор чрез изследване на IFN- $\gamma$  и периостин в назофарингеален аспират и серум при деца с вирус- индуцирани бронхообструктивни прояви. В това проучване са включени 66 деца (40 момчета и 29 момичета) на възраст от 2 до 23 месеца (средно 11,4 месеца), хоспитализирани в Клиника по Педиатрия, УМБАЛ Александровска, МУ София, с първи или повтарящ се епизод на бронхиална обструкция. Бяха снети подробна анамнеза, физически преглед, кръвна проба и назофарингеален аспират (NPA). Вирусната етиология на инфекциите на дихателните пътища се определя с помощта на полимеразна верижна реакция (PCR). Серумната и назофарингеалната (NPA) концентрация на IFN- $\gamma$  и периостин се оценява чрез ELISA метод. Средните нива на IFN- $\gamma$  в серума бяха 14.28 (0-100.3) pg / ml и 11.02 (0-124.14) pg / ml в NPA. Продукцията на IFN- $\gamma$  е в по-ниски стойности при момчета, деца с atopичен статус и фамилна анамнеза за астма, и рецидивирани бронхообструктивни прояви. Средните нива на серумния периостин са 1295.24 (0-1915.48) ng / ml и 5.58 (0-124.14) ng / ml в NPA. Няма статистически значима зависимост от възрастта, пола и atopичния статус. Отчетохме корелация между нивото на серумния периостин с тежестта на клиничните прояви и рецидивирания епизоди на бронхиална обструкция. Нашето проучване доказва, че инфекцията с RSV е свързана с понижена продукция на IFN- $\gamma$  и повишени нива на периостин, като основен изход за нас е корелацията с тежестта и поредността на пристъпа.

**Научни публикации и прояви:**

- Милева С, Янкова М, Тодорова Е, и др. Имунен отговор при деца с бронхолит. XX-та Юбилейна Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие. Постер. 23-26 май 2019г., Слънчев бряг.
- Mileva S, Petrova G, Ivanova-Todorova E, et al. The Interferon-gamma level in nasopharyngeal secretions of infants with bronchiolitis. Poster. CIPP XVIII, June 27-30, Tokyo.

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



**Договор 57/2019      Валидиране на имунологичен метод за определяне на еритроферон в серум и определяне на референтните граници на показателя за Българската популация**

**Изследователски екип:** Проф. Огнян Борисов Георгиев, дм

- Гл. ас Виктор Манолов, дм
- Доц. Венцислава Пенчева-Генова, дм
- Проф. Юлия Петрова, дмн
- Проф. Камен Цачев, дмн
- Доц. Евгений Хаджиев, дмн
- Тодор Кунчев; докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на това проучване е да се валидира имуохимичен метод за количествено определяне на еритроферон в серум и определяне на референтните граници на показателя за Българската популация. За определяне на еритроферон се използва ELISA метод на сандвичев принцип. Микроплаката е натоварена с антитела специфични за човешки еритроферон. Оцветяването на реакционната смес се отчита фотометрично на 450 nm. Процесът на валидиране на ELISA метод за количествено определяне на серумен еритроферон включва следните етапи: А) При валидиране на метода за определяне на еритроферон бе построена калибрационна крива от 8 стандарта с двукратно на капване (рекомбинантен човешки еритроферон с обявена стойност 20 ng/ml (1 ml); от този стандарт бе направено падащо разреждане със стандарт дилуент според инструкциите на производителя с цел постигане на област на клинично значими стойности – 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.312 ng/ml, 0.156 ng/ml). Бланката бе отчетена десетократно - за определяне на ниска граница на откриваемост (Limit of Detection), а именно 0.056 ng/ml, което осигури на метода много висока диагностична чувствителност. Всеки един от стандартите е определен двукратно. Стойностите са коригирани с двукратно определената сляпа проба за реактиви (стандарт дилуент). Построи се калибрационна крива, която е четири параметрична; по оста X – логаритмична, по оста Y – линейна. Б) Стандарти от 0.156 ng/ml, 1.25 ng/ml, 10 ng/ml бяха на капани десетократно за определяне на ниско ниво на количествено определяне (low level of quantification; LLQ), средни ниво на количествено определяне (middle level of quantification; MLQ) и високо ниво на количествено определяне (high level of quantification; HLQ). Проби на здрави доброволци бяха на капани двукратно. Установиха се следните CV% - за LLQ 6.145%, за MLQ 5.057%, за HLQ 2.979%. Установиха се следните bias% - за LLQ 8.754%, за MLQ 3.47%, за HLQ 0.77%. В) Достоверността на метода бе определена с помощта на метода recovery (добавено/намерено). Доказа се област на recovery от 96.7% до 97.9%. Г) Повтаряемостта (repeatability) в серия бе определена с помощта на петкратно отчитане на случайно подбрани проби на три пациента с известно ниво на еритроферон. Получиха се CV% от 1.91% до 4.17%. Невъзпроизводимостта от ден в ден е определена чрез 5кратно отчитане на случайно подбрани проби на три пациента с известно ниво на еритроферон,

предварително разпределени в пет епруветки тип „Епендорф”. Всяка проба бе замразена на минус 40 °С. При всяка серия от проби на пациенти бе размразявана и анализирана по една епруветка тип „Епендорф” с избраният серум. Получиха се CV% от 1.98% до 3.74%. При оценката на аналитичната надеждност на ELISA метода се установи: широк обхват на количествено определяне; ниска долна граница на откриваемост; много висока диагностична чувствителност; ниска аналитична вариация. За определяне границите на референтната област на изследвания показател еритроферон в кръвен серум са изследвани 200 клинично здрави лица от българска националност на възраст от 18 до 79 год., средна възраст 32.4 год., от които 90 мъже и 110 жени. Групата е съставена от здрави индивиди с различни професии – медицински персонал, работници, студенти, служители. Бяха използвани редица критерии за включване на доброволците в проучването. Използвахме програмата REFVAL за статистическа обработка на събраните данни и определяне границите на референтната област, съобразно препоръките на IFCC/CLSI документ C28-A3 от март 2008 г. Параметричната оценка на полученият референтен интервал за еритроферон за общата група клинично здрави мъже и жени; n=200\* - 95% референтен интервал показва стойности от 6.3 ng/ml до 15.7 ng/ml. Установи се Гаусово разпределение на получените данни за серумен еритроферон при контролна група клинично здрави лица от българската популация.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Validation of ELISA erythroferrone serum quantification method. 27<sup>th</sup> Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Congress and 30<sup>th</sup> National Biochemistry Congress (NBC) of TBS. 27.10.-31.10.2019, Antalya, Turkey

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

#### **Договор 65/2019 Приложение на молекулярно-генетични техники в диагностичния алгоритъм при негонококов уретрит**

**Изследователски екип:** Доц. Весела Васкова Райкова, дмн

- Ас. Радослав Байкушев

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящия проект е изследването на пациенти с уретрит, приложението на генетични техники, съпоставянето им с рутинните и залагането им в диагностичния алгоритъм на заболяването. 78 сексуално активни мъже с уретрит и 20 мъже контролна група бяха тествани. Използвани проби: урина/уретрален секрет, използван за - изготвяне на натривка върху стъкло и оцветяване по Грам; култивиране върху среди; ДНК екстракция и PCR. При 33-ма бяха регистрирани инфекции чрез различни тестове. *N. gonorrhoeae* бе открит чрез оцветяване по Грам в 5 проби; чрез култивиране върху Thayer Martin среда в 6 тампона; чрез PCR в 8 намазки. Положителните резултати от *S. trachomatis* бяха получени след култивиране върху McCoусреда и имуофресценция с анти-липополизахаридно моноклонално антитяло в 13 проби; чрез PCR положителните резултати бяха 14. *U. urealyticum* бе намерен в 7 проби чрез култивирането и полуколичественото измерване с Mycofast Revolution Kit; в 9 тампона чрез PCR. *M. genitalium* бе открит в 3 чрез PCR. *M. hominis* е отрицателен при всички тествани секрети. *T. vaginalis* бяха доказани в 1 секрет от урина чрез култивиране в среда TV4; и 2 положителни проби, тествани чрез PCR. HSV-2 бе открит в секрета на един мъж с

оплаквания чрез PCR. Съвместни инфекции с два микроорганизма бяха засечени в 5 проби, като комбинациите бяха следните: *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* в 1 проба; *C. trachomatis* и *M. genitalium* в 1 проба; *C. trachomatis* и *Ureaplasma spp.* в 2 проби; *T. vaginalis* и *C. trachomatis* в 1 проба. Всички проби с положителни резултати показват при оцветяването по Грам увеличени левкоцити в натривката. От контролната група двама дадоха положителна проба по един за *C. trachomatis* и за *U. urealyticum* чрез PCR.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Raykova V. Detection of common bacterial causes of urethritis in symptomatic men attending STD laboratory of MU-Sofia by microscopy, culture and NAAT. Scripta Scientifica Medica 2019;51(4):13-8.

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

#### **Договор 72/2019      Ендогодишно пилотно проучване за честотата на установяване на EGFR мутационен статус от бронхоалвеоларен лаваж при пациенти с първичен белодробен аденокарцином сравнена с течна биопсия от периферна венозна кръв и тъканна биопсия**

**Изследователски екип:** Проф. Димитър Темелков Костадинов, дм

- Гл. ас. Николай Янев, дм
- Динко Вълев, дм
- Стоян Бичев
- Силвия Иванова
- Гл. ас. Евгени Меков, дм
- Гл. ас. Дора Маринова, дм
- Ас. Мирослав Михайлов
- Ас. Наталия Габровска, дм
- Ас. Ива Попова
- Гл. ас. Владимир Миланов, дм
- Ас. Деница Димитрова, дм

**Базова организация:** Катедра по белодробни болести, бул. Акад. Ив. Гешов 19, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване е да се сравни честотата на установяване на EGFR мутационен статус на бронхоалвеоларен лаваж и периферна кръв в сравнение със “златния стандарт” – тъканна биопсия, при пациенти с първичен белодробен аденокарцином. Включени в проучването са пациентите, на които е проведена бронхоскопия, за периода между Октомври 2018 и Август 2019. Изключващите критерии не се различават от тези при стандарта за бронхоскопия. Използвани са следните биопсични техники – щипкова и трансbronхиална биопсия, ЕБУЗ и БАЛ. За периода на проучването са извършени 140 бронхоскопии. При 112 пациента (80%) се постигна туморна верификация. Аденокарцином се установи при 23.2% (26/112) от пациентите с белодробен рак. При тринадесет от тях се установи мутация на EGFR, при останалите див тип EGFR. От периферна кръв мутационния статус се установи при 38.5% (5/13) от тях, докато от БАЛ се идентифицира при 92.3% (12/13). В един от случаите и при двете течни биопсия (БАЛ и плазма) се засече допълнителна мутация T790M, която не се установява в съответния тъканен материал. Настоящият стандарт за установяване на мутация при

пациенти с неизяснен статус след тъканна биопсия е ребиопсия или периферна кръв. Установяването на EGFR статуса от БАЛ е лесно изпълним и безопасен метод с обещаващи резултати, особено при увредени пациенти. Настоящото проучване, показва преимуществото на БАЛ пред периферна кръв при установяване на EGFR мутационен статус. Този минимално инвазивен метод подобрява диагностичната успеваемост, при нисък риск за пациента, със резултати сравними с хистологичните проби.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Янев Н, Меков Е, Иванова С, и др. Диагностична успеваемост на стандартна флексибилна бронхоскопия при хистологична верификация на белодробни тумори, Торакална медицина, 2019;11(3-4):64-75
- Янев Н, Меков Е, Петков Р, и др. Бронхоалвеоларен лаваж като диагностична и терапевтична процедура, Торакална медицина, 2020;12(1):4-19
- Янев Н, Меков Е, Димитрова Д, и др. Чувствителност и специфичност на течна биопсия от бронхоалвеоларен лаваж и кръвна плазма при установяване на EGFR мутационен статус на пациенти с първичен белодробен аденокарцином, Торакална медицина, 2020;12(1):6.
- Yanev N, Mekov E, Vulev, et al. EGFR mutation status yield from bronchoalveolar lavage in patients with primary pulmonary adenocarcinoma compared to a venous blood sample and tissue biopsy, Peer J, 2020:08:52396:0:1
- Yanev N, Mekov E, Kostadinov D. Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for the diagnosis of paratracheal and peribronchial central parenchymal lesions, Folia Med (Plovdiv) 2020;60(4)
- Янев Н, Вълев Д, Костадинов Д. Установяване на EGFR мутационен статус от бронхоалвеоларен лаваж при пациенти с първичен белодробен аденокарцином, “Годишна онкологична среща на АстраЗенека”, Правец, 05-07 април 2019 г.
- Dimitrova I, Yanev N, Bichev S, et al., Comparison of EGFR mutation detection among FFPET, bronchoalveolar lavage (BAL) and blood samples in patients with non-small cell lung Cancer, ESHG 2020.2, Virtual Conference 06.06.2020
- Yanev N, Mekov E, Kostadinov D. Liquid biopsy in patients with adenocarcinoma - comparison between bronchoalveolar lavage (BAL) and blood samples, ERS 2020, Virtual Conference 09.09.2020
- Yanev N., Mekov E., Kostadinov D. Determine EGFR Mutation Status from Bronchoalveolar Lavage, Virtual-LC 2020, 24.09.20

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

#### **Договор 86/2019      Микроинвазивен и антимикробен ефект на средства за химио-механична екскавация при кариес на временни зъби**

**Изследователски екип:** Проф. Мая Рашева Рашкова, дм

- Доц. Райна Гергова, дм
- Гл. ас. Надежда Митова, дм
- Ас. Зорница Лазарова
- Ас. Вирна-Мария Циту
- Ас. Христина Танкова-Златева

**Базова организация:** Катедра по детска дентална медицина, ул. Св. Георги Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящия проект е да се направи проучване на избирателната и антимикробна активност на ензимно средство за контролирана екскавация в комбинация с фотодинамична терапия (ФДТ) с FotoSan при микроинвазивно лечение на кариес и затворен асимптоматичен пулпит на временни зъби. Обект на клинично изследване бяха 42 временни молари: 22 с диагноза затворен асимптоматичен пулпит и 20 с дълбок дентинов кариес. За микробиологично изследване бяха взети проби от дентин с различна степен на деструкция - инфектиран, частично-инфектиран, афектиран и здрав - (общо 128). Използвани бяха механична екскавация или химио-механична екскавация с Brix 3000, контролирани чрез флуоресценция с Proface и ФДТ с FotoSan. За ин-витро микробиологично проучване на антимикробия ефект на ФДТ бяха подготвени 40 петрита, разпределени по 10 в 4 групи: с Brix 3000; с ФДТ с FotoSan Into Kit 630; с комбинацията Brix 3000 + FotoSan; без активна съставка – контролна група. За експериментално микро-СТ сканиране (100 сканирания) и определяне степен на деструкция бяха използвани 50 екстрахирани временни молара с апроксимални кариозни лезии, групирани в 4 групи с различна степен на екскавация, с механична и ензимна екскавация. Резултатите показаха, че в кариозен дентин се наблюдава по-голямо разнообразие на микробни асоциации при затворен асимптоматичен пулпит в сравнение с дълбокия дентинов кариес. В частично инфектиран надпулпен дентин, се забелязва изчезване на повечето микроорганизми, като в 2/3 от случаите се запазва *Str. mutans*, в асоциации с още 1 или 2 микроорганизма. В клинични условия, беше доказан антимикробният ефект на ФДТ с FotoSan към остатъчните микроорганизми в частично инфектиран дентин. In vitro, беше доказан потенциран антимикробен ефект на комбинацията Brix 3000 и ФДТ с FotoSan срещу кариесогенни МО – *Str. mutans* и *Lactobacillus spp.* Степента на деструкция в центъра на кавитирана кариозна лезия при временни зъби се характеризира с четирикратно намаляване на минералната плътност в кариозния дентин в сравнение със здравия. Намалена минерална плътност се открива в надпулпния дентин, с клинична характеристика на здрав дентин. Контролираната ензимна екскавация с Brix 3000 води до по-малки обеми отнемане на кариозен дентин, поради своето самоограничаващо се биохимично действие в съчетание с антимикробен ефект, което се препоръчва при лечение на временни зъби.

**Научни публикации и прояви:**

- Lazarova Z. Controlled Excavation and Antimicrobial Activity in the Treatment of Dentine Caries in Primary Teeth. Problems of dental medicine, 2019;45(2):42-52.

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

**Договор 88/2019    Дезинфекция на ендодонтското пространство при зъби с незавършено кореново развитие**

**Изследователски екип:** Доц. Наталия Христова Грънчарова

- Доц. Павел Станимиров
- Доц. Райна Гергова
- Ас Красимир Христов

**Базова организация:** Катедра Детска дентална медицина, бул. Г Софийски 1, София, 1606

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящия проект е да проучи ефективността на иригационните разтвори и интраканалната медикация при деконтаминирането на ендодонтското пространство при зъби с незавършено кореново развитие. Корени на зъби с незавършено кореново развитие се заразяват с *E. faecalis* в *in vitro* условия. Подготвените образци се дезинфекцират с различни протоколи. Резултатите показват, че иригационният протокол, предложен от ААЕ, не осигурява по-добра дезинфекция на кореновия канал при зъби с незавършено кореново развитие в сравнение с пасивната ултразвукова активация. В най-ниска степен се редуцира броят на микроорганизмите в пробите, активирани с ултразвук, което се дължи на факта, че зъбите с незавършено кореново развитие имат широки и овални канали, а ефективността на пасивната ултразвукова иригация намалява пропорционално с диаметъра на канала. Минималното механично инструментирание с XR-endo Finisher и Gentlefile Brush при зъби с незавършено кореново развитие подобрява деинфекцията на кореновия канал. Използването на лимонена киселина в иригационния протокол подобрява неговата антибактериална ефективност при зъби с незавършено кореново развитие. Тройната антибиотична паста в концентрация под 100 µg/mL не притежава активност срещу *E. faecalis*.

**Научни публикации и прояви:**

- Hristov K, Gateva N. Effectiveness of different root canal irrigation protocols in treatment of immature permanent teeth. Medinform, 2019;6(2):1043-1052.

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

### **Договор 91/2019 Триизмерно принтирани шини за профилактика на бруксизъм – експериментално и клинично изследване**

**Изследователски екип:** Доц. Тодор Цонков Узунов, доктор

- Ас. Ива Танева
- Проф. Мариана Димова-Габровска, дн,
- Гл. ас. Николай Апостолов
- Деница Тонева, студент

**Базова организация:** Катедра Протетична дентална медицина, ул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Основна цел на проекта бе разработване и апробиране на нов, дигитален метод за изработване и приложение на оклузални шини за превенция на бруксизъм по технологията на триизмерното принтиране. В резултат е направена ясна формулировка на етапите. Методиката е с достатъчна повтаряемост, за да се прилага за профилактика на парафункцията в дългосрочен план, а технологията на триизмерно принтиране доказва своята висока ефективност и прецизност. Нововъведеният метод е доказана клинично приложим и разширява спектъра от профилактични мерки, които лекарят по дентална медицина може да предприеме за превенция на парафункцията бруксизъм. Установен бе конкретен режим на контролните прегледи. Изработена е анкетна карта за удовлетвореността на пациентите от профилактичните шини. Ясно са отдиференцирани предимствата и недостатъците на известните до момента похвати за изработка на оклузални шини за превенция на последствията от бруксизъм. Чрез изследване с

гнатодинамометричен модули са тествани и доказани задържането и стабилността на изработените в клиничната част шини, като показателите, сравнени с установените по същата методика стойности при естествено съзъбие, са значително по-високи. Обективно са сравнени разнородни по характер механични качества на обследваните четири вида материали, актуално и пълно представляващи възможните опции за избор при изработка на оклузални шини за профилактика на бруксизъм. Износоустойчивостта като механично свойство изяснява какви са перспективите в поведението на даден материал при дългосрочна приложимост. Изследването на повърхностният релеф чрез атомно-силова микроскопия, освен описаните резултати, дава насока за бъдещо обследване как може да се подобри повърхността на материалите, в частност представения течен фотополимер за триизмерно принтиране, от гледна точка на хигиена и поддръжка на шината. Започнато е изследване на промените, настъпващи в ставно-мускулния комплекс по време на периода на профилактика в различните интервали.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Taneva I, Uzunov T. Influence of post polymerization processing over the mechanical features of 3d printed occlusal splints. J. Phys.: Conf. Ser. 2020 1492 012018
- Taneva I, Grozdanova-Uzunova R, Uzunov T. Occlusal splints – changes in the muscular activity. J Phys: Conf. Ser 2021;1859(1):012046.
- Танева И, Узунов Т, Тонева Д. Триизмерно принтирани шини за профилактика на последствията от бруксизъм. 19-и Научен конгрес на БЗС. Бургас – Поморие, България. 6-8 юни 2019
- Taneva I, Uzunov T. Influence of post-polymerisation processing over the mechanical features of 3D-printed occlusal splints. Twenty-first International Summer School on Vacuum, Electron and Ion Technologies. Sozopol, Bulgaria. 23-27 September 2019
- Taneva I, Grozdanova-Uzunova R, Uzunov T. Occlusal splints – changes in the muscular activity. 21st International Conference and School on Quantum Electronics: “Laser Physics and Applications” – 21st ICSQE 21-24 Sep 2020.

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

#### **Договор 92/2019      Значимост между присъствие на генен полиморфизъм на IL- 17F и тежест на пародонтита**

**Изследователски екип:** Доц. Антоанета Митева Млъчкова, дм

- Проф. Христина Попова, дм
- Здравка Пашова-Тасева
- Мая Кичева

**Базова организация:** Катедра „Пародонтология, бул. Г Софийски 1, София, 1430

**РЕЗУЛТАТИ:** В настоящия проект участие взеха 40 пациенти с диагноза пародонти стадий II-IV и 10 здрави контролни субекта, служещи за контролна група. След анализиране на извършената диагностика (използвани клинични, параклинични и лабораторни методи, а за анализ на данните – статистически методи) се установи, че основната част от изследваните субекти по SNP на IL-17F на място rs\_763780 са с генотип ТТ (92% от изследваните лица) като останалите лица проявяват генотип СТ (8% от изследваните лица). Установиха се статистически значими разлики по отношение на параметрите на пародонтита, пол и пушене, не се установиха статистически значими разлики на

посочените параметри при пациенти с двата генотипа. Установиха се силни корелации между изследваните параметри, които потвърдиха данни от досега проведени проучвания. Установиха се, обаче, съществени тенденции при определени параметри при лицата, носители на двата генотипа: при носителите на генотип ТТ пародонталните места с дълбочина 5-7 мм са с близо 18% повече в сравнение с носителите на генотип СТ; при носителите на генотип ТТ най- дълбоките пародонтални места са с близо 8% повече от тези при носители на генотип СТ. при носителите на генотип СТ се наблюдава по висок процент на  $CAL \geq 5$  в сравнение с носителите на генотип ТТ; по показателя ВоР носителите на генотип ТТ показват до 100% кървене, в сравнение с носителите на генотип СТ, при които също се наблюдават високи стойности на посочения показател.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Mlachkova A, Pashova-Tasseva Z, Popova H, et al. Presence of SNP Interleukin-17 F in Bulgarian Population, Journal of IMAV 2021;27(2):3692-9.

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

#### **Договор 93/2019    Диагностика и микроинвазивен дентален подход при пациенти с артропатии, вследствие на краниомандибуларни дисфункции**

**Изследователски екип:** Проф. Мариана Йорданова Димова-Габровска, доктор, дн

- Проф. Божидар Йорданов
- Доц. Тодор Узунов
- Ас. Николай Стоилов, дм
- Гл. ас Николай Апостолов
- Десислава Димитрова

**Базова организация:** Катедра Протетична дентална медицина, бул. Г Софийски”1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Краниомандибуларните дисфункции представляват състояния, засягащи лицево-челюстната област, които могат да конвергират в опорно-двигателния апарат, повлиявайки хомеостазата на целия организъм. Целта на научния проект е на основата на съвременни клинични изследвания да се апробира и въведе в практиката протокол за диагностика и микроинвазивен дентален подход при предпротетичната подготовка на дъвкателния апарат при пациенти с артропатии, в следствие краниомандибуларни дисфункции (КМД). Обект на изследване са 45 пациенти (селектирани от 500), разделени на 2 групи: контролна група от 15 пациенти, без знаци и симптоми на КМД и експериментална група от 30 пациенти с артропатии, разделени на 2 подгрупи: със и без наличие на протетични възстановявания. Участниците в проучването са подложени на клиничен функционален анализ, ултразвуково изследване на долночелюстната става (ДЧС), клиничен и дигитален оклузален 40 анализ, изследване на максималната сила на захапката, центричната кондилна позиция и индивидуалните стойности на ДЧС. На пациентите с артропатии е проведено микроинвазивно дентално лечение с оклузални посредници. Находките от функционалния преглед свидетелстват, че пациентите с артропатии преди лечението имат намален обхват на активните движения на максимално отваряне, протрузия и латеротрузиите и по-изразена болкова симптоматика при компресия и палпация на ДЧС в сравнение със здравите пациентите. След период от 6 мес. след лечението се наблюдава значително подобрене в изследваните критерии. Въведеният



протокол за ултрасонографско изследване на пространствените съотношения на ДЧС в три референтни точки, позволи обективност при оценката на положителният ефект от лечението. Посредством клиничния и дигиталния оклузален анализ са определени предпоставките за възникването на функционална патология - силов дисбаланс, артикулационни блокажи и предварителни контакти. Установени са по-ниски стойности на максималната сила на захапката при пациентите с артропатии, които се повишават след приложението на терапевтичните средства. Проведените изследвания позволиха създаването на протокол за диагностика и микроинвазивно лечение на пациентите с артропатии, в следствие на КМД и извеждането на препоръки по отношение на повлияване на функционалната патология на дъвкателния апарат.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Dimova-Gabrovska M, Dimitrova D, Yordanov B, et al. Ultrasound diagnosis of temporomandibular joint in patients with craniomandibular dysfunctions. J of IMAV. 2019; 25(2):2563-2569.
- Dimova-Gabrovska M, Dimitrova D, Yordanov B, et al. Clinical study of patients with arthropathy due to craniomandibular disorders. MedInform. 2020; 7(1): 1131-1135.
- Dimova-Gabrovska M, Dimitrova D, Yordanov B, et al. Ultrasound diagnosis of temporomandibular joint in patients with craniomandibular dysfunctions. 29-th Annual Assembly of IMAV and with the satellite 6-th Meeting of Alumni Club at Medical University Varna, Varna, Bulgaria, 9 - 12 May 2019.

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

#### **Договор 95/2019      Профилактика на зъбния кариес при деца от 6 до 12 години чрез повлияване на хранителните им навици**

**Изследователски екип:** Доц. Лилия Борисова Дойчинова, дм

- Гл. ас. Петър Бакърджиев, дм
- Гл. ас. Димитър Христов, дм
- Ас. Мария Николова, дм
- Илия Льондев - студент
- Афродита Наумова - студент

**Базова организация:** Катедра по „Детска дентална медицина“, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е профилактика на зъбния кариес чрез промяна на хранителните навици при децата от 6 до 12 години. Използвани са социологически и клинични методи. Бяха използвани тридневни хранителни дневници за оценка на хранителния прием на 277 деца, обработен с компютърна програма. Статистическата обработка беше извършена с SPSS Statistics 20 и корелационни анализи на Spearman-Brown. Родителите и децата, участващи в проекта имат незадоволителни знания за влиянието на храненето върху оралното здраве. Чрез антропометрични индекси беше установена незначителна корелация между тежестта на кариеса и хранителния статус на децата. Компютърният анализ показа, че протеинния прием е над препоръчителните физиологични норми, на въглехидратите е над препоръчаната долна граница, на влакнините е в границите на нормалния дневен прием. Под препоръчителните стойности е приемът на витамините А, В1, В9, В12, D, на Са, Р и Fe. Приемът на витамините С, В3, В6, на

Na и K е над съответните физиологични стойности. Отрицателна корелация беше установена между D1MFT+t и консумацията на захарни и сладкарски изделия ( $\rho=-0.36$ ,  $p<0,0001$ ), на конфитюр, мед, мляко, газирани и подсладени напитки ( $\rho=0,34$ ,  $p<0,0001$ ). Положителна е корелацията при консумацията на чипс и крекери ( $\rho=0.18$ ,  $0.019$ ). Няма корелация при зърнените храни, плодовете и зеленчуците, тестените изделия и макаронените продукти, и junk food ( $p>0,05$ ). Установени са нездравословни хранителни предпочитания към нискомолекулните въглехидратни храни, повишаващи оралния рисков профил на децата. Продължителното стоене пред телевизионния екран корелира с увеличаване на D1MFT+t при половината от тях ( $p<0.001$ ),  $Rho=0.438$ . За оценката на програмата за промяна на хранителните навици при изследваните деца беше оценен зъбния им статус, сравнен с контролна група, оставена на обичайния ѝ хранителен режим. След завършването ѝ беше установено намаляване на лезиите в стадий D1, D2 и D3 в сравнение с контролната група, а при лезиите D4 няма промяна. Денталните лекари, родителите и учителите трябва активно да работят за промяна на вредните хранителни навици при децата.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Doychinova L, Kirov D, Bakardjiev P, et al. Television advertising and the development of dental caries in children from 6 to 12 years. Folia Medica 2021;63(4):533-40.
- Doychinova L, Kirov D, Nikolova M, et al. Nutritional intake of vitamin D and dental caries in children from 6 to 12 years. Sylwan English Edition 2020; 164(8): 126-137.

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

#### **Договор 96/2019      Оценка на риска от развитие на зъбен кариес при пациенти на възраст от 19 до 64 години с Cariogram®.**

**Изследователски екип:** Проф. Снежанка Запринова Топалова – Пиринска

- Доц. Жанет Николова, дм
- Доц. Лилия Дойчинова, дм
- Гл. ас. Димитър Киров дм

**Базова организация:** Катедра по „Консервативно зъболечение и ендодонтия“, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е да се повлияят рисковите фактори за развитие на зъбен кариес при пациенти на възраст от 19 до 64 години след като се определи кариес при тях със софтуерната програма Cariogram®. Получените резултати показват, че при 24% от изследваните пациенти съществува много висок риск от развитие на кариес, при 48% висок кариес риск, а останалите 28% се разпределят в групите със среден и нисък риск. Най-доминиращият сектор е възприемчивостта към кариес (16.24%), следван от хранителния сектор (11.64%), микроорганизмите (10.42) и обстоятелствата, предразполагащи за развитие на кариес (6.14). Моделът на Cariogram® разкрива 55,56% шанс за избягване кариес в близко бъдеще за цялата изследвана група. Резултатите от Spearman's Rank correlation показваха, че съществува значителна положителна връзка между кариес риска и D1MFT, ( $r_s [100] = .358$ ,  $p <.001$ ). Оценката на хранителния режим на изследваните пациенти показва и някои отрицателни тенденции в хранителните им навици: висока консумация на мазнини от животински и растителен произход; висока консумация на тлъсти меса и колбаси; ниска консумация на риба; консумация предимно на високомаслени млека; нисък

прием на сурови плодове и зеленчуци; тенденция за увеличаване консумацията на захарни и сладкарски изделия и безалкохолни напитки, съдържащи захар, което повишава риска за развитие на кариес при тях. Установените най-мощни рискови фактори при изследваните лица на възраст от 19 до 64 години са D1MFT, незадоволителната орална хигиена и състава на диетата - въглехидратното хранене и честотата на храненията през деня. За всеки пациент, включен в проучването беше създаден индивидуален профилактичен план за превенция на зъбния кариес, включващ профилактични подходи след оценка на уникалната комбинация от рискови фактори за зъбен кариес в зависимост от степента на тежест на всеки изследван рисков фактор. В края на програмата беше отчетено подобрене на оралната хигиена и хранителния режим на пациентите с висок кариес риск, подкрепено от най-ниска степен на статистическа достоверност ( $\chi^2=5.82$   $p<0.05$ ).

#### **Научни публикации и прояви:**

- Топалова-Пиринска С, Дойчинова Л, Киров Д и др. Рискови фактори за развитие на зъбен кариес при възрастни. Дентална медицина, 2018, 100 (1): 56-63.
- Топалова-Пиринска С, Дойчинова Л, Киров Д и др. Методи за оценка на индивидуалния риск за развитие на кариес. Дентална медицина, 2018, 100 (1): 64-69.
- Doichinova L, Kirov D, Topalova-Pirinska S et al. Caries risk assessment in adults using Cariogram Folia Medica 2020; vol. 62, issue 4. Folia Medica
- Doichinova L, Kirov D, Topalova-Pirinska S et al. Assessment of risk factors for development of caries in adults: a preliminary study. 29-th Annual Assembly of International Medical Association of Bulgaria (IMAB). 2019, Varna, Bulgaria

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

#### **Договор 100/2019 Изследване на експресията на апоптотичния фактор Caspase-3 в човешки първични епителни клетки от изолирани интраоперативно и третирани с *trypan blue* предни лещени капсули от пациенти с възрастово обусловена и диабет тип II индуцирана катаракта**

**Изследователски екип:** Доц. Александър Хуго Оскар, доктор

- Акад Проф. Ваньо Митев
- Гл. ас. Антония Исаева
- Васил Хайкин, докторант
- Ас. Виолета Димитрова
- Гл. ас. Яни Здравков
- Проф. Ива Петкова
- Доц. Станислава Иванова
- Гл. ас. Невяна Велева-Кръстева

**Базова организация:** Клиника по Очни болести, бул. Г. Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Бяха получени първични лещено-епителни клетъчни култури, от *in-vivo trypan-blue*-обагрени предни лещени капсули(ПЛК) от пациенти с възрастово-обусловена и пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта. Изследвани 13 пациенти(55–75год.; 7 с възрастово-обусловена, 6 с диабет тип-2 индуцирана катаракта). При тройно флуоресцентно маркиране се визуализираха клетъчните ядра, калциевият депозит в екстрацелуларния матрикс( $Ca^{2+}$ ) и вътреклетъчните хипероксидативни свободни

радикали(ROS). Проведах се тройно-флуоресцентно изследване и количествен анализ. Най-високо ниво на ROS се установи при LECs от trypanblue-двустранно оцветена ПЛК от пациентите с диабет тип 2–5,214. Най-ниско ниво на ROS –3,420 при LECs от trypanblue-едностранно оцветена ПЛК при възрастово-обусловена катаракта. ROS при LECs от trypanblue-едностранно оцветена ПЛК при възрастово-обусловена катаракта– 3,761, а при LECs от trypanblue-едностранно оцветена ПЛК при диабет тип 2–4,376. Най-високо ниво на  $Ca^{2+}$  се установи при LECs от trypanblue-двустранно оцветена ПЛК при диабет тип 2–0,299. Най-ниско ниво на  $Ca^{2+}$  –0,182 при LECs от trypanblue-едностранно оцветена ПЛК при диабет тип 2 индуцирана катаракта.  $Ca^{2+}$  при LECs от trypanblue-едностранно оцветена ПЛК при възрастово-обусловена катаракта–0,238, а при LECs от trypanblue-двустранно оцветена ПЛК при възрастово-обусловена катаракта –0,208. Бихме могли да спекулираме за корелация между относителните нива на ROS и Caspase-3. Въпреки това, проведените изследвания не установиха статистически достоверни резултати. Спекулира се, че частично вътреклетъчно проникване на trypan-blue регулира негативно клетъчната физиология. Оксидативният стрес чрез ROS и индуцираната апоптоза, с намалената антиоксидантна активност, са отговорни за развитието на катаракта. ROS индуцират повишаване на  $Ca^{2+}$ . Увеличаването на екстрацелуларния  $Ca^{2+}$  е характерен за патологичните състояния, свързани с оксидативен стрес и апоптоза. Главна причина за формиране на възрастово-обусловената и диабет тип 2-индуцирани катаракти е увреждане, в следствие на ROS и асоциираните повишени нива на  $Ca^{2+}$ . Установихме: Повисоки нива  $Ca^{2+}$  при двустранно оцветяване с trypan-blue, както при диабет тип 2-индуцирана катаракта, така и при възрастово-обусловена. При диабет тип 2-индуцирана катаракта- по-високи нива на ROS при двустранно оцветяване. При пациенти с възрастово-обусловена катаракта- сходни нива на ROS при двата метода. Настоящото изследване е първото по рода си у нас, допринасящо за изясняване механизмите на катарактогенеза.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Хайкин В, Танев И, Оскар А, и др. Изследване на оксидативен стрес и калциев депозит на човешки първични епителни клетки от изолирани интраоперативно и третирани с trypan blue предни лещени капсули от пациенти с възрастово обусловена катаракта. XIIIти конгрес на българско дружество по офталмология, 24-27 октомври 2019, Боровец.

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

#### **Договор 101/2019    Ролята на витамин D в развитието на късогледството**

**Изследователски екип:** Доц. Галина Георгиева Димитрова, дм

- Доц. Александър Оскар, дм
- Гл. асистент Невяна Велева-Кръстева, дм
- Гл. асистент Огнян Младенов, дм
- Асистент Павлин Кемилев
- Васил Хайкин –докторант
- Проф. Добрин Свиначков, дмн

**Базова организация:** Катедра по Офталмология, ул. Св. Г Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** За първи път в България беше проведено изследване, търсещо връзката между витамин D (серумни нива на 25(OH)D) и риска от миопия. Участваха 98 деца на средна възраст 11,6 г. (SD ±3,09) – момичета 37 (37,8%) и момчета 61 (62,2%). Децата бяха разделени в две групи: миопи – 76 (77,6%) и немиопи – 22 (22,4%). Беше проведен пълен офталмологичен преглед, циклоплегична рефракция, биометрия и еднократно изследване на серумните нива на 25(OH)D чрез течна хроматографска маспектрометрия (при ниво на недостатъчност < 80 nmol/L). Средната стойност на серумните нива на 25(OH)D за цялата група беше 72,90 nmol/L (20 – 115; SD±17,78). Достатъчност на витамин D беше наблюдавана само при 35 (35,7%) деца. Средната стойност на 25(OH)D за миопите беше 69,53 nmol/L (20-115; SD±17,55), а за немиопите – 84,55 nmol/L (62-111; SD±13,28), като наблюдаваната разлика между двете групи беше статистически значима (P<0,001). Установи се обратна връзка между серумния 25(OH)D и аксиалната дължина за цялата група (P=0,001), доказана и в множествена линейна регресия след добавяне на факторите възраст и часове, прекарани навън (P=0,003). Рискът за миопия е сигнификантно свързан с по-ниски серумни нива на 25(OH)D, доказан чрез множествената логистична регресия при добавяне на факторите възраст и пол (P=0,002) и запазваща се и след добавяне на фактора часове, прекарани навън (P=0,001). В обобщение, резултатите от проучването очертаха два момента. Първо, наблюдава се значителен процент деца с недостатъчност на 25(OH)D, което посочва необходимостта от провеждането на популационни проучвания за витамин D статуса на българските деца. Второ, по-ниските серумни концентрации на 25(OH)D бяха свързани с по-дълга аксиална ос и по-висок риск от миопия. Нашите данни посочват, че това е налице, независимо от времето, прекарвано навън и дава научна основа за провеждане на бъдещи по-големи изследвания, изучаващи потенциалната роля на витамин D в етиопатогенезата на късогледството.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Велева Н, Димитрова Г, Оскар А, и др. Витамин D статус при деца с миопия. Български Офталмологичен Преглед 2020;64(1).

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

#### **Договор 102/2019 Роля на ендоканабиноидната система в метаболитните и хормоналните нарушения при синдром на поликистозните яйчници**

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

- Проф. Здравко Каменов, дмн
- Ас. Вера Карамфилова, дм
- Пламена Кабакчиева-Георгиева

**Базова организация:** Катедра по вътрешни болести, бул. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Ендоканабиноидната система участва в регулацията на енергийния баланс и овариалната функция, и вероятно в патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници (СПЯ). Целта на настоящето изследване е да се анализира връзката между анандамида (АЕА) с метаболитните и хормоналните нарушения при жени със СПЯ. В проучването включихме 88 лица - 58 пациенти със СПЯ (25.9±5.2 години) и 30 здрави контроли (27.6±5.2 години). В хода на анализ на резултатите се извършиха два поданализа, като пациентите се разделиха първоначално на група със затлъстяване (ITM≥30; n=24) и без

затлъстяване (ИТМ<30; n=34) и след това на група с андроиден (Т/Х≥0.85; n=26) и гиноиден (Т/Х<0,85; n=32) тип преразпределение на мастната тъкан. Проведени бяха антропометрични, хормонални и биохимични изследвания. Нивата на АЕА и SHBG бяха изследвани с ELISA. Пациентите със СПЯ и здравите контроли не се различаваха по АЕА, SHBG, антропометричните и метаболитните показатели. СПЯ групата показва значими разлики в LH/FSH отношението (p=0.023) и всички маркери за хиперандрогенизъм - общ, свободен и бионаличен тестостерон, FAI, DHEAS, андростендион, 17-ОН-прогестерон (p<0,001). SHBG показва най-силна негативна корелация с инсулина на 120 минута (r=-0.487, p<0.001) и с ИТМ, теглото, талия, ханш, Т/Х отношение и хирзутизма. Негативна корелация между нивата на АЕА се установи с гликемията на 120 минута (r=-0.304, p=0.020) и Т/Х отношението (r=-0.266, p=0.044). В първия поданализ на групите - СПЯ със и без затлъстяване, се установи разлика при повечето от метаболитните показатели, в нивата на LH (p=0.048), LH/FSH отношението (p=0.011), SHBG (p<0.001), FAI, свободен и бионаличен тестостерон (p<0.001). Във втория поданализ на пациентите се установи разлика в нивата на АЕА в групата с гиноиден тип преразпределение на мастната тъкан, спрямо тази с андроиден (p=0.020). В заключение АЕА не се различаваше между здрави и пациенти, но значима разлика в нивата му се установи според разпределението на мастната тъкан при СПЯ. Потвърди се връзката на SHBG с инсулиновата резистентност при СПЯ.

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

**Договор 103/2019    Оценка на регенеративните процеси в базалния нервен плексус след трансплантация на лимбални стволови клетки и амниотична мембрана чрез Cochet-Bonnet естезиометрия и оптична кохерентна томография**

**Изследователски екип:** Гл. ас. Яни Тодоров Здравков, дм

- Розалия Димитрова - докторант

**Базова организация:** Катедра по Офталмология, ул. "Г. Софийски" 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Настоящият проект изследва регенеративния ефект от трансплантацията на лимбални стволови клетки и амниотична мембрана върху роговичната инервация при пациенти с трофични заболявания на очната повърхност. В проучването бяха включени 25 пациенти с на средна възраст 49.12 години. Използваните изследователски методи включват Cochet-Bonnet естезиометрия, оптична кохерентна томография, импресионна цитология, трансплантация на лимбални стволови клетки и амниотична мембрана, рутинни офталмологични методи, въпросник за субективните оплаквания и качеството на живот на пациентите. При всички пациенти се установиха белези на дисфункция на лимбалните стволови клетки. В проби от импресионна цитология бяха установени белези на конюнктивализация, лимфоцитна възпалителна инфилтрация, в част от случаите и ксероза на епитела. Средната роговична сетивност, измерена преди оперативно лечение бе 115.84mm/grms±91.44. Постоперативно бе установена средна роговична сетивност 63.72mm/grms±71.50. Wilcoxon's signed rank test демонстрира статистически значима разлика между предоперативната и постоперативната сетивност. При трима пациенти не се наблюдава промяна в роговичната сетивност. Откри се статистически значимо намаление на роговичната сетивност с възрастта (p=0.022). Предно-сегментната ОСТ предоперативно демонстрира зони на дезепителизация, стромална хиперрефлексивност и

корнеален едем. Постоперативно се наблюдава възстановен епителен интегритет и формиране на цикатрициална тъкан в роговичната строма, възпрепятстваща процеса на изтъняване. Извърши се сравнителен анализ на попълнените въпросници преди и след проведеното лечение и се установи статистически значимо подобрене във всички субективни симптоми. Пациентите съобщиха за увеличен толеранс към зрителна работа с телевизионни екрани, телефон и четене, което значително подобрява качеството на живот. Редуциран бе броят на употребяваните токсични топикални медикаменти. Преди лечение роговичната сетивност демонстрира положителна зависимост спрямо симптоми като сълзене, фотофобия, хиперемия и отрицателна зависимост с честотата на употреба на телефон и посещение на развлекателни събития. След проведеното лечение се откри статистически значима корелация между роговичната сетивност и симптомите като дразнене, сълзене, фотофобия и хиперемия. Подобриеното в роговичната сетивност корелира с увеличено време прекарано пред телевизионен екран и употреба на телефон.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Hristova R, Zdravkov Y, Hristova M, et al. Treatment of Limbal Stem Cell Deficiency in the Setting of Neurotrophic Keratopathy. J Int Translational Med 2020,8(2):30-37
- Христова Р, Здравков Я, Марков Г, и др. Възпалителни промени в очната повърхност при пациенти с персистиращи роговични язви, XIII Конгрес на Българското дружество по офталмология, Боровец, 2019

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

#### **Договор 105/2019 Мониториране на тъканната оксигенация при тежък сепсис и хиповолемия**

**Изследователски екип:** Гл.ас. Ралица Георгиева Маринова, дм

- Проф. Атанас Темелков
- Петя Хубенова

**Базова организация:** Катедра анестезиология и интензивно лечение, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Настоящото проучване има за цел да сравни стойностите на тъканната оксигенация с хемодинамичния мониторинг и нивата на лактат при пациенти с тежък сепсис. Изследването обхваща 19 пациенти, обект на интензивно лечение в КАИЛ на УМБАЛ „Александровска“. Десет от пациентите отговарят на критериите за тежък сепсис, останалите девет са без данни за септично състояние. При двете групи пациенти се сраствняват стойностите на тъканната оксигенация, измерена с INVIOS монитор, Средното артериално налягане (МАР), кислородната сатурация в смесената венозна кръв (SvO<sub>2</sub>) и нивата на лактат в рамките на 72ч след приемане в КАИЛ. Резултати: При пациентите с тежък сепсис са със значимо по-ниски стойности на StO<sub>2</sub>, в сравнение с пациентите, без данни за сепсис. Стойностите на тъканната оксигенация корелират и със стойностите на средното артериално налягане, кислородната сатурация в смесената венозна кръв, стойностите на StO<sub>2</sub> в настоящото проучване не корелират значимо с нивата на лактат при пациентите със сепсис. Отразената инфрачервена спектроскопия, като стойности на StO<sub>2</sub> корелира с хемодинамичния мониторинг при пациентите с тежък сепсис, но не корелира значимо с тежестта на заболяването. Това би означавало, че мониторирането на тъканната оксигенация има клинично значение при пациенти със сепсис. За ролята на

мониторирането на тъканната оксигенация в ранната фаза на ресусцитация при сепсис са необходими по-широкомащабни проучвания.

**Научни публикации и прояви:**

- Marinova R, Groudeva V, Krastev P. Tissue oxygenation measurement in patients with sepsis compared to the lactate levels and hemodynamical monitoring. Comp Rend Acad Bulg Sci 2021
- Marinova R, Temelkov A. Tissue oxygenation monitoring in sepsis. Critical Care 2020;24(Suppl1)
- Marinova R, Temelkov A. Tissue oxygenation monitoring in sepsis. 40<sup>th</sup> ISICEM, Brussels, 15-18 Sep, 2020

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

**Договор 106/2019 Изясняване ролята на интраваскуларния ултразвук (IVUS) в оценката на дегенеративни заболявания на аортата**

**Изследователски екип:** Доц. Добрин Йотков Василев, дм

- Доц. Рая Иванова, дм
- Ас Лилия Владимирова
- Ния Милева - Петрова

**Базова организация:** Катедра по вътрешни болести, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Проведохме интраваскуларно ултразвуково изследване (IVUS) на аортата при 12 пациента с данни от трансторакална ехокардиография (ТТЕ) и компютърна томография (КТ) с данни за увеличение на асцендентната аорта (диаметър  $\geq 40$  мм). Всички пациенти подписаха информирано съгласие за участие в научния проект и за извършване на изследването. Използва се 20 Mhz, Visions PV probe (Volcano Philips Corp, USA) през 8.5 Фр артериален въвеждач. С помощта на ръчно изтегляне на сондата се осигури на визуализация на съда по цялата му дължина от аортния корен до ортоилиачната бифуркация. Извършиха се измервания на максималния систоличен и диастоличен диаметър на асцендентната аорта, както и на интра-аортното систолно и диастолично налягане. 91% от пациентите бяха мъже на средна възраст  $67 \pm 9.5$  години, всички с артериална хипертония, 28.6% с исхемична болест на сърцето, 42.9% с хронична артериална недостатъчност на долни крайници, 42.9% с диабет, 28.6% - пушачи. Средния диаметър на аортата измерен чрез IVUS беше 49.6 мм. При провеждане на Т-тест анализ максималният диаметър на възходящата аорта измерен чрез КТ и IVUS не се различават сигнификантно. От друга страна, се откри статистическа значима разлика при измерванията получени с ТТЕ и IVUS ( $t = 13.118$ ,  $p = 0.034$ ). Средно, IVUS диаметрите бяха с 4.1 мм по-големи от резултатите получени с ТТЕ (95% CI [14.21, 17.13]). В заключение, интраваскуларното ултразвуково изследване на възходящата аорта предостави по-големи диаметри, в сравнение с тези от ТТЕ, но не се откри значима разлика между измерванията получени чрез КТ и IVUS.

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



**Договор 107/2019 Най-чести микробиологични причинители на остър гноен отит и усложненията му, след приложението на 10 валентната пневмококова конюгирана ваксина**

**Изследователски екип:** Проф. Диана Петрова Попова дмн

- Проф. Лена Сечанова, дм
- Милена Миткова

**Базова организация:** Катедра по УНГ болести, ул. Бяло море 8, София ,1000

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта в настоящото проучване е да се изследват най-честите микробиологични причинители на острия гноен отит и усложненията му след приложението на 10 валентната пневмококова ваксина, чрез изследване на секрет от средното ухо от УНГ специалист при деца със спонтанна перфорация на тъпанчевата мембрана в хода на заболяването (оторея) или оперативно взет секрет след парацентеза направена по медицински показания. В случаите на неусложнен епизод на ОАМ се изследва назофарингеален секрет. Освен това се цели установяването на чувствителността на изолираните отопатогенни бактерии към антибиотици. След въвеждането на PCV10 бяха открити значителни промени в броя на основните отопатогени, изолирани от MEF /оторея при деца с установена „тежка“ АОМ и Назофарингеален секрет при деца с лека форма на АОМ. Установи се ролята на *M. catarrhalis* като основен патоген в нашето проучване с дял от 31.1% от всички положителни проби, в сравнение с едва 0.8% за предходният изследван период., и е установено, че *M. catarrhalis* е по-често срещан АОМ патоген. Установи се, че *M. Catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* и *H. influenzae* са били най-често изолираните патогени в назофаринкса на деца с „леки“ АОМ епизоди в сравнение с пробите от MEF / оторея, получени от клинично проблемни случаи на АОМ, където преобладава *S. pyogenes*. В назофаринкса наличието на последния е значително по-ниско при страдащи деца от „лек“ АОМ, отколкото е представен в проби от MEF. Това може да означава, че *S. pyogenes* са по-склонни да причиняват „Тежка“ АОМ, водеща до високи нива на инфекция, въпреки че нивата на наличност са ниски. Обратното е вярно за *M. Catarrhalis*, която е установена при 32 от всички наши пациенти с „лека“ АОМ, но налична при 1 от децата с „тежка“ АОМ. В нашето проучване не се наблюдават значителни промени в процентите на антимикробночувствителност при *S. pneumoniae* от преди въвеждането на PCV10. 42 процента от антимикробно-нечувствителност на пневмококите в България са останали високи в ерата след PCV10 поради широкото разпространение на някои мултирезистентни щамове, които също са установени в това проучване. Разпространението на ампицилинови нечувствителни изолати на *H. influenzae* (33%) сред децата с АОМ е сравним с процентите наблюдавани преди универсално приложение на PCV10. В България най-много предписани антибиотици за АОМ са амоксицилин и амоксицилин-клавуланова киселина. Настоящите нива на разпространение на нечувствителни *M. catarrhalis* към амоксицилин и цефтриаксон (общо 93.3%) и резистентни *S. aureus* към амоксицилин-клавуланова киселина и цефтриаксон (25%, ) изглежда ниско сред децата с АОМ, но при текущите наблюдения са оправдани. Това проучване е от решаващо значение за правилно ориентиране към лечение на деца с АОМ.

**Научни публикации и прояви:**

- Setchanova L, Stancheva I, Popova D et al. Bacterial Spectrum of Acute Otitis Media in Bulgarian Children during the 10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Era. *J Pediatr Infect Dis* 2020; 15(03): 135-143

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

**Договор 108/2019 Измерване на серумните нива на 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) при пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата, микроскопски колит и синдром на дразним ото черво**

**Водеш изследовател:** Доц. й Пламен Иванов Пенчев, дм

**Членове на изследователския екип:**

- Иван Лютаков, докторант
- Радислав Наков
- Валентин Лозанов, дм

**Базова организация:** Катедра по гастроентерология, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Микроскопи колит (МК), болест на Крон (БК) и улцерозен колит (УК) са заболявания от групата на възпалителните чревни заболявания (ХВЧЗ), като се предполага, че това са мултифакторни заболявания, които се развиват при абнормна имунна реакция към чревен антиген (инфекция, лекарство, аутоимунитет и/или жлъчни киселини). Доказано е, че малабсорбцията на жлъчни киселини (МЖК) в червата, довежда до значително влошаване на хроничната диария при пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ). Целта е да се определи диагностичната стойност, чувствителността и специфичността, както и "cut-off" границите на серумния 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), като маркер на малабсорбция на жлъчните киселини (МЖК). В проспективно проучване са проведени са изследвания на серум на 120 лица, като е серумен 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) в МУ-София. МФ. Катедра Медицинска химия и биохимия чрез мас-спектрометрия от типа HPLC/LC-MS. При всичките пациенти с хронична диария в нашата кохорта, определихме средни нива C4. При ХВЧЗ в активност 53.1 ng/ml, ХВЧЗ в ремисия 52.2 ng/ml, ХВЧЗ след операция 85.7 ng/mL, IBS-D бяха 7.5 ng/ml, Микроскопски колит със стойност 69.3 ng/ml и здрави контроли 3.7 ng/ml. C4 "cut-off" от 48.9 ng/ml е със 82.6% чувствителност и 84.3% специфичност (AUROC. 0.89) за откриване на МЖК. Заедно C4 > 48.9 ng/ml и FGF-19 (<60 pg/ml), има при 52.29% от пациентите, сравнени с тези 8% под C4 cut-off (p < 0.001). Серумния C4 корелира с броя на изхожданията дневно ( $r=-0.709$ ; p < 0.001) и корелира обратно със стойностите на FGF-19 ( $r=-0.741$ ; p < .001). Проведохме изследване на 120 пациента, като определихме праговите стойности на C4 за откриване на МЖК. Сравнихме получените резултати с наши предходни данни спрямо FGF-19, като вече установен маркер за МЖК (от предшестваш Грант и Публикации). От получените резултати намерихме, че C4 има висока диагностична точност за откриване на МЖК при пациенти с хронична диария.

**Научни публикации и прояви:**

- Lyutakov I, Lozanov V, Sugareva P, et al. Serum 7- $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one and fibroblast growth factor-9 as biomarkers diagnosing bile acid malabsorption in microscopic colitis and inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2020 Nov 10.

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

## **Договор 109/2019 Създаване на биобанка за фекална микробиота с цел безопасна и ефективна трансплантация на фекална микробиота в България**

**Изследователски екип:** Доц. Венцислав Наков Наков, дм

- Радислав Наков, дм,
- Иван Лютаков, дм, докторант
- Доц. Атанаска Миткова, дб
- Проф. Ваня Герова-Нанкова, дм
- Вероника Петкова –докторант
- Силва Гирагосян, дб, докторант

**Базова организация:** Катедра по гастроентерология, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Трансплантацията на фекална микробиота (ТФМ) се наложи като метод за лечение на рекурентна инфекция с *Clostridioides difficile* (rCDI). За да се гарантира безопасно, разпространено и рентабилно прилагане на ТФМ, е необходимо създаването на биобанки за фекална микробиота. Създаването на биобанка е сложен, времеемък и скъп процес, което го прави истинско предизвикателство за страна от Източна Европа. Целта ни е да създадем първата биобанка за фекална микробиота в източноевропейска държава – България. Създаден е мултидисциплинарен екип от гастроентеролози, микробиолог, специалист по инфекциозни болести и генетик. Използвахме въпросник, базиран на Първия европейски консенсус за ТФМ, за да набераме потенциални донори на фецес. Преминалите анализа са подложени на лабораторни тестове на кръв и изпражнения. Между октомври 2018 г. и април 2019 г. 112 потенциални донори попълниха специализирания ни въпросник. 70 от тях (62,5%) бяха изключени, главно поради възраст над 50 години, нездравословен индекс на телесна маса (ИТМ) и рисково поведение. Четиридесет и двама (37,5%) кандидати за донори бяха поканени за лабораторни изследвания на кръв и фекалии, от които 12 (28,6%) преминаха успешно този скрининг. Наличието на *Helicobacter pylori* фекален антиген и мултирезистентни организми бяха най-честите причини за изключване. От 12 донори четирима (33%) не отговориха на последващия лабораторен скрининг, който се провежда на всеки 3-6 месеца. Накрая 8 души (7.14%) бяха избрани за активни донори и бяха вписани в първата биобанка за фекална микробиота в България. Извършени са десет успешни ТФМ на пациенти с rCDI. В заключение, ТФМ е безопасен и ефективен метод за лечение на rCDI. Важен процес за осъществяването на успешна ТФМ е селекцията на донори и техния скрининг, поради което биобанките за фекална микробиота са от изключително значение за централизация на процеса.

### **Научни публикации и прояви:**

- Nakov R, Lyutakov I, Mitkova A, et al. Establishment of the first stool biobank in Eastern Europe, aiming safe and effective fecal microbiota transplantation in Bulgaria. MD Journal, 2020;17(4):111-115.
- Nakov R, Lyutakov I, Mitkova A, et al. Establishment of the first stool bank in an Eastern European country and the first series of successful fecal microbiota transplantations in Bulgaria. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021;25(1):390-396.
- Nakov R, Lyutakov I, Petkova V, et al. Establishment of the first stool bank in Eastern Europe. Helicobacter 2019 Sep 1 (Vol. 24). XXXIInd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer, Innsbruck, Austria, 5–7 Sep 2019
- Nakov R, Lyutakov I, Petkova V, et al. Establishment of a stool bank in a country with lower human development index. 27th United Eur Gastroenterology Week, 2019. 19-23

Oct, 2018, Barcelona

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

**Договор 110/2019** Скрининг и диагностика на *H. pylori* инфекцията и автоимунен гастрит и съпътстващата ги стомашна атрофия

Изследователски екип: Проф. Борислав Георгиев Владимиров, дм

- Ас. Мила Ковачева-Славова, дм
- Тодор Ангелов

**Базова организация:** Катедра по гастроентерология, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Ролята на *H.pylori* (*HP*) инфекцията и атрофичният гастрит в развитието и прогресията на възпалителните чревни заболявания (ВЧЗ) и хроничния панкреатит (ХП) все още се изучава. Целта на настоящето изследване е провеждане на скрининг за *HP*-инфекция и автоимунен гастрит (АИГ) сред пациенти с ВЧЗ и ХП с оценка на стомашната структура и функция и връзката помежду им. Използвани са Монреалската и Cambridge класификациите за ВЧЗ и ХП. Скринингът на *HP*-инфекция, оценката на стомашна атрофия и АИГ се осъществиха чрез GastroPanel, включващ пепсиноген-I(PGI), пепсиноген-II(PGII), гастрин-17(G-17), *H.pylori* IgG; антипариетално-клетъчни антитела (АПКА) и анти-интринзик фактор (АИФ), използвайки ELISA метод. Изследването включва 86 лица (47 мъже, средна възраст 47,86±15.93г): 44 с ВЧЗ; 30 с ХП и 12 здрави контроли. *HP*-инфекция имат 27,27% от пациентите с ВЧЗ и 40% от тези с ХП. АИГ верифицираме при 34,09% с ВЧЗ и 46,67% с ХП. Повърхностен *HP*-гастрит наблюдаваме в 25% с ВЧЗ и в 30% с ХП, а атрофичен гастрит съответно в 6,82% и в 10%. Наблюдаваме най-ниски нива PGI ( $p=0,026$ ) и най-високи АПКА ( $p=0,015$ ) при ВЧЗ. Възрастта при болест на Крон корелира правопрпорционално с нивата на G-17 и PG-I и обратнопропорционално с АИФ ( $p<0,05$ ). При Болестта на Крон АИФ са по-високи при жените ( $p=0,05$ ) и корелират обратнопропорционално с PG-I и PG-II. При ХП АИФ корелира правопрпорционално с G-17. Морфологичните промени, *HP*-инфекцията и АИГ не корелират с хода на ВЧЗ, но се откроява тенденция за протективно действие на *H.pylori* върху развитието на усложнения. Наблюдаваме по-често АИГ при напреднали структурни панкреасни промени. Пациентите с ХП и съпътстващо автоимунно заболяване имат повишен риск от АИГ и стомашна атрофия. При желязодефицитна анемия наблюдаваме по-ниски PG-I, PG-II и G-17 за ВЧЗ и по-висок титър *H.pylori* за ВЧЗ и ХП. Спазването на диагностичния алгоритъм за *H.pylori*, АИГ и атрофичен гастрит позволява ранното им откриване и лечение с последваща профилактика на асоциираните малигнитет и малабсорбционни усложнения.

**Научни публикации и прояви:**

- Kovacheva-Slavova M, Gecov P, Genov J, et al. Relationship between pancreatic structural changes and nutritional status by monitoring of patients with chronic pancreatitis, 52 Annual Meeting of the European Pancreatic Club, July 02-03, 2020.
- Kovacheva-Slavova M, Valkov H, Angelov T, et al. Screening for Helicobacter pylori infection and Clarithromycin resistance using real-time polymerase chain reaction. EHMSG – 33rd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer; Sep 12, 2020, Helicobacter. 2020;25(Suppl.1), 4

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

**Договор 113/2019 Изследване на потенциални серумни биомаркери при папиларен тиреоиден карцином**

**Изследователски екип:** Проф. Русанка Ковачева-Георгиева, дм

- Проф. Радина Иванова, дмн
- Доц. Александър Шинков, дм
- Проф. Георги Георгиев, дм
- Инна Димитрова - докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е да се изследват галектин-3 (Gal-3), ангиопоетин-1 (Ang-1), тъканен инхибитор на металопротеиназа 1 (TIMP-1) и YKL-40 в серума на пациенти с папиларен тиреоиден карцином (ПТК) и с доброкачествени възли на щитовидната жлеза и да се сравнят нивата в двете групи. Бяха включени 80 пациенти, 40 с цитологично доказани доброкачествени възли на щитовидната жлеза и 40 с хистологично верифициран ПТК. При всички се изследва серумното ниво на няколко потенциални биомаркера (Gal-3, Ang-1, TIMP-1, YKL-40) чрез ELISA-методика. Пациентите с доброкачествени възли на щитовидната жлеза не се различават по пол и възраст от пациентите с ПТК (жени:мъже=9:1;  $43.9 \pm 13.4$  г. в групата на доброкачествените възли срещу  $43.8 \pm 16.0$  г. в групата на ПТК,  $p=0.976$ ). Установената честотата на папиларния микрокарцином е 57.5%, а на ПТК с шийни лимфни метастази – 32.5%. Серумните нива на Gal-3 и TIMP-1 са значимо по-високи в групата на пациентите с ПТК в сравнение с групата на доброкачествените възли (Gal-3,  $p<0.001$ ; TIMP-1,  $p=0.019$ ). Липсва значима разлика между нивата на другите два маркера (Ang-1,  $p=0.473$ ; YKL-40,  $p=0.445$ ). Серумните биомаркери не корелират с размера на ПТК, дефиниран като най-големия измерен диаметър на лезията ехографски. Установява се по-високо ниво на TIMP-1 в групата на пациенти с ПТК и шийни лимфни метастази в сравнение с пациентите с ПТК без лимфни мета ( $84.6 \pm 23.5$  срещу  $73.2 \pm 15.9$ ,  $p=0.007$ ), като разлика не се открива за останалите маркери. Доказването на повишена експресия на гени в туморни клетки от ПТК е основание за изследване на техните протеинови продукти в периферна кръв с цел търсене на биомаркери, които да подпомогнат предоперативната диагноза на заболяването. Нашето проучване установи по-високи нива на TIMP-1 и Gal-3 при пациенти с ПТК в сравнение с групата на доброкачествените възли. Необходими са нови изследвания върху тези маркери с по-голям брой пациенти, включващи и случаи на авансирал ПТК. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

**Договор 114/2019 Сравнение на фактори на костния обмен при лица с първичен хиперпаратиреоидизъм с и без автоимунен тиреоидит**

**Изследователски екип:** Доц. Александър Димитров Шинков, дм

- Проф. Русанка Ковачева, дм
- Проф. Георги Георгиев, дм
- Инна Янкова, докторант

**Базова организация:** Катедра по ендокринология, ул. Здраве №2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се сравнят нивата на някои фактори, участващи в костното ремоделиране – RANKL, остеопротегерин (OPG), IL-17A, при лица с първичен хиперпаратиреоидизъм (ПХПТ) с и без аутоимунен тиреоидит (АТ), да се потвърси асоциацията между съчетанието на двете заболявания и съотношенията между изследваните маркери с рутинните показатели на калциево-фосфорната обмяна и да се оцени възможна обща патогенетична роля на IL-17A. От всички 251 пациента с доказан ПХПТ, преминали през УСБАЛЕ за периода на проекта, бяха включени 100 пациента - 50 само с ПХПТ и 50 с ПХПТ и АТ. Определиха се и две контролни групи: 35 лица само с АТ и 35 здрави лица, без ПХПТ и без АТ. При всички участници бяха изследвани показатели на калциево-фосфорна обмяна, RANKL, OPG и IL-17A. Честотата на АТ сред пациентите с ПХПТ беше 38.2% (95% CI 33-43%) и не се отличаваше значимо от тази в общата популация, 32.5% (95% CI 30-35%),  $p=NS$ . Не се установи статистически значима разлика във възрастта, ИТМ, рутинните показатели на калциево-фосфорната обмяна, RANKL, OPG и IL-17A при пациентите с ПХПТ с и без АТ. Нямаха разлика в изследваните показатели и между здравите лица и тези с АТ ( $p>0.05$ ). Серумното ниво на IL-17 беше значимо по-високо при пациентите с ПХПТ в сравнение с контролните групи (31.9, 19.8-45 pmol/L срещу 15.6, 3.4-28.7 pmol/L,  $U=1902$ ,  $p<0.001$ ). Такава разлика не беше установена при сравняване на серумните нива на RANKL и OPG (съответно  $p=0.29$  и  $p=0.49$ ). Установи се статистически значима положителна корелация на IL-17 с нивата на калций ( $\rho=0.325$ ,  $p<0.001$ ), ПТХ ( $\rho=0.201$ ,  $p=0.019$ ) и RANKL ( $\rho=0.176$ ,  $p=0.021$ ) и отрицателна корелация с неорганичните фосфати ( $\rho=-0.273$ ,  $p<0.001$ ). По-високите нива на IL-17A при ПХПТ предполагат ролята им в механизмите, чрез които ПТХ повлиява костната обмяна. Липсваха доказателства за асоциацията между ПХПТ и АТ. Остава необходимостта от по-нататъшни изследвания за изясняване на проблема. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

### **Договор 117/2019** Уромодулин – маркер за ранна диагностика на хроничните бъбречни заболявания

**Изследователски екип:** Доц. Атанас Иванов Кундурджиов, дм

- Диян Генов
- Ирена Иванова, дм
- Доц. Венцислава Пенчева-Генова, дм
- Анна Костадинова
- Ваня Грозева
- Проф. Огнян Георгиев, дм

**Базова организация:** Катедра по Вътрешни болести, бул. Акад. Ив. Гешов 15, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проведеното проучване е да се установи ролята на серумния уромодулин (sUmod) като ранен маркер за диагностика на реналното увреждане при пациенти с хронични бъбречни заболявания (ХБЗ). В проучването са включени 70 пациенти с различна степен на ХБЗ на средната възраст  $56.53 \pm 11.753$  години. Съотношението мъже/жени е 28/42 (40.0% мъже и 60.0% жени). При всички пациенти са събрани анамнеза и основни демографски данни. Извършени са хематологични и биохимични изследвания и ехография на бъбреците. С помощта на имунологични тестове – ЕЛАЙЗА, са измерени sUmod и цистатин Ц. Съгласно препоръките на KDIGO

пациентите са разделени в пет групи. 11 от пациентите са с ХБЗ I степен (eGFR >90 mL/min/1.73m<sup>2</sup>), 17 - II степен (eGFR: 60 до 89 mL/min/1.73m<sup>2</sup>). Шестима от пациентите са с IIIa степен (eGFR:45 до 59 mL/min/1.73m<sup>2</sup>) и още 13 – с IIIb степен (eGFR: 30 до 44 mL/min/1.73m<sup>2</sup>). 13 от пациентите са с IV степен ХБЗ (eGFR:15 до 29 mL/min/1.73m<sup>2</sup>) и 10 - с V степен (eGFR<15 mL/min/1.73m<sup>2</sup>). Средната стойност на sUmod за всички изследвани пациенти е 123.2367 ng/mL (от 2.64 до 709.64 ng/mL), като стойностите му намаляват с нарастване степента на бъбречната увреда. По-ниски стойности на sUmod се измерват при по-високите степени на ХБЗ. Корелационния анализ показва сигнификантна отрицателна връзка между sUmod и серумния креатинин (r= -0.467, p<0.0001), цистатин Ц (r= -0.430, p<0.0001) и урея (r= -0.495, p<0.0001). Същевременно е установена статистически значима позитивна връзка между sUmod и гломерулната филтрация (r=0.628, p<0.0001). Нашето проучване показва сигнификантна корелация между стойностите на sUmod и всички познати и добре изучени маркери за оценка на бъбречната увреда. Резултатите ни потвърждават приложимостта на sUmod като потенциален ранен биомаркер за установяване на ХБЗ. Определянето на sUmod дава възможност за ранно откриване на бъбречното увреждане при различни заболявания. Това позволява започване на лечение още в началните стадии на бъбречното увреждане и евентуално спиране развитието на болестта.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Ivanova I, Genov D, Kundurdgiev A. et al. "Serum uromodulin – a marker for diagnosis of chronic kidney diseases". IFCC WorldLab Congress, Seoul 2020

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

#### **Договор 118/2019 Изследване на серумни биомаркери като предиктори за отговор към сърдечна ресинхронизираща терапия при пациенти със сърдечна недостатъчност**

**Изследователски екип:** Доц. й Екатерина Иванова Иванова-Годорова, дм

- Екатерина Куртева, дм
- Проф. Доброслав Кюркчиев, дн
- Асист. Калина Тумангелова-Юзеир, дм
- Георги Василев, докторант
- Светослав Куртев
- Доц. Добрин Василев, дм

**Базова организация:** Катедра по Клинична имунология, бул. Акад. Ив. Гешов 15, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:**Целта е да се оцени серумните нива на няколко сигнални протеина, участващи в хроничното възпаление, сърдечна фиброза и ремоделиране при хронична сърдечна недостатъчност (СН) и да установим дали тези протеини или комбинирани панели могат да бъдат маркери за отговор към CRT. Набрахме 81 пациента (69 ± 10.11 години) със СН, лекувани със CRT, както и контролна група от 20 здрави лица (61 ± 12 години). Определихме с ELISA метод серумните нива на човешки TNF-α, IL-4, IL-13, FGF-basic и Periostin преди имплантация на CRT и на шести месец от проследяването. Отговорът към CRT беше определен като най-малко 5% покачване на изходната фракция на изтласкване плюс подобрение от поне един функционален клас според NYHA. На

изходно ниво, пациентите, имат сравними серумни нива на TNF- $\alpha$ , IL-4 и IL-13 и повишени серумни периостин и FGF-basic, спрямо контролната група. По отношение на отговора на CRT, базовите серумни нива на Periostin са повишени при 20 пациента с непараметрично разпределение: 1348 [771-2326] pg/mL срещу 1396 [916-2313] pg/mL при проследяване, без сигнификантна разлика между респондери и нереспондери. Установихме три пъти по-висока вероятност пациенти с повишени нива на Periostin да бъдат нереспондери (екзактен тест на Фишер  $p = 0,088$ , OR = 3,06). Серумният FGF basicбешенесигнификантно повишен при 22 пациента: 6,375 [1-482] pg/mL срещу 4,3 [0,9-497,35] pg/mL на шести месец. В търсене на комбиниран панел от биомаркери, предсказващ отговора към CRT, открихме, че "двойно положителните" пациенти за повишени нива на Periostin и FGF-basic имат девет пъти по-голяма вероятност да бъдат нереспондери (екзактен тест на Фишер,  $p = 0,12$ , OR = 9,1). Комбинираният серумен панел на Periostin и FGF-basic при пациенти със СН може да предскаже типа отговор към CRT. Необходимо е по-нататъшно изследване на този панел от биомаркери при голяма кохорта, за да се утвърди този панел като надежден предиктор за отговор към CRT. Предстои да бъде установена и ролята на Periostin и FGF-basic в сърдечното ремоделиране. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

### **Договор 119/2019    Хибридни методи за лечение на многоетажните атеросклеротични лезии на долните крайници**

**Изследователски екип:** Доц. Валентин Стефанов Говедарски, дм

- Гл. ас Светослав Димитров
- Гл. ас Борислав Ацев
- Ас. Пейо Живков

**Базова организация:** Катедра по сърдечно-съдова хирургия и инвазивна кардиология, бул. П Славейков, 52А, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящия проект бе да се проучат хибридните методи за ревакуларизация на многоетажните атеросклеротичните лезии на артериите на долните крайници. За период от 10 месеца (май 2019-февруари 2020) в Клиниката по съдова и ендоваскуларна хирургия на УМБАЛ „Света Екатерина“ – София бе проведено проспективно проучване върху 60 болни с периферна артериална болест (ПАБ) и многоетажност на атеросклеротичния процес, диагностицирани и лекувани чрез хибридни методи (едноетапно извършване на хирургични и ендоваскуларни техники) за ревакуларизация. Анализирани бяха рисковите фактори, вида на лезиите, използваните методи и ефекта от лечението. Резултатът от процедурата бе оценен технически (ангиографски), хемодинамично (чрез изследване на стъпално-брахиалния индекс - АВИ) и клинично. Пациентите бяха проследени до 30<sup>-ия</sup> ден от процедурата. Регистрира се разнороден коморбидитет и висок дял на рисковите фактори за атеросклероза/ПАБ: АХ – 93,3%, дислипидемия – 56,7%, захарен диабет – 43,3%, ИБС – 33,3% и ХБН – 15%. В над 1/3 от случаите атеросклерозата има мултифокален характер с каротидна (26,7%) и коронарна (11,7%) патология. 55% от болните са с предходна ревакуларизация на крайниците, а 66,7% – с двустранни лезии. Най-използваната хирургична техника бе тромбendarтеректомията в аорто-илио-феморалния и феморо-поплитеалния сегмент (с по 58,3%), а най-използваната ендоваскуларна – ангиопластиката във феморо-поплитеалния



сегмент (38,3%). Най-често хирургични интервенции бяха извършвани при лезиите с дължина >20 cm, а ендоваскуларни – при 4-10 cm. Регистрира се 100% технически и 96,7% хемодинамичен успех. Следоперативно бяха диагностицирани 3(5%) усложнения – реваскуларизационен оток при 2(3,3%) пациенти и хематом – в 1(1,7%). На 1<sup>-вия</sup> месец постпроцедурно в 31,7% от случаите се установи персистиране на клаудикацията, но и увеличаване му в метри; в 46,7% - парестезии в крайника и в 11,7% - постоперативен оток. 17 (28,3%) от случаите бяха без компликации. Хибридните процедури осигуряват ефективно лечение на многоетажните атеросклеротични лезии на долните крайници, позволявайки едноетапната пълна реваскуларизация. Те са особено подходящи при полиморбидни болни с висок риск при провеждане на конвенционална хирургия.

**Научни публикации и прояви:**

- Говедарски В, Димитров С, Ацев Б, и др. Хибридни методи за лечение на многоетажните атеросклеротични лезии на долните крайници. *Ангиология и Съдова хирургия* 2020;1:28.

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

**Договор 94/2018      Анализ и оценка на професионалния психо-социален стрес и на сърдечно-съдовия риск при работещи в значими и рискови сфери от общественно-политическия живот****Изследователски екип:** Доц. д-р Ружа Иванова Николова, дм

- Проф. Невена Цачева-Христова, дмн
- Проф. Каролина Любомирова, дм
- Доц. Тодор Кундуржиев, дм
- Доц. Янка Проданова, дм
- Доц. Милена Янчева-Стойчева, дм
- Доц. Ива Митева, дм
- Гл. ас. Лидия Христова, дм
- Гл. ас. д-р Милена Табанска-Петкова, дм
- Ас. д-р Марина Самунева - Желябова, дм
- Мартина Худякова, дм – СТМ „Активa 1“ ООД
- Ивайла Георгиева –докторант
- Цонка Иванова –докторант

**Базова организация:** Катедра по Трудова медицина, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на изследването бе проучване на етилогичната роля на професионалния психо-социален стрес и неговата връзка и зависимост с вегетативната сърдечно-съдова регулация и сърдечно-съдовите рискови фактори при работещи в значими и рискови сфери от общественно-политическия живот с оглед осъществяване на скрининг на механизми, медиращи и обуславящи патогенезата на ССЗ и тяхното ранно детерминиране. Изследвани бяха лица, работещи в рискови сфери от общественно-политическия живот: лекари, медицински сестри, военен персонал, служители. Бяха използвани следните методики: Изследване на функционалното състояние на Сърдечно-Съдовата Система и вегетативната сърдечно-съдова регулация, чрез компютърен диагностичен метод и система за Анализ на Сърдечната Вариативност; Физикално сфигмоманометрично изследване на артериалното систолично и диастолично налягане; Методика на NIOSH за оценка на психо-социалния стрес; Медицинска анамнеза за сърдечно-съдови рискови фактори. Осъществен бе трудово-физиологичен скрининг на рискови фактори при изследваните групи лица: психо-социални, професионални и сърдечно-съдови фактори. Скринингът на физиологични механизми, които обуславят генезата на ранни форми на ССЗ показва, че персистиращото въздействие на професионални и психо-социални стресори индуцира процес на дис-функционална сърдечно-съдова регулация. Стресът при лекарите, медицинските сестри и служителите индуцира процес на реципрочно съчетана инхибиция на парасимпатиковия дял и активация на симпатиковия дял на ВНС, а при военния персонал стресът предизвиква процес на ко-активация на парасимпатиковия и симпатиков дялове на ВНС. В допълнение констатирахме още три главни функционални модела индуциращи ССЗ: индиректно въздействие на професионалния стрес върху сърдечно-съдовите рискови фактори;

въздействие на професионалния стрес върху индуцирането на дис-функционална регулация; влияние на идентифицираните сърдечно-съдови рискови фактори върху стрес-индуцираната и тригерирана свръхреактивност на симпатиковия дял и инхибиция на парасимпатиковия дял на ВНС. Изяснена бе етиологичната роля на професионалния психо-социален стрес при индуциране на ранни форми на ССЗ. Паралелно с главните физиологични механизми се включват и други важни като нарушение на барорефлексионната сензитивност, липидния метаболизъм, терморегулаторната активност, активността на системата ренин-ангиотензин-алдостерон, реакцията на артериалното налягане, които способстват за инициране на ранни латентни форми на ССЗ.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Николова Р, Цачева Н. Характеристика и въздействие на работното натоварване в лекарската професия. *Обща медицина*, 2020
- Nikolova R, Tzacheva NK. Allostatic Stress Load - Modulator of the Functional Association between Autonomic Cardiovascular Control and Serum Lipids in Normal Weight and Overweight. *Psychol Behav Sci Int J*. 2019;12(5):1-5.
- Nikolova R, Tzacheva N. The Effect of Cardiovascular Risk Factors on Metabolic Syndrome and Risk of Cardiovascular Diseases. *Psychol Behav Sci Int J* 2019;12(5):6-11.
- Николова Р. Стрес, вегетативна сърдечно-съдова регулация и сърдечно-съдов риск при високо-рискови професии. Факултет по Обществено здраве, София, 2019
- Николова Р, Цачева Н, Кундуржиев Т, и др. Конструктивна и първична профилактика с изследване и детерминиране на вегетативната сърдечно-съдова регулация – механизъм за идентификация на ранни асимптоматични форми на Сърдечно-Съдови Заболявания. Деонтологични проблеми в медицинската практика. Пета Научно-практическа конференция на БЛС. Несебър. 24-26 Октомври 2019.

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

#### **Договор 95/2018      Пилотно събиране на данни и първоначален опит за внедряване на Европейската база данни за травматизма в България**

**Изследователски екип:** Доц. Петя Димитрова Трендафилова – Ванчева, дм

- Проф. Антония Янакиева, дм
- Ас. Николета Левенти
- Ас. Кремена Иванова
- Ас. Светлин Георгиев
- Доц. Стефан Великов, дт
- Ас. Стаматийос Прифтис

**Базова организация:** Катедра „Здравни грижи“, Ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване е да се съберат данни за травматизма в България и обстоятелствата, в резултат на които са възникнали нараняванията, които да бъдат съпоставими с данните, събрани от други страни в ЕС. Събрани са ретроспективно данните за травматизма пилотно в двата най-големи спешни центъра в столицата и страната: УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“ ЕАД за периода 01.01.2013 г. – 15.10.2018 г. и УМБАЛ „Света Анна“ – София АД – събрани са всички данни за травматизма с фатален и

нефатален изход за цялата 2017 г. (за периода 01.01.2017-01.01.2018 г.). Използван е унифициран набор от елементи – т.нар. IDB-FDS Data Dictionary, който е специално създаден, за да записва данни за наранявания в клиниките за спешна медицинска помощ с ниво на детайлност, което е най-малкото възможно да се събере в болници с особен интерес към изследване на травми и предотвратяване на наранявания. Резултатите показват, че през 2017 г. във УМБАЛ „Света Анна“ – София АД са хоспитализирани за лечение 3823 пациенти + 142 починали пациенти (общо 3965 в абсолютен брой) за същата година. За сравнение в най-големия спешен център в страната за 2017 г. са хоспитализирани 17886 пациенти или приблизително 4,51 пъти повече пациенти. По отношение характера на смъртността за анализирания период и за конкретното лечебно заведение с най-висока смъртност се очертават Вътречерепните травми, Травмите на главата, както и Травми на тазобедрената става и долен крайник, от тях Счупванията. Анализирани бяха данните за травматизма – с оглед значимостта на темата и последиците от възникване на травматизма, неговия мащаб, характер и специфика. Изготвен беше профил на травматизма в България, който до голяма степен има превантивна и профилактична стойност, проследявайки закономерности и тенденции.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Трендафилова П, Кундурджиев Т, Прифтис С. Разпространение на травматизма в детска възраст. Сестринско дело. 2019.
- Трендафилова П, Кундурджиев Т. Травматизмът като причина за болнично лечение. Здравни грижи. 2019: 4.
- Трендафилова П. Видове травматизъм при пациенти, приети за болнично лечение. Сестринско дело. 2019.
- P Trendafilova, A Velkova, Working towards more effective policy approach about road safety in Bulgaria, European Journal of Public Health 2018;28(suppl 4)
- Трендафилова П, Прифтис С, Янакиева А. Пилотно събиране на данни за травматизма в България. Трета национална конференция на Българското Научно Дружество по Обществено Здраве „Общественото здраве капиталът на бъдещето“. Пловдив, 30 май – 01 юни 2019 г.
- Трендафилова П, Левенти Н, Янакиева А. Пътно-транспортните произшествия: Необходимост от непрекъснато наблюдение и превенция. Втора национална конференция на Българското Научно Дружество по Обществено Здраве „Общественото здраве – глобален приоритет в науката и практиката“, Стара Загора, 14-15 юни 2018 г.
- Trendafilova P, Velkova A. Working towards More Effective Policy Approach about Road Safety in Bulgaria. 11th Eur Public Health Conference ‘Winds of Change: towards new ways of improving public health in Europe’. 28 November - 1 Dec 2018, Ljubljana, Slovenia.

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

#### **Договор 96/2018 Изработване на нови дигитални материали за обучение по биоетика в българските детски градини и училища**

Изследователски екип: Проф. Антония Йорданова Янакиева, дм

- Проф. Красимира Маркова, дм

- Доц. Александрина Воденичарова, дм
- Доц. Кристина Попова, дм
- Проф. Мариела Янева - Деливерска, дмн
- Гл. ас. Антония Трендафилова, дм
- Ас. Светлин Георгиев, дм
- Гл. ас. Ани Митева, дп
- Доц. Ива Митева, дм
- Доц. Ванина Алакиди, дм
- Ас. Влайко Воденичаров, дм
- Гл. ас. Тодор Димитров, дм

**Базова организация:** Катедра по Оценка на здравните технологии, ул. Бяло море 8, София 1427

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е да разработи дигитални обучителни материали за деца между 3 и 5 годишна възраст и казуси, съобразени с националната култура, порядки и бит, за деца в предучилищна и училищна възраст. Използваните методи включват педагогически методи, интервю и наблюдение, както и документален метод. В рамките на този проект се проведеха срещи с учители от Детски градини и училища, на които се обсъждаха методологията и разработката на казуси по биоетика за различните възрастови групи. Срещата бе проведена със Зам-министъра на образованието и науката г-жа Деница Сачева, както и с г-жа Ваня Кастрева-Монова, Директор на регионално управление на образованието – София – град. В рамките на проекта се изработиха три кратки филмчета за деца между 3 и 5 годишна възраст и ръководство с казуси, съобразени с националната култура, порядки и бит, за деца в предучилищна и училищна възраст. Разработена е лекционна програма за обучение на учители и възпитатели на деца и ученици в детските градини и училища. Образованието по биоетика способства повишаването на чувството на отговорност и съпричастност в децата. Въвеждането като задължително обучение по биоетика ще се отрази върху разширяването и обогатяването на знанията на учениците в България положително и те ще успеят на изградят по-добра ценностна система. Програмата по биоетика за обучение на учители се основава на проблем-базираното обучение, доказало десетилетия наред своите предимства. Умения за самостоятелно обучение, работа в екип, йерархизиране на мисленето, решаване на проблеми, самоувереност и учене през целия живот са само част от преимуществата и задълбочените познания, които децата придобиват в ранна възраст. Също така децата се научават да трансферират всички тези умения при решаване на професионални и лични проблемни ситуации. Решаването на казуси изисква, критично и аналитично мислене, включително гъвкавост при търсене на повече алтернативи за намиране на по-добри решения на етични и морални проблеми.

**Научни публикации и прояви:**

- Yanakieva A, Vodenitcharova A, Popova K: Implementing of Education In Bioethics at Contemporary Schools in Bulgaria, UNESCO Chair in Bioethics 13th Worlds Conference Bioethics, Medical ethics and Health Law, November 27-29, 2018, Jerusalem, Israel

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

## **Договор 97/2018 Проучване на личната отговорност за здравето сред лекари и специалисти по здравни грижи в болнични лечебни заведения**

**Изследователски екип:** Доц. д-р Наталия Михайлова Щерева-Николова, дм

- Проф. Магдалена Александрова, дм
- Гл. ас. д-р Радка Горанова, дм
- Гл. ас. Нели Градинарова, дм
- Гл. ас. Емилия Насева, дм
- Тихомира Петрова, студентка

**Базова организация:** Катедра „Медицинска етика и право“, Ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Личната отговорност за здравето е осъзнаването, че всеки индивид има не само права, но и на задължения към своето собствено здравословно състояние. Здравето на медицинските служители влияе върху тях самите, техните семейства, професионалните им задължения и грижата за пациентите. Целта на настоящото изследване е да се проучи личната отговорност за здравето сред 518 болнични здравни служители и да се разработят методични препоръки и указания, чрез които да се подобри тяхното собствено здравословно състояние. Методика: Проведено е пряко, анонимно, анкетно проучване с работещи в болнични лечебни заведения със специално разработен за целта въпросник. Извадката включва: практикуващи лекари (n=257) и специалисти по здравни грижи (n=261), които работят в седем болнични лечебни заведения, разделени на четири групи: по пол и по професионално направление. Използвани са документален, социологически и математико-статистически методи. 22,1% от всички анкетираните не посещават личния си лекар изобщо, 15,6% не ходят на профилактика и 11,8 % не правят профилактични изследвания. 73,9% от анкетираните са убедени в зависимостта между стила на живот и здравето. 56,7% от анкетираните посочват, че в последната година са *боледували*, като едва 23,5% са ползвали *болничен*. „Добро“ здравословно състояние имат 45.5% от анкетираните. 36,4% от анкетираните свързват личната отговорност за здравето със здравословен начин на живот, 31,6% - със здравната система. Най-голям е относителният дял на отговорилите (77,7%), според които отговорността за здравето трябва да е споделена между държавата и хората. От направеното проучване по проблема се установи, че често здравните работници пренебрегват своето физическо, емоционално и социално състояние, което се свързва с естеството им на работа. Здравословният стил на живот трябва да бъде припознат и утвърден като здравна потребност и това би било полезна инвестиция за здравната система. По-доброто разбиране на аргументите, свързани с личната отговорност, са важен аспект при оценка на политиката, насочена да посрещне предизвикателствата на съвременното здравеопазване.

### **Научни публикации и прояви:**

- Щерева-Николова, Наталия М, Горанова-Спасова Р, и др., Самооценка на здравословното състояние на лекари и специалисти по здравни грижи, сп. Трудова медицина и работоспособност, брой 1/ 2019 г., ISSN: 2534-9481
- Shtereva-Nikolova N, R Goranova-Spasova, E Naseva, et al., Physicians' And Healthcare Specialists' Behavior Towards Their Own Health, J of IMAB. 2018, Oct-Dec;24(4):2241-2244,
- Щерева-Николова Н, Горанова-Спасова Р, Нинова М. Рискови поведенчески фактори сред медицинския персонал в болнични лечебни заведения, в 42-ра научно-технологична сесия Контакт 2018, Изд. Темпо, С., 2018, с. 216-222

- Щерева-Николова Н, Горанова-Спасова Р, Градинарова Н, и др., Лична отговорност за здравето – същност, аргументи „за“ и „против“ и фактори на влияние, сп. Здравна политика и мениджмънт, 2018, том 18, № 3, стр. 39-41
- Щерева-Николова Н. Методични препоръки и указания за подобряване здравето на медицинския персонал, Печат: ИД Принт, София
- Горанова-Спасова Р. Информационна брошура „Моето здраве е важно за мен!“
- Щерева-Николова Н, Горанова-Спасова Р, Нинова М. Рискови поведенчески фактори сред медицинския персонал в болнични лечебни заведения, в 42 научно-технологична сесия Контакт 2018, гр. София, 26.10.2018
- Щерева-Николова Н, Горанова-Спасова Р, Насева Е, и др., Самооценка на здравословното състояние на лекари и специалисти по здравни грижи, в Първи конгрес по трудова медицина и експертиза на работоспособността с международна конференция по проект Епсилон гр. София, НДК, зала 6, 07–08 ноември 2018

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

**Договор 98/2018      Подобряване достъпа до етичните комисии чрез обучение на медицински специалисти и пациенти в лечебните заведения в страната**

**Изследователски екип:** Проф. Тихомира Златанова Златанова, дм

- Проф. Магдалена Александрова, дм
- Гл.ас. Нели Градинарова, дм
- Доц. Наталия Щерева-Николова, дм
- Гл.ас. Радка Горанова-Спасова, дм
- Гл.ас. Емилиян Радев, дм
- Калина Пейчева –докторант
- Геновева Бакърджиева- докторант
- Силвия Иванова, студент

**Базова организация:** Факултет по обществено здраве, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на разработения и изпълнен проект е да подобри информираността сред медицинските специалисти и пациенти в страната относно етичните комисии и в резултат да се създаде обективна предпоставка за по-ефективното им функциониране. При разработването на проекта бяха реализирани шест задачи, като при изпълнението им бяха използвани дидактически, социологически и математико-статистически метод.Посредством дидактически метод бяха разработени и отпечатани две информационни ръководства, едно насочено към медицински специалисти, а другото към пациенти.Обучителни семинари и анкетни проучвания бяха проведени в три лечебни заведения в страната. Анкетните проучвания по проекта бяха проведени в периода от 01.07.2018 до 01.09.2018г., като бяха анкетирани 213 медицински специалисти и 252 пациента.Над 80 % от анкетираните медицински специалисти и 78,8 % от анкетираните пациенти са на мнение, че съставянето и разпространяването на информационни ръководства относно съществуващите етични комисии е полезно. 33,8 % от медицинските специалисти и 23,8 % от пациентите са на мнение, че обучението на медицинските специалисти относно етичните комисии е наложително, 38,5 % от медицинските специалисти и 48 % от пациентите са на мнение, че допълнителното обучение би било много полезно както за медицинските специалисти, така и за самите етични комисии.

Анализирайки резултатите от проучването е видно, че въпреки проведената информационна кампания и подобрената информираност сред медицинските специалисти и пациентите в страната те остават слабо информирани относно съществуващите и функциониращи етични комисии. Забелязва се осъзнаване на проблема, по-голямата част от респондентите са на мнение, че допълнителната информация е не само необходимо, но и наложителна, но все още голям процент от анкетираните медицински специалисти и пациенти показват липса на инициативност и мотивация за участие в подобни допълнителни обучения. Необходимо е да се продължи провеждането на подобни информационни кампании на национално ниво. Повечето информация е гарант за доброто функциониране на етичните комисии, за по-голяма приемственост между самите членовете на комисииите, за облекчаване работата на медицинските специалисти и за по-добрата защита на пациентските права.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Етичните комисии в здравеопазването, Информационна брошура предназначена за пациенти, София 2018
- Етичните комисии в здравеопазването, Информационна брошура предназначена за медицински специалисти, София 2018
- Градинарова Н, Радев Е, Александрова М. Необходимост от промяна относно етичните комисии в лечебните заведения, „Интердисциплинарната идея в действие“ (сборник статии), под ред. на проф. Теодор Попов и проф. Нягол Манолов, Издателство ТЕМТО, 2018, стр. 263-267
- Gradinarova N, Radev E, Shtereva-Nikolova N. Medical Specialists and ethics committees in Healthcare Establishments in Bulgaria. J of IMAV. 2019 Jan-Mar;25(1):2447-2451.

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

#### **Договор 99/2018      Информираност и обучение на медицинските сестри и студентите от специалност „медицинска сестра” относно агресията и насилието в здравните грижи**

**Изследователски екип:** Проф. Галина Стамова Чанева, дм

**Членове на изследователския екип:**

- Проф. Антония Янакиева, дм
- Доц. Надка Василева, дм
- Доц. Антоанета Терзиева, дм
- Доц. Пепа Бикова-Иванова, дм
- Гл. ас. Петя Кантарева, дм
- Гл. ас. Стефка Георгиева-Гърбева, дм
- Ас. Светлин Георгиев
- Ас. Камелия Богданова
- Таня Попова
- Димитрина Йорданова
- Иванка Милотинова
- Ас. Анушка Димитрова



- Надя Манолова
- Ас. Милослава Илиева,
- Наси Георгиева, студент
- Евгения Изворска, студент
- Станислава Айдарова, студент
- Виргиния Василева, студент

**Базова организация:** Катедра „Здравни грижи“, ул. Бяло Море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Агресията често се случва в ситуации, когато нуждите на пациента не са напълно задоволени и възникнат гняв и чувство на неудовлетвореност. Възникването на агресия е свързано със сложното взаимодействие на вътрешноличностните и междуличностните фактори. Целта на изследването е да се проучи информираността на медицинските сестри от университетски болници и на студентите от специалност „медицинска сестра“ по отношение възникването на ситуации на агресия от страна на пациента и разработване на наръчник за професионално поведение на медицинските сестри за оценка на риска от агресия и насилие в здравните грижи. Проведено е анонимно анкетно проучване на 200 медицински сестри от четири университетски болници в гр. София и 150 студенти от ФОЗ на МУ – София – специалност „медицинска сестра“ през 2018 и 2019 г. Резултатите показват, че медицинските сестри и студентите са информирани относно понятието насилие и агресия, но имат потребност от обучение относно използването на стратегии за комуникация при проява на агресивно поведение от страна на пациента. Необходимо е въвеждането на процедури за оценка на риска от агресия и създаването на организация за професионално поведение на персонала. Според медицинските сестри и студентите пациентите проявяват по-скоро невербална агресия по време на извършване на назначените манипулации и изследвания. Водещ фактор за агресивното поведение на пациентите е болестния процес и разминаването между очакванията на пациента и болничната реалност. Експертите преценяват, че разработения наръчник за професионално поведение на медицинските сестри при агресивно поведение от страна на пациента е достатъчно информативен и конкретен за да може персонала да взема адекватни решения в подобни ситуации.

**Научни публикации и прояви:**

- Чанева Г, Бикова П, Богданова К. Компетенции на медицинските сестри за справяне с насилието и оценка на риска от агресивно поведение, сп. Здравни грижи, бр. 2/2019г. (под печат)
- Чанева Г, Георгиева Ст, Попова Т, и др. Потребности от обучение на медицинските сестри за справяне при ситуации на агресивно поведение. Сп. Сестринско дело 2019;2.
- Василева Н, Терзиева А, Благодеева Д, и др. Информираност на медицинските сестри и студенти по отношение на насилието и агресивното поведение, сп. Здраве и наука 2019;1.

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

**Договор 100/2018 Информираност и обучение на студенти от специалност „акушерка“ и акушерки за оценка на риска от възникване на постпартална депресия**  
Изследователски екип: Доц. Деляна Петрова Хаджиделева, дм

- Доц. Даниела Гавраилова, дм,
- Гл. ас. д-р Александра Трайковска-Димитрова, дм
- Ас. Таня Ангелова, дм
- Боряна Симеонова, дм
- Антоанета Димитрова
- Илиана Соколова
- Нино Колева, студент
- Деница Петкова, студент
- Виктория Каранешева, студент

**Базова организация:** Катедра "Здравни грижи", ул. Бяло Море' 8, София, 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Постпарталната депресия е социално значим и здравен проблем, често водещ до сериозно нарушение на качеството на живот, не само на майката, но и на семейството. Нелекуваните депресивни нарушения създават риск за повтарящо се заболяване и са свързани с дългосрочни когнитивни, емоционални и поведенчески проблеми у децата. Акушерките играят важна роля в поддържането както на физическото, така и на психическото здраве на бъдещите майки. В съвременните акушерски грижи се търсят методи и средства за ранно разпознаване симптомите на емоционалната нестабилност на родилката и превенция на постпарталната депресия. Целта на изследването е обучение на студенти от специалност „Акушерка“ и акушерки за ранно идентифициране на психосоциални и емоционални поведенчески проблеми при родилки, чрез провеждане на скринингов метод за оценка на риска от постпартална депресия и прилагане на адекватни целенасочени акушерски грижи. Проведено е анонимно анкетно проучване на 100 родилки в СБАЛАГ „Майчин дом“ – София, ПСАГБАЛ „Св. София“, П-ра САГБАЛ „Шейново“, 50 акушерки от родилните отделения в същите болници в София и 60 студенти от ФОЗ на МУ – София – специалност „Акушерка“ през 2018 и 2019 г. в периода от месец февруари 2018 – месец април 2019 г. Резултатите от проучването на родилките показват положителното влияние на психологическата им подготовка по време на бременността, като превенция на емоционалните и поведенчески разстройства в постпарталния период. Акушерките са на мнение, че акушерските грижи в пренаталния и постпарталния период са необходимо условие за ефективността на превенцията и имат позитивна нагласа към повишаване на професионалните си компетенции чрез курсове по следдипломно обучение за провеждане на скринингови програми за оценка на риска от възникване на постпартална депресия. Анализът при студентите показва, че проведеното обучение е довело до формиране на знания и умения за разпознаване и ранно идентифициране на симптомите на постпарталната депресия и прилагане на ефективни и адекватни грижи в бъдещата им практика.

**Научни публикации и прояви:**

- Хаджиделева Д, Димитрова А, Соколова И, и др., Връзка между психопрофилактиката по време на бременност и постпарталните поведенчески разстройства, В сб.: Втора научна конференция с международно участие „Здравето – предизвикателство пред професионалистите по здравни грижи“, Враца 29-30 ноември 2018

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

**Договор 101/2018 Проучване и управление на здравния риск от сенсibiliзация към релевантни дентални материали сред студенти по зъботехника от Медицински колеж „Йорданка Филаретова“ – МУ-София**

**Изследователски екип:** Доц. д-р Мая Григориевна Ляпина, дм

- Проф. Ангелина Киселова-Янева, дмн
- Проф. Каролина Любомирова, дм
- Доц. Мая Визева, дм
- Доц. Тодор Кундуржиев, дм
- Проф. Мариела Янева-Деливерска, дмн
- Гл. Ас. Спартак Янакиев, дм
- Доц. Йордан Деливерски - УНИБИТ, Катедра „Национална сигурност”
- Преп. Атанас Стоименов, дм

**Базова организация:** Медицински колеж „Й. Филаретова”, ул. Й. Филаретова 3, София 1606

**РЕЗУЛТАТИ:** Сенсibiliзацията към метали и метакрилатни мономери е значим проблем при професионална експозиция в зъботехническата практика. Цел на настоящето проучване бе да се оцени риска от сенсibiliзация към ингредиенти на релевантни дентални материали по време на обучението на студентите по зъботехника от Медицински колеж „Й. Филаретова” при МУ – София и да се изготви комплексна програма за управлението му. Извършено бе епикутанно алергологично тестване към подбрани алергени присъстващи в материалите, използваните при практическото обучение по зъботехника - метали и метакрилатни мономери. Обхванати бяха общо 150 лица: 38 студенти по зъботехника от първи, 40 – от втори и 38 – от трети курс; като контролна група изследвахме 34 студенти от други специалности, професионално неекспонирани на изследваните алергени. Чрез анкети бяха събрани анамнестични данни относно фамилна алергична предиспозиция и минали професионални експозиции на алергени. При статистическия анализ бяха използвани Fisher Exact Test ( $p < 0.05$ ) и хи-квадрат тест. В курса на практическото обучение по зъботехника се наблюдава ясна тенденция на повишаване на честотата на сенсibiliзация към никел (10.5% сред студентите от първи курс и 36.8% - сред тези от трети курс), кобалт (от 13.2% за първи курс до 39.5% за трети курс) и палადиев(II)хлорид (от 10.5% за първи курс до 26.3% за трети курс). За цялата изследвана популация, най-висока е честотата на положителни реакции към натриев тетрахло-ропаладат(II)хидрат - 30%, който е основният алерген сред студентите от 2-ри курс – 57.5%. Висока е и честотата на сенсibiliзация към повече от един метал, която е най-висока сред студентите по зъботехника от трети курс (78.9%). Като заключение се установи висок и нарастващ с продължителността на експозицията по време на практическото обучение риск от контактна сенсibiliзация към релевантните за студентите по зъботехника метали. 2. Като сенсibiliзатор с основно значение се идентифицира натриевия тетрахло-ро-паладат(II)хидрат, вероятно и поради по-високата чувствителност на този тест-антиген. 3. Разработен е наръчник с информация относно сенсibiliзирацията потенциал на използваните по време на практическото обучение на студентите по зъботехника материали, резултатите от проучването и комплексна програма за превенция. 4. Научните резултати от проучването може да послужат за теоретично обосноваване и практическо прилагане на адекватни превантивни мерки при професионална и непрофесионална експозиция на продукти, съдържащи проучваните от

нас агенти. Това ще осигури по-добра работна, медицинска и социално-икономическа прогноза и състояние на обективния здравен статус.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Ляпина М, Московска М, Костова-Камбурова Н, и др. Контактна сенсibiliзация към метакрилатни мономери сред студенти от специалност „Зъботехник“ – предварителни резултати. Шестнадесета юбилейна национална научна сесия за студенти и преподаватели, МУ – Плевен, 29-30 октомври 2018 г.
- Ляпина М, Кундурджиев Т, Любомирова К, и др. Контактна сенсibiliзация към съставки на дентални материали сред студенти по зъботехника от медицински колеж "Йорданка Филаретова" - предварителни резултати. Първи конгрес по трудова медицина и експертиза на работоспособността с международна конференция по проект ЕПСИЛОН, София, НДК, 07 – 08 ноември, 2018 г.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to methacrylic monomers among dental technician students in relation to duration of educational exposure. J of IMAV. 2019 Apr-Jun;25(2):2526-2531.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to metals among dental technician students in relation to the duration of educational exposure. 29th Annual Assembly of IMAV. Varna, Bulgaria. 9- 12 May 2019.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to methacrylic monomers among dental technician students in relation to duration of educational exposure. 29th Annual Assembly of IMAV. Varna, Bulgaria. 9- 12 May 2019.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K. Contact sensitization to metals among dental technician students in relation to duration of educational exposure. Journal of IMAV 2021;27(3):3835-41.

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

#### **Договор 102/2018 Изследване на възможностите за използване на изчислителна и комуникационна техника в обучение по здравни грижи във Филиал „Проф. д-р Иван Митев“ – Враца**

**Изследователски екип:** Проф. Ралица Златанова Златанова-Великова

- Доц. Павлинка Добрилова
- Доц. Стефан Великов
- Доц. Калина Стефанова
- Доц. Галя Янкова
- Мирослава Костадинова, студент

**Базова организация:** МУ - София, Филиал „Проф. д-р Иван Митев“, гр. Враца към МУ – София, Катедра „Здравни грижи“, бул. „Втори юни“ 179, Враца 3000

**РЕЗУЛТАТИ:** Мотивацията е основен фактор влияещ върху качеството на обучението. Използването на аналитични методи за определяне на мотивацията на обучаемите позволява едно обективно и основано на доказателства въздействие върху мотивацията чрез въвеждане на ИКТ в обучението по здравни грижи. Проучването е проведено през летния семестър на учебната 2017/2018 г. във Филиал „Проф. д-р Иван Митев“, гр. Враца към МУ - София. Предмет на проучването са възможностите на информационните и комуникационни технологии в обучението по здравни грижи. В проучването са обхванати

300 студенти от професионално направление „Здравни грижи“, като от тях 200 се обучават в специалност „медицинска сестра“, 70 са от специалност „акушерка“ и 30 студенти са от специалност „лекарски асистент“, обучаващи се във Филиал „Проф. д-р Иван Митев“ – Враца. Развитие на ИКТ, в обучението по здравни грижи е приоритетна стратегическа задача на преподавателите в това професионално направление. Значителен дял от студентите (85,3%), които имат потребност от ползване на електронно учебно съдържание по здравни грижи. При съществуваща потребност от електронно учебно съдържание по здравни грижи повече от половината от анкетираните студенти (54,4%) по време на обучението не са ползвали електронни учебни материали по здравни грижи, а 13,3% са ползвали, но на чужд език. За удовлетворяване потребността от електронно учебно съдържание по здравни грижи е необходимо създаване на екип от преподаватели за разработване на дидактически материали и тяхното въвеждане в платформа за самостоятелно обучение. Като резултат от изпълнение на проекта от екипа са подготвени: правила и техники за парантерално въвеждане на лекарствени вещества, като част от практическо ръководство за сестрински грижи“. Въвеждането на интерактивните методи за обучение чрез подобряване на материално техническата намалява ролята на преподавателя като ‘Инструктор’ за сметка на тази като „Фасилитатор“. В условията на информационно общество своевременната актуализация на знанията е от решаващо значение за професионалната реализация на личността.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Добрилова П, Янкова Г. Правила и техники за парантерално въвеждане на лекарствени вещества, в Добрилова П, Г Янкова, К Стефанова и др., Практическо ръководство за сестрински грижи“, Микроинвест ООД, 2018, ISBN 978-619-7335-05-7
- Dobrilova P, Yankova G, Zlatanova-Velikova R. The information and communication technologies – contemporary challenge for the education in health care. Int Sci Publications: Educational Alternatives, 2018;16:287-293;
- Yankova G, Dobrilova P, Stefanova K. Research of the students satisfaction from the quality of training in an affiliate „Prof. dr. I. Mitev” to Vratsa at medical university in Sofia, Int Sc Publications: Educational Alternatives, 2018;16:294-302;
- Stefanova K, Dobrilova P, Velikov S. Opportunities for implementation of information and communication technologies in the healthcare education, International Scientific Publications: Educational Alternatives, 2018;16:309-313
- Velikov St, Zlatanova-Velikova R, Dobrilova P. The Teachers Opinion About Introduction Interactive Methods in Training Of Medical Specialists, Journal Of Educational And Instructional Studies In The World, May 2018;(8 Issue 2):8-13
- Zlatanova-Velikova R, Velikov St, Dobrilova P. The interactive methods of training through the eyes of specialty "nurse" students, 52nd Days of preventive medicine, 25-28 Sep 2018, Niš, Serbia
- Velikov S, Zlatanova-Velikova R, Stefanova K. The interactivity and motivation for training, 52nd Days of preventive medicine, 25-28 Sep 2018, Niš, Serbia

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

**Договор 87/2019** Мотивация на родители за профилактика на оралните заболявания на техните деца чрез образователен сайт [www.dentalendom.bg](http://www.dentalendom.bg)

Изследователски екип: Проф. Росица Илиева Кабакчиева, дм

- Доц. Наталия Грънчарова, дм
- Ас. Ралица Боговска-Гигова

**Базова организация:** Катедра по детска дентална медицина, ул. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване бе да се оценят знанията, нагласите и практиките на майките на деца до 3 годишна възраст по отношение на оралното здраве за техните деца. По първа задача обект на изследване бяха 90 майки. Резултатите от анкетните карти показаха незадоволителни познания относно оралната хигиена, флуорната профилактика, рисковете които крие дългото нощно хранене. Резултатите ни показаха необходимостта да се популяризира идеята за създаване на Дентален дом. В България кариесът в ранна детска възраст все още е широко разпространен и представлява сериозен проблем за общественото здраве. Нужна е промоция на орално здраве и орално здравно обучение сред майките, както и национална превантивна програма, в която да бъдат въвлечени всички медицински специалисти около бременната и майката: медицински сестри, педиатри, акушер-гинеколози, лични лекари и дентални лекари. Тъй като забелязваме, че дигиталните технологии завземат ежедневието ни с изключително бързи темпове създадохме интернет сайт - удобен, бърз и лесен начин за промоция на орално здраве и да запознаем майките и бременните жени в България със задачите на Денталния дом, както и да ги обучим в основните грижи за малкото дете относно оралното му здраве и благополучие. Резултатите от анкетните карти по четвърта задача от майки, посетили и почерпили съвети и информация от нашия сайт, показаха, че познанията им по отношение на флуорната профилактика, рисковото дълго нощно хранене с шише с адаптирано мляко, грешки в храненето и оралната хигиена са се повишили. Добри резултати дават и нашите препоръки за предпазване от ранна трансмисия на кариесогенни микроорганизми от майката към бебето – с близо почти три пъти се е повишил броят и съответно процентът на майките, които внимават да не заразят своите деца с бактериите, причиняващи кариес в сравнение с контролната група майки по първа задача. Познанията на младите майки относно заболяването кариес на ранното детство също достоверно са се повишили след посещението на сайта на Денталния дом. Тези данни ни дават основания да смятаме, че подобрен тип програма за здравно образование е полезна и има нужда от непрекъснато разработване и популяризиране сред обществото.

**Научни публикации и прояви:**

- Bogovska-Gigova R, Kabakchieva R. Dental Home – centemporary concept for early primary oral prophylaxis of children up to 3 years old – review. Problems of dental medicine, 2019; 45(2):53-61.

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

**Договор 97/2019      Влияние на етичния аспект в мотивацията на медицинските специалисти за реализация в Република България**

**Изследователски екип:** Проф. Мариела Светославова Янева-Деливерска, дмн

- Доц. Евгени Иванов, дм
- Доц. Александрина Воденичарова, дм
- Доц. Десислава Тодорова, дм
- Проф. Цветомир Димитров, дм
- Доц. Цветелина Михайлова, дм
- Гл. ас. Нели Градинарова, дм
- Димитрина Йорданова - докторант
- Александрина Стоянова, студент

**Базова организация:** Факултет по обществено здраве, София 1527, ул. Бяло Море 8

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проекта е да се повиши мотивацията сред медицинските специалисти чрез акцентирание върху етичните аспекти на работата и в резултат да се създаде предпоставка за по-ефективното функциониране на лечебните заведения и за реализация на медицинските специалисти в Република България. Използваните изследователски методи са описателен методи, аналитичен метод, метод на дидактическо изследване, социологически метод, математико-статистически метод. Главните резултати са: 1. Разработване и публикуване на ръководство на тема „Етични и психологически аспекти в професионалната практика на медицинските специалисти”; 2. Проведени са обучителни семинари относно етичните аспекти на колективната дейност и мотивацията за работа в 4 лечебни заведения в България. 3. Проведена е пряка индивидуална анкета на медицински специалисти в 4 лечебни заведения в страната; 4. Направеният анализ на получените резултати са представени на международна и национална конференция, както и в публикации в периодични медицински научни издания в България. Броят на персонала зависи от факторите, които повлияват избора на лечебно заведение за работа, удовлетворението от работата и решението за напускането му, като мотивацията на медицинските специалисти влияе и в трите случая. Над половината от анкетиранияте – 53,3% са съгласни да се увеличи настоящия обем на работа при увеличаване на заплащането и на второ място 34,9% „Намаляване на обема на настоящата работа при настоящето заплащане”, с което изследването посочва варианти за оптимизиране на работата в лечебните заведения. Проучването установява, че организационните и етичните аспекти на работата, които са функция на ръководните длъжности, са важни мотиватори за персонала на лечебните заведения. Въз основа на реализираният проект може да бъде направено заключение, че съществува необходимост от въвеждане на етични правила на поведение като част от ценностните стандарти, в контекста на правата и задълженията на медицинските специалисти.

**Научни публикации и прояви:**

- Воденичарова А, Градинарова Н, Деливерска М. Ролята на етичните стандарти като фактор за по-добра мотивация сред медицинските професионалисти. Сп. Обща медицина, бр.4/2020
- Тодорова Д, Михайлова Ц, Иванов Е. Аспекти на мотивацията на персонала за работа в лечебните заведения за болнична помощ. Сп. Medical magazine, 2020

- Михайлова Ц, Иванов Е, Тодорова Д, и др. Етични и психологически аспекти в професионалната практика на медицинските специалисти. Учебно ръководство. Авангард Прима, София, 2019,71
- Mihaylova T, Ivanov E, Todorova D. Opportunities To Increase The Motivation Of Health Professionals Through Training. Multidisciplinary J Science, Education & Art. USB-Blagoevgrad, 2019, 427-435.
- Todorova D, Mihaylova T, Ivanov E. Influence of ethical aspect on the motivation of medical professionals to work in the Republic of Bulgaria. 53rd International Medical Conference „Progress in Medical Practice and Education in the Changing World”, 10-13.08.2019, London.

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

### **Договор 98/2019      Информираност и обучение на родители с деца в кърмаческа възраст**

**Изследователски екип:** Доц. Пепа Бикова-Иванова, дм

- Проф. Галина Чанева, дм
- Проф. Силвия Младенова, дм
- Доц. Деляна Хаджиделева, дм
- Гл.ас. Нели Градинарова, дм
- Гл.ас. Петя Кантарева, дм
- Ас. Камелия Богданова, дм
- Димитрина Благоева, докторант
- Тая Попова, докторант
- Илиана Соколова
- Иванка Милотинова
- Маргарита Станоева
- Ангелина Соколова, студент
- Ася Демирева, студент
- Полина Георгиева, студент
- Мелани Волева, студент
- Силвия Кръстева, студент

**Базова организация:** ФОЗ, Катедра „Здравни грижи“, ул. Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проведеното изследване е да се установи информираността на родителите на деца в кърмаческа възраст по отношение на физическото и нервно-психическото развитие и да се разработи обучение насочено към хигиенните грижи, храненето /кърменето/, физическото и нервно-психическото развитие на кърмачето. Чрез използване на социологически метод се проведе анкетно проучване включващо 112 родители на деца в кърмаческа възраст за информираността им и знанията им относно физическото развитие и активност, нервно-психическото развитие, хигиенните грижи, кърменето, храненето, права на детето и отговорностите на семейството. Изследвани са нагласите на 60 родилки за нагласите им относно имунопрофилактиката. Проблемите при кърмене, подготовката, знанията получени пренатално и в първите часове след раждане за ефективно кърмене са изследвани при 682 жени в родилно отделение. Проведено е



експериментално обучение на 50 родители на деца в кърмаческия период, като за целта е подготвен учебен материал на основата на разработените в страната „Стандарти за развитие и учене в ранното детство:от раждането до три години“ и ръководство за самостоятелна подготовка на родителите. На участниците са предоставени помощни материали на книжен, електронен носител и професионални съвети, като всички посочват че са напълно удовлетворени от проведеното теоретично и практическо обучение. Високо са оценени симулационните игри и практическото обучение с мулажи. Данните от анкетното проучване показват, че преобладаващата част на майките, включени в проучването са на възраст от 20 до 30 години, а значителна част бащите са на възраст от 31 до 40 години. По-висок относителен дял имат семействата с едно дете (60,66%). Родителите имат необходимост от целенасочено обучение за получаване на повече знания и изграждане на практически умения за подпомагане на физическото и нервно-психическото развитие на кърмачето. Значителна част от участниците в изследването предпочитат личен контакт със специалист за да получат подкрепа и обучение при отглеждане на кърмачето. Информираността и подготовката на родителите е определяща за подпомагане на развитието на детето в кърмаческия период.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Бикова П, Младенова С, Градинарова Н и др. Потребности от обучение на родителите на деца в кърмаческа възраст. Здравни грижи, 2020;2
- Чанева Г, Бикова П, Богданова К, и др. Информираност на родители на деца в кърмаческа възраст относно физическото развитие и двигателната активност. Сестринско дело, 2020; 2
- Хаджиделева Д, Чанева Г, Соколова И и др. Хранене на детето в кърмаческа възраст - информираност и подготовка на родителите. Сестринско дело, 2020; 2
- Хаджиделева Д, Соколова И, Станоева М и др. Здравната култура на майките-условие за провеждане на имунопрофилактика при кърмачето. Управление и образование, 2019; 15(5):79-83
- Бикова П, Демирева А, Соколова А. Нуждата от обучение по кърмене по време на, и след бременността. Управление и образование, 2019; 15(5):214-219
- Хаджиделева Д, Соколова И, Станоева М, и др. Здравната култура на майките-условие за провеждане на имунопрофилактика при кърмачето. Международна научна конференция „Образование, наука, икономика и технологии“ гр. Бургас, 20-22 юни 2019
- Бикова П, Демирева А, Соколова А. Нуждата от обучение по кърмене по време на, и след бременността. Международна научна конференция „Образование, наука, икономика и технологии“ гр. Бургас, 20-22 юни 2019

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

## КОНКУРС „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ“

### МЕДИКО-БИОЛОГИЧНА ОБЛАСТ „МЛАД ИЗСЛЕДОВАТЕЛ’ 2018“

#### **Договор 116/2018 Молекулярно-генетични техники за диагностика на метаболитни заболявания-предимства и недостатъци**

**Докторант:** Славена Христова Атемин

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дбн и Проф. Албена Тодорова-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 метаболитните заболявания, 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 метаболитно заболяване. В допълнение беше подбран диагностичен алгоритъм за филтруване и интерпретация на данни от секвениране от но-во поколение. Настоящото проучване показва предимствата и недостатъците на всяка една от използваните методики, а именно секвениране по Sanger, секвениране от ново поколение и MLPA анализ. Беше верифицирана генетичната причина за метаболитните заболявания при 8 от 10 изследвани пациента (80%). Посредством секвениране по Sanger се потвърди поставената диагноза при 6 пациента. При един от пациентите с предполагаема диагноза болест на Wolman не бяха доказани патологични варианти в *LIPA* гена, които да обяснят симптоматиката. Чрез секвениране от ново поколение се изясни генетичната причина за настъпилото метаболитно нарушение при двама пациенти. Чрез MLPA анализ не бяха установени големи делеции/дупликации по дължината на гена *CYP21A2*. На база на получените резултати и използваните методики беше съставен алгоритъм за бърза и навременна диагностика на метаболитните заболявания. Своевременното генетично диагностициране на метаболитното заболяване при засегнатите пациенти ще подпомогне избора на подходящо и успешно лечение и правилна медико-генетична консултация в семействата.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Атемин С, Тодоров Т, Ангелова Л и др. Синдром на Zellweger – генетична хетерогенност на българската популация. Трети Докторантски Симпозиум, Молекулярна биология – от молекулите до клетките и обратно, София 7-8 Март 2019; стр.32-33.
- Ateamin S, Todorov T, Ivanova M et al. First genetically proven Arginase deficiency case of Bulgarian Roma origin due to a novel pathogenic splice site variant in the *ARG1* gene. European Conference of Human Genetics 2019, Gothenburg, Sweden, June 15-18, 2019

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 117/2018 Молекулярно-генетична диагностика на скелетни дисплазии и колагенози**

**Докторант:** Михаела Бойкова Младенова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дбн и Проф. Албена Тодорова - Георгиева, дбн

**Базова организация:** К-ра „Медицинска химия и биохимия“, бул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Бяха въведени и оптимизирани методи за диагностика на гени, свързани със скелетни дисплазии и заболявания свързани с нарушения в съединителната тъкан. Разработеният молекулярно-генетичен подход беше приложен за изследване на 13 пациента. Беше оптимизиран протокол за амплификация и секвениране на прицелните гени, както и NGS. На базата на предварително проведените клинични изследвания тези 13 пациента бяха разпределени в 2 групи: пациенти със скелетна дисплазия и пациенти със заболявания свързани с нарушения в съединителната тъкан. Настоящата научна разработка беше фокусирана върху изясняване на молекулните дефекти в гените *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL11A1* и изследване на копийни варианти в генома. За мутации в *FGFR3* гена са изследвани 10 пациента. Бяха открити точкови мутации при 3 пациента (5/10=50%): 3-ма с ахондроплазия и 2-ма с хипохондроплазия. За синдроми свързани с *COL11A1/COL2A1* гени бяха анализирани 2 пациента и беше открита нова не публикувана мутация с.3474 + 1G> A в интрон 44 в *COL11A1*. NGS анализът беше проведен при 1 пациент и беше открита Xq23 микроделеция. При 8 от 13 пациента (61%) беше изяснена на молекулно ниво поставената клинични диагнози.

**Научни публикации и прояви:**

- Mladenova M, Todorov T, Grozdanova I, et al. Novel mutation in *COL11A1* gene causing Marshall-Stickler syndrome in three generations Bulgarian family. The European Society of Human Genetics (ESHG), Jun 16-19, 2018 Milano, Italy

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 118/2018 Оптимизиране на молекулярно-генетични методи за идентификация на специфични микроРНКи в невро-онкологията и оценка ролята на вирусната компонента**

**Докторант:** Емилия Красиминова Николова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн

**Базова организация:** Катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Мозъчните тумори са сред най-агресивните и с висок леталитет ракови заболявания, при които дори след прилагането на актуалните методи за лечение, продължителността на живот на пациентите рядко надвишава 2 години. Целта на настоящия научен проект е оптимизиране на платформа за експресионно профилиране и анализ ролята на селектирани микроРНКи в първични и вторични мозъчни тумори. Некодиращите РНКи, като микроРНКите не се транслират до белтъци, а регулират генната експресия, свързвайки се към комплементарни секвенции на иРНКи, потискайки синтезата на протеини. Успоредно, беше оценено присъствието на активна инфекция с Човешки Цитомегаловирус (HCMV). МикроРНКите са анализирани чрез платформа, състояща се от колонно-базирана РНК екстракция, синтез на копиДНК чрез обратна транскрипция и Taqman метод за експресионно профилиране на селектираните таргетни и контролни микроРНКи. Методите, използвани за вирусна детекция са изолиране на ДНК с комерсиален кит, PCR амплификация и отчитане на получените продукти с агарозна гел електрофореза. МикроРНК-21 и микроРНК-10 бяха свързани експресирани в мозъчни тумори в сравнение с контролите. Микро-21 притежава антиапоптозна активност при глиобластоми и регулира туморсупресорни гени и гени, свързани с туморната инфилтрация и ангиогенеза. МикроРНК-10 участва в туморната инвазия и се проучва като терапевтичен таргет, поради завишената експресия във всички глиомни подвидове. Разпространението на активна инфекция на HCMV е 10% сред анализирани български пациенти. Нито една от контролите не позитивира за CMV. Позитивният пациент беше с рецидивирал Мултиформен глиобластом - GBM. Реактивацията на вируса вероятно се дължи на имunosупресия от медикаментите, прилагани по време на хоспитализацията. Мозъчните тумори са заболяване, характеризиращо се с висока хетерогенност и множество хромозомни аберации. Новите методи за идентификация на диагностични и прогностични биомаркери, като микроРНКите и оценката на инфекциозния вирусен статус, могат да доведат в подобряване хода и лечението на този вид рак.

**Научни публикации и прояви:**

- Николова Е, Митев В, Тодорова-Георгиева А. Роля на микроРНКите при Мултиформен Глиобластом, 3<sup>ти</sup> докторантски симпозиум, Молекулярна биология – от молекулите до клетките и обратно ИМБ, БАН, София, България, 07-08.03.2019
- Николова Е, Фердинандов Д, Димова П и др. Разпространение на Човешки цитомегаловирус сред български пациенти с мозъчни тумори. ESHG, Гьотеборг, Швеция, 15-18.06. 2019

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 119/2018 Спермалният инфекциозен статус като фактор за репродуктивни проблеми**

**Докторант:** Кремена Стойчева Месечкова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дбн и Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн

**Базова организация:** Катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София

**РЕЗУЛТАТИ:** Съществен фактор за възникването на идиопатични репродуктивни проблеми са полово предаваните инфекции на мъжкия генитален тракт. Вътреклетъчните спермални патогени, като хламидия (*C.trachomatis*), цитомегаловирус (CMV) и херпес симплекс вирус (HSV), могат да променят концентрацията, подвижността, жизнеността и морфологията на сперматозоидите, което понижава успеваемостта на естествената и асистираната репродукция. Целта на настоящото научно изследване е установяване наличието на тези патогени при пациенти с доказано компрометиран спермален статус във връзка с възникването на репродуктивни проблеми. С помощта на PCR анализ изследвахме 140 пациента с репродуктивни неуспехи, от които 120 с установени спермални нарушения и 20 с нормални спермални параметри, за установяване наличието на *C.trachomatis*, HSV и CMV. При 2.5% (3/120) от пациентите с история на репродуктивни несполуки и абнормална спермограма беше установена инфекция с CMV, а в групата от 20 пациенти с нормална спермограма и репродуктивни неуспехи установихме една инфекция с *C.trachomatis* (5%). Инфекция с HSV не беше установена в нито една от изследваните проби. Получените в това изследване резултати, сравнени с данните от други проучвания, показват значението на инфекцията с CMV и *C.trachomatis* като фактор при мъжкия инфертилитет. Освен значението им за мъжкия стерилитет асимптоматичните вътреклетъчни спермални инфекции застрашават също и здравето на майката и на детето. Затова ранната диагностика на активните и на асимптоматичните инфекции с вътреклетъчни патогени, като хламидия, цитомегаловирус и херпес симплекс вирус в сперматозоидите може да обоснове адекватна антивирусна или антибиотична терапия, която би увеличила вероятността за възстановяване на фертилността и дългосрочно съхраняване на спермалните качества.

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 129/2018 Идентифициране и биохимично охарактеризиране на хидроксицинамоилхинови киселини и флавоноиди от *Tanacetum vulgare L.* като потенциални терапевтични средства**

**Докторант:** Ас. Анелия Матева Василева

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дбн и Доц. Ивайло Иванов, дх

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Изследвано е влиянието на суровия екстракт от вратига върху постпролин-специфичната ензимна активност в три човешки клетъчни линии MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231. Във всичките три клетъчни линии е наблюдавано концентрационно зависимо инхибиране, като степента на инхибиране в MDA-MB-231 е най-висока и най-ниска в MCF-7 клетъчни линии. Видът на инхибиране на екстракта върху постпролин-специфичната ензимна активност в клетъчни линии MDA-MB-231 се оказва безконкурентен. Нашите резултати показват, че различни екстракти от вратига, получени от суровия екстракт, имат изразен инхибиторен дозо-зависим ефект върху ензимната

активност в раковата клетъчна линия MDA-MB-231. Най-високият ефект се наблюдава при използване на екстракт от билката в двуфазна система етилацетат/вода. Тъй като е известно, че специфичните за пролина ензими участват в различни туморни растежи, може да се заключи, че естествените инхибитори от вратига имат потенциал да се използват като терапевтични противоракови агенти. Компонентите в екстрактите от цвета на *Tanacetum vulgare* L. показват висока селективност по отношение на инхибирането на пролиллогопептидазата. Тези инхибитори имат потенциал да бъдат използвани като терапевтични средства поне при карцином на млечната жлеза.

#### 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 130/2018    **Разработване на специфичен и чувствителен метод за количествено определяне на ерготионеин – потенциален модулатор на апоптични и сигнални пътища в клетката**

**Докторант:** Ясен Георгиев Христов

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев дм, дбн и Доц. Валентин Лозанов дб

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Ерготионеинът е природна аминокиселина, открита преди повече от 100 години, която е екзогенна за човека и се синтезира само в някои видове гъби. През 2005 г. бе установено, че човешкият организъм притежава специфичен транспортен протеин OСТN1 за ерготионеин, а също и депа за неговото съхранение. Установено, е че ерготионеинът е един от най-мощните възстановяващи се антиоксиданти, а също че има пряко отношение към процесите на апоптоза и онкогенеза. Химическият характер на ерготионеина, цвистер йонна тио аминокиселина с бетаинова структура, го прави изключително сложен обект за анализ. В хода на реализиране на настоящия проект, бе използван системен подход за разработване на ефективен и практичен метод за анализ на ерготионеин в реални биологични проби. Този подход включваше няколко етапа: а). намиране на условия за екстракция - като относително най-добри бяха селектирани условия с използване на трикомпонентна система вода/метанол/метилтретбутилов етер; б). подбор на хроматографски условия и колона – оптимални резултати бяха получени на колона iNPLC 100 x 2.1 mm, 1.8 μm и подвижни фази позволяващи работа в условия на хидрофилни взаимодействия; в). избор на мас спектоскопски режим на работа – максимална чувствителност и прецизност на детекция бе получена в положителен режим на електроспрей йонизация и използване на паралелен режим на мониторинг на фрагментните йони. За количествено определяне бяха използвани следните масови преходи [M+H]<sup>+</sup> 230.095 до MS<sup>2</sup> - 186.105, 127.032. В резултат, бе разработен нов оригинален аналитичен метод за количествено определяне на ерготионеин в биологични проби, който се характеризира с граница на детекция (LOD) 1 мкг/кг и граница за количествено определяне (LOQ) 5 мкг/кг. Обхватът на метода бе разширен с възможност за анализ на хистидин и хистамин. Методът се характеризира и с висока производителност, тъй като времето за анализ на една проба включително

пробоподготовката е под 30 мин. Практическата приложимост на метода бе потвърдена с анализа на 23 проби на култивирани и диво растящи гъби.

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 131/2018 Изследване на редки варианти в гени SHANK1 и SHANK2 и тяхната асоциация с биполарно афективно разстройство и шизофрения при български пациенти**

**Докторант:** Радосвета Димитрова Божилова

**Научен ръководител:** Акад. проф. д-р Ваньо Митев, дмн, дбн и Проф. Радка Кънева, дб

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

**РЕЗУЛТАТИ:** SHANK гените са кандидат гени за психиатрични заболявания, включително шизофрения и биполарно афективно разстройство (БАР). Продуктите на тези гени са адапторни протеини в постсинаптичната плътност на синапсите, които свързват рецепторите на постсинаптичната мембрана. В рамките на настоящия проект бяха изследвани 6 редки варианти в гените SHANK1 и SHANK2, открити при предходно проучване на научния колектив. За наличието на вариантите бяха изследвани 100 пациенти с БАР и шизофрения и 100 клинично здрави контроли чрез директно секвениране по Сангер. От изследваните варианти, rs201299941 в екзон 23 на SHANK1, rs782583508 и rs141184740 в 20 екзон на SHANK2, и вариант rs150857128 в екзон 33 на SHANK2 не бяха открити при групата на пациентите и групата на контролите. Вариант rs200473891 в екзон 22 на SHANK1 беше наблюдаван при двама от контролите и не беше открит при пациенти. Вариант rs117843717 в екзон 30 на SHANK2 беше открит в хетерозиготно състояние при 4 пациента и 2 контроли. Двамата варианта не показаха статистически значима асоциация с БАР и шизофрения. Резултатите от това проучване помогнаха за по-доброто изясняване на ролята на изследваните варианти в SHANK1 и SHANK2 към патогенезата на психиатричните заболявания. Освен това дадоха възможност за определяне на честотите на изследваните варианти в българската популация.

**Научни публикации и прояви:**

- Bozhilova R, Penchev M, Beltcheva O, et al. Rare genetic variants in SHANK1 and SHANK2 genes found in Bulgarian patients with schizophrenia and bipolar disorder, poster presentation, The European Human Genetics Conference, June 15-19 2019, Gothenburg, Sweden

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 132/2018 Изследване ролята на протеин киназа *PKC alpha* в BMP4 - индуцирани към одонтобластна диференциация хетерогенни клетки изолирани от нормална човешка апикална папила**

**Докторант:** Виолета Стефанова Димитрова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн,

**Научен консултант:** Гл. асистент Антония Исаева, дб,

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Генната експресия на PKC  $\alpha$  в изследваните субпопулации е фенотипно специфична, като най-високи са белтъчните нива в CD105+/STRO-1-субпопулацията, а най-ниски CD 105+/STRO-1+субпопулацията. Експресираният изозим е функционално активен и в трите изследвани субпопулации и локализацията му е стриктно цитоплазмена, но активността му е фенотипно специфична, като с най-висока активност е PKC $\alpha$  в CD 105+/STRO-1-субпопулацията, а най-слабо активирана е в CD105+/STRO-1+субпопулацията. Остеоиндуктивният растежен фактор BMP4 потиска активността на PKC  $\alpha$  в CD 105+/STRO-1+ и CD105-/STRO-1+ субпопулации, без да влияе на белтъчната й експресия, и понижава белтъчната експресия на PKC $\alpha$  в CD105+/STRO-1-субпопулацията, без да влияе на активността й, което ясно демонстрира, че BMP4 се трансдуцира по фенотипно-специфични сигнални пътища в изследваните субпопулации. Наличието на фосфорилиране на Ser-657 от структурата на PKC  $\alpha$  показва, че изозима е функционално активен и участва в регулацията на клетъчният цикъл на експоненциално автокринно растящите клетки. Като се вземе в предвид, че PKC  $\alpha$  е добре установен и известен активен участник в сигнално-трансдукционният контрол на клетъчната пролиферация от една страна, и от друга страна факта, че изследваните клетъчни култури са автокринно експоненциално растящи, може да се предположи, че и в трите, фенотипно различни субпопулации PKC  $\alpha$  е функционално значим участник в автокринната регулация на тяхната пролиферативна активност, докато в отговор, индуциран от третирането им с BMP4 се наблюдава понижена експресията на PKC  $\alpha$  в CD105+/STRO-1- фенотипа, в резултат на която е и отчетената понижена степен на фосфорилирането й, докато в другите два изследвани фенотипа, понижената степен на фосфорилирането й се дължи на промяна в нейната регулация. Отчетеният негативен ефект върху активността на изозима, би могъл да се обясни с добре доказаната роля на BMP4 като индуктор към остеогенна/одонтогенна диференциация на мезенхимни стволово-клетъчни фенотипове от хистологичния състав на други зъбни структури, а именно действието на BMP4 в третираните фенотипове би могло да е свързано с индуциране на прехода от пролиферация към остеогенна/одонтогенна диференциация. В полза на тази хипотеза е и факта, че PKC $\alpha$  потиска остеобластната диференциация, но подпомага пролиферацията на остеобластните клетки, въз основа на което може да се предположи, че понижената активност на изозима може би е свързана с прехода към одонтобластна диференциация. BMP4-индуцираният инхибиторен ефект се извява с различна сила в изследвани клетъчни субпопулации, което демонстрира, че BMP4 се трансдуцира в тях по фенотипно-специфични сигнални пътища.

**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 133/2018 Цитотоксични ефекти и оксидативен стрес на доксорубицин, натоварен в хитозан-алгинатни частици върху клетъчна линия H9c2**

**Докторант:** Йордан Иванов Йорданов

**Научег ръководител:** Проф. Вирджиния Цанкова, дф и Проф. Красимира Йончева, дф

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Получените експериментални данни показват, че натоварването на доксорубицин в хитозан-алгинатни частици води до намаляване на цитотоксичните му ефекти върху миши кардиобласти в сравнение с конвенционален, разтворен доксорубицин хидрохлорид. При концентрации, в които доксорубицин предизвиква средни по големина цитотоксични ефекти върху миши кардиобласти, ненадвишаващи 50% цитотоксичност, натоварването в хитозан-алгинатни частици не променя в изразена степен големината на цитотоксичните ефекти. В субцитотоксични концентрации конвенционалният доксорубицин предизвиква прооксидантни процеси, свързани с намаляване на съотношението GSH:GSSG (редуциран към окислен глутатион), които са по-изразени в сравнение с натоварения в хитозан-алгинат доксорубицин. И свободният, и натоварен в хитозан-алгинат доксорубицин в субцитотоксични концентрации предизвикват намаляване на концентрация на тоталния (GSH и GSSG) глутатион. Самостоятелно приложени, ненатоварените хитозан-алгинатни частици предизвикват слаби цитотоксични ефекти при големи концентрации и продължителност на третиране, докато при ниски концентрации предизвиква повишаване на съотношението GSH:GSSG, което е индикация за наличието на антиоксидантен ефект. Натоварването на доксорубицин в хитозан-алгинатни частици проявява протективни ефекти върху жизнеността на кардиобласти при високи, цитотоксични концентрации. При концентрации, предизвикващи субцитотоксични ефекти, натоварването е свързано с протективни ефекти спрямо предизвиканата от доксорубицин деплеция на редуцирания глутатион. Наблюдаваният ефект вероятно се дължи на антиоксидантни свойства на носителя, като това предположение се базира на съобщения за способността на антиоксиданти да проявяват кардиопротективен ефект при увреждане с доксорубицин. Проведеното проучване ни дава основание да съобщим, че натоварването на доксорубицин в хитозан-алгинатни частици проявява протективни ефекти върху H9c2 клетки като модел на кардиомиоцити чрез намаляване на цитотоксичността при високи концентрации и подобряване на антиоксидантния статус на клетките при ниски концентрации.

**Научни публикации и прояви:**

- Йорданов Й, Цанкова В, Алуани Д, и др. Протективни ефекти на хитозан-алгинатни частици, натоварени с доксорубицин *in vitro*, VII Конгрес по Фармация с международно участие, 21-23.11.2019г., Боровец, България

**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 134/2018    Експресионен анализ на ключови гени, свързани с избягване на имунния отговор при белодробен рак**

**Докторант:** Вероника Йорданова Петкова

**Научен ръководител:** Акад. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Радка Кънева дб

**Базова организация:** Медицински Факултет, Катедра по медицинска химия и биохимия

**РЕЗУЛТАТИ:** Взаимодействието на PD-L/PD-L1 е основният път, използван от туморните клетки с цел потискане на имунния отговор върху тумора и е предпоставка за разработването на терапевтични стратегии (имунотерапия) за подобряване на прогнозата и увеличаване на преживяемостта при тези пациентите. Целта на настоящия проект е да анализира експресията на PD-L1 и STAT3 в тъкани на пациенти с АК и ПК и оцени тяхната потенциална роля на предиктивни биомаркери за отговор към имунотерапия. Бяха изследвани 50 свежо замразени тъканни проби (25АК, 25ПК) и прилежащите им нормални тъкани. Експресията на PD-L1 и STAT3 беше определена чрез количествен PCR в реално време. Статистическият анализ беше осъществен чрез SPSSv20. Повишена експресия на PD-L1 беше установена в 24% (7АК,5ПК), а на STAT3 в 20% (7АК,8ПК) от изследваните проби. Намалена експресия PD-L1 и STAT3 бе наблюдавана съответно при 34% (11АК,6ПК) и 34% (8АК,9ПК) от туморите. Резултатите показаха статистически значима корелация между експресията на PD-L1 и STAT3 ( $p < 0.001$ ). За разграничаване на АК от ПК беше осъществен анализ на ROC кривите. Експресията на STAT3 ( $AUC = 0,689$ ,  $p = 0,025$ ) показва статистическа значимост, а експресията на PD-L1 - корелация с наличието на нодални метастази и може да разграничи със 75% чувствителност и 100% специфичност пациентите със и без нодални метастази. Необходимо е да се проведе валидиращо изследване в по-голяма кохорта от пациенти, за да се оцени по-добре диагностичния потенциал на изследваните биомаркери.

**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' 2019“

**Договор 120/2019** Скрининг за мутация в гена *ARG1* в предполагаем ендемичен регион за метаболитното заболяване Аргининемия (аргиназен дефицит) в България

Докторант: Славена Христова Атемин

Научен ръководител:

- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн,
- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн,

Базова организация: Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, ул. Здраве 2, гр. София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** С работата по настоящата научна разработка екипът успешно въведе и оптимизира подобрите методи за провеждане на популационен скрининг: изолиране на ДНК, PCR и секвениране на определен регион от *ARG1* гена. Целта на настоящият проект беше да се извърши скрининг за мутацията с.329+1G>A в *ARG1* гена и да се определи носителската честота при новородени от ромски произход от предполагаем ендемичен регион за аргининемия в България (региона на село Осиковица). Проведените молекулярно-генетични изследвания върху 100 филтърни бланки от пациенти с ромски произход от региона на село Осиковица показаха висока честота на носителство – 1:100 (1%) на генетичния дефект с.329+1G>A в *ARG1* гена, спрямо 100 здрави контроли с ромски произход от цялата страна. Базирайки се на ниската честота на заболяването в световен мащаб от 1:300 000 до 1:1 000 000 и получените резултати от проведения от нас скрининг, считаме региона на село Осиковица като ендемичен за метаболитното заболяване Аргининемия. Своевременното генетично диагностициране на носителите на генетичния дефект с.329+1G>A в *ARG1* гена ще подпомогне адекватната медико-генетична консултация. Провеждането на селективен скрининг на ромите от този регион с цел установяване на носителите на генетичен дефект за заболяването Аргиназен дефицит би подпомогнало за изясняване на риска от поява на това заболяване в засегнатите семейства и дава възможност за предлагане на пренатална диагностика с цел превенция на заболяването.

**Научни публикации и прояви:**

- Атемин С, Тодоров Т, Георгиева Б и др.. Скрининг за мутация в гена *ARG1*, асоциирана с метаболитното заболяване Аргининемия в предполагаем ендемичен регион в България. Научно - практическа конференция „Ден на редките болести в България“, София, 28-29 Февруари 2020г

**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 127/2019 Мултидисциплинарен анализ при български пациенти с мозъчни тумори. Връзка между вирусни етиологични агенти, генетични и епигенетични фактори**

**Докторант:** Емилия Красиминова Николова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн

**Базова организация:** Катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Мозъчните тумори се характеризират с изключителна молекулна хетерогенност и използването на интегриран подход с цел допълнително охарактеризиране би било важно за по-прецизен мониторинг и таргетна терапия при тези тумори. Целта на настоящия научен проект е провеждането на интегриран подход за анализ на епигенетични, генетични и вирусни фактори в невро-инфламаторните процеси и малигнизацията. За тази цел беше изолирана ДНК и РНК от десет български пациенти с глиоми. За определяне експресията на miR-7 беше използван TaqMan Advanced miRNA assay според инструкцията на производителя. Промяната в броя копия (CNV) в тумор-супресорни гени и онкогени беше анализирана с MLPA. ДНК детекцията на EBV, CMV и HSV беше извършена с комерсиален кит според инструкциите на фирмата производител (Amplisens). ДНК и РНК амплификацията беше проведена на DTP Prime qPCR. Понижаване в експресията на miR-7 беше наблюдавано във всички мозъчни тумори спрямо здравата контрола ( $p=0.028$ ), което корелираше с натрупване на делеции в тумор-супресорните гени и на CNV. В българската популация предимно се наблюдава класически профил на глиобластомите и наличие на промени в броя копия в тумор-супресорни гени - *PTEN*, *CDKN2A* и в онкогени - *EGFR*, *MDM2*, *MIR26A2-1*, *CDK4*. В един от пациентите с диагноза ПНЕТ и глиобластом (GBM) се откри делеция на онкогените *MDM2*, *MIR26A2-1* и *CDK4*. За първи път в световната литература се докладва делеция на тези гени в мозъчен тумор, които обикновено са амплифицирани. В изследваната извадка от български пациенти не беше установено присъствието на трите изследвани вируса – EBV, CMV, HSV. Получените резултати от проведения интегриран анализ са пилотни за България и показва диагностичния и прогностичния потенциал на miR-7 и преобладаващо засягане на *PTEN*, *CDKN2A* и *EGFR* при глиоми, както и класически подтип на GBM. В настоящето изследване не бяха детектирани вирусни ДНКи в изследваните проби.

**Научни публикации и прояви:**

- Nikolova E, Mitev V, Todorova A. Copy number variations in critical cell-signalling genes with potential targeted therapeutic application. Molecular Analysis for Personalised Therapy Congress. London, UK. 07-09.11.2019. Annals of Oncology -Vol 30, Suppl 7, p. vii33.
- Nikolova E, Dimova P, Minkin K, et al. Human cytomegalovirus DNA detection in a recurrent glioblastoma multiforme tumour, but not in whole blood: a case report and discussion about the HCMV latency and therapy perspectives. J. Neurovirol. 2020.

**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 128/2019 In vivo проучване върху ефектите на екстракт от *Ruscus aculeatus* (Asparagaceae) върху експериментален модел на остеопороза при плъх**

**Докторант:** Лидия Веле Чакулеска

**Научен ръководител:** Проф Николай Данчев, дм и Доц Румяна Симеонова,

**Базова организация:** Катедра «Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология», София, 1000, ул. Дунав 2

**РЕЗУЛТАТИ:** Екстрактът от *R. aculeatus* (ERA) е анализиран чрез HPLC метод и съдържа 20% сапонини, изразени като рускогенин и неорускогенин. Изследвани са костно-протективните ефекти на ERA, приложен самостоятелно и в комбинация със золедренова киселина (ZOL) върху модел на постменопаузална остеопороза чрез овариектомия (OVX) на плъхове. Ефектите на ERA са сравнени със стероидния сапонин диосцин (DSC), с подобна на рускогенините структура и с известно протективно действие върху костите. В настоящото изследване, нивата на калций при всички OVX групи е с около 85% по-високо ( $p < 0.05$ ), а нивото на фосфор с около 43% по-ниско ( $p < 0.05$ ) от контролната група още на първата седмица след OVX, вероятно поради по-бързият костен оборот при плъховете. При групите, третирани с комбинациите ZOL+ERA и ZOL+DSC, калцият намалява статистически значимо с около 45% в последната седмица от експеримента, а фосфорът се повишава със 67% спрямо OVX групата и практически се възстановяват до контролните нива преди кастрацията. Активността на ензимите алкална и кисела фосфатаза, се повишават при всички OVX животни, но след 45 дневно приложение на изследваните БАВ активността на ензимите се нормализира, особено при комбинираното третиране. Рентгенологичната находка показва, че кастрираните животни имат намалена костна плътност в областта на проксималната бедрена кост и очертанията на кортикалната линия не са съвсем ясни. При групите, третирани, както самостоятелно с изследваните БАВ, така и в комбинациите им, не се наблюдават радиологични промени. При всички изследвани параметри, ефектите на ERA са съизмерими с тези на DSC и потенцират ефектите на класическия бифосфонат ZOL. От проведените експерименти за първи път се установява костно-протективен ефект на екстракт от *R. aculeatus*, който вероятно се дължи на структурното сходство на рускогенините с естрадиола. Резултатите от това проучване показват, че ERA може да бъде полезен източник на БАВ за развитието на ефективни профилактични фитопродукти за поддържане на адекватна костна структура при свързаната с възрастта остеопороза.

**Научни публикации и прояви:**

- Chakuleska L, Michailova R, Shkondrov A, et al. Bone protective effects of purified extract from *Ruscus aculeatus* on ovariectomy - induced osteoporosis in rats. Food Chem Toxicol. 2019;132:110668.

**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 129/2019 Проучване на молекулярно-генетични маркери, асоцииращи се с диарийни заболявания, при резистентни на трета генерация *Escherichia coli*, изолирани от фецес на пациенти и здрави носители**

**Докторант:** Петя Борисова Станкова

**Научен ръководител:** Проф. Румяна Марковска-Давидова, дм и Чл-кор. Проф. Иван Митов, дмн

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Бяха проучени 213 изолата *E. coli* от фецес. Беше тествана чувствителността им спрямо 9 групи антибиотици. Изолатите показаха висока резистентност към трета генерация цефалоспорици (72-100%) и средно висока към останалите групи от тестваните антимикробни средства. Добра беше чувствителността им само към fosfomycin (3%), nitrofurantoin (4%), colistin (0%), както и към карбапенеми (0.5%). Бяха определени групите ESBL, AmpC и карба чрез мултиплекс PCR-и и нуклеотидно секвениране, като се касаеше за 184 ESBL, 23 плазмидни AmpC продуценти, 1 продуцент на карбапенемаза и 5 с неизвестен механизъм. От ESBLs преобладаваха CTX-M-15 (92/184 (50%)) ензимите, а от плазмидните AmpC- DHA-1(23/27 (85%)) Беше направено и MLST, като преобладаващият ST тип беше ST131, който принадлежи към вирулентен клон, следван от ST38. Доказани бяха и филогрупите на изолатите като B2 преобладаваше и по-голямата част от изолатите от тази група бяха причислени към ST131, като следващ по честота беше филотип D, който се асоциираше с ST38. Бяха направени PCR за доказване гена за интимин на *eae*, *bfp* гена като фактори за ентеропатогенност и PCR за доказване наличието на гените за Shiga токсини – *sxt*. Два от изолатите бяха положителни за *eae* гена. Останалите бяха отрицателни като най-вероятно се касае за екстраинтестинални *E.coli*, а не диарогенни такива. Беше направено серотипиране с поливалентните и моносеруми, за да се определи точния серотип на ЕРЕС. Четиредесет и два от изолатите, които бяха определени като ST131 и филогрупа B2, бяха положителни за първи поливалентен серум за ЕРЕС и положителни за моногрупа O25. Останалите 19 от ST131 бяха отрицателни и към трите групи поливалентни серуми. Пет от изолатите бяха положителни на трети поливалентен серум, като три от тях бяха положителни за моносерум Об, един беше положителен за моносерум O55, а другият беше положителен на моносерум O125.

**Научни публикации и прояви:**

- Станкова П, Марковска Р, Боянова Л, и др. Антибиотична чувствителност на чревни изолати, суспектни за продукция на ESBL/карбапенемаза от разред *Enterobacterales*, изолирани от хоспитализирани пациенти и здрави индивиди за периода 2017-2018, Съвременна медицина 64(1) 2020

**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 130/2019** Сравнително *in vitro* изследване на електронодонорния и протонодонорния антиоксидантни капацитети на комплекси на Ga(III) и La(III) с 5-аминооротова киселина

**Докторант:** Лозан Трайков Тодоров

**Научен ръководител:** Проф. Ирена Костова, дфн

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Обект на настоящия отчет е изследване антиоксидантните свойства на новосинтезирани комплекси на галий(III) и лантан(III) с 5-аминооротова киселина. Механизмите на потенциалния антиоксидантен ефект също бяха проучени. Комплексите са доказани и характеризирани чрез елементарен анализ, FT-IR, FT-Raman и UV-VIS спектроскопия. Техни разтвори с няколко различни концентрации са подложени на серия изследвания за антиоксидантна активност. Приложени са хемилуминометрия, UV-VIS спектрометрия и последващ статистически анализ. Изследвани са потенциалните механизми на антиоксидантния ефект – отдаване на водороден атом (DPPH<sup>•</sup> тест) и/или електронен обмен (ABTS<sup>•+</sup> тест). Извършени са *in vitro* експерименти с цел изясняване взаимодействието на комплексите и на свободния лиганд със супероксиден и хипохлоритен радикали. При патологични процеси образуването им нараства, което води до оксидативен стрес и редица вторични усложнения. Измерено бе тоталното радикалово образуване чрез МТТ тест. Въз основа на получените резултати бяха направени следните изводи: - Лантановият комплекс участва и в реакции на електронен обмен, и може да отдава водороден атом. Антиоксидантният ефект е концентрационно зависим. При еквимоларни концентрации взаимодействието му със супероксид и хипохлорит е по-силно, отколкото при свободния лиганд. Антиоксидантният ефект спрямо системата ксантин/ксантин оксидаза вероятно се повлиява от взаимодействие на съединението с компонентите на системата. - Галиевият комплекс участва предимно в реакции на електронен обмен. Взаимодействието с DPPH<sup>•</sup> вероятно е възпрепятствано от стерични фактори. При еквимоларни концентрации антиоксидантният му ефект е по-изразен от този на свободния лиганд. Изключение от тази тенденция прави изследването за тотално образуване на свободни радикали в серум на плъх. Двата комплекса координират по 3 лиганда. Антиоксидантните ефекти са по-слаби, отколкото тези на лиганд с три пъти по-висока концентрация. Този факт, както и интерпретацията на UV-спектрите предполагат, че под влияние на йона-комплексобразувател настъпват промени в парциалните заряди на лиганда, което променя протондонорните и електрондонорните му свойства в сравнение със свободната молекула.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Todorov L, Traykova M, Kostova I. Hydrogen Donation and Electron Transfer Related Antioxidant Activity of 5-aminoorotic Acid and Its Complexes With Lanthanum (III) and Gallium (III). 3<sup>rd</sup> International Conference on Bio-antioxidants “Natural bio-antioxidants as an inspiration for food science and pharmacy”. Nessebar. 17-21 Sep 2019
- Todorov L, Kostova I. In Vitro Interaction of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex With the Superoxide Radical, Yielded By Potassium Superoxide And Xanthine/Xanthine Oxidase Model Systems. VII<sup>th</sup> Congress of Pharmacy With International Participation. Borovets. 21-24 Nov 2019
- Todorov L, Traykova M, Kostova I. In Vitro Interaction of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex with Superoxide Radical, Generated by Two Model Systems. Int J Mol Sci . 2020 Nov 23;21(22):8862.
- Todorov L, Traykova M, Kostova I. In Vitro Interaction of 5-aminoorotic Acid and Its Lanthanum(III) Complex with Superoxide and Hypochlorite Radicals. Der Pharma Chemica 2020;12(7).

#### 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 131/2019 Изследване на НСПВс за *in vitro* анти туморна/антипролиферативна активност в експериментални моделни системи**

Докторант: Мартин Живков Малчев

Научен ръководител: Проф. Ирина Николова, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проучването е да се проведат изследвания за антипролиферативна активност на конвенционални нестероидни противовъзпалителни лекарства: Diclofenac Sodium, Metamizole Sodium, Meloxicam, Lornoxicam, Ketoprofen, Dexketoprofen и Paracetamol върху човешки туморни левкемични култури: BV – 173 (човешка В клетъчна прекурсорна левкемия), К – 562 (човешка хронична миелоидна левкемия в бластна криза) и NB – 4 (човешка остра промиелоцитна левкемия). Клетките бяха третирани със серийни разреждания на проучените съединения за 72 часа. Жизнеността им беше оценена с помощта на стандартния МТТ-тест на Mosmann. Проведен бе нелинеен регресионен анализ и се изчислиха еквивалентните IC<sub>50</sub> концентрации, предизвикващи 50% ерадикация на виталните клетки. Получените данни бяха подложени на „mean graph“ анализ по методология Compare, разработена за скрининг на потенциални противотуморни лекарства. Проучените съединения предизвикаха концентрационно-зависимо потискане на виталитета на малигнено-трансформираните клетки. Стойностите на IC<sub>50</sub> позволяват ранжиране на съединенията по относителна антинеопластична активност: lornoxicam ≥ diclofenac > meloxicam > paracetamol > metamizole > dexketoprofen ≥ ketoprofen, като 50% инхибиране на BV – 173 клетките се реализира средно при почти два пъти по-ниски концентрации в сравнение с NB – 4 или К – 562. Чрез “mean graph” анализа се създаде математически модел с диаграма, генерирани от стойностите на IC<sub>50</sub>. Диаграмата за всяка клетъчна линия показва как се различава нейната химиочувствителност към тестваното вещество. Най-ниски стойности на коефициентите се наблюдават при paracetamol. Metamizole и meloxicam показват висока и много висока корелация със стойностите за същинските НСПВЛ, но не и с тези за paracetamol. Висока корелация се наблюдава между lornoxicam и meloxicam. Умерена и висока е корелация при lornoxicam и ketoprofen. Diclofenac показва умерена до висока корелация с всички НСПВЛ, без ketoprofen и paracetamol. Dexketoprofen и ketoprofen показват висока корелация. Антинеопластична активност е най-изразена при lornoxicam и diclofenac. Останалите съединения реализират антинеопластичната си активност при високи микромолярни концентрации. Независимо от хомогенната фармакодинамика се наблюдава различен профил на химиочувствителност.

**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 135/2019 Изследване на редки варианти в гени, кодиращи йонни канали, и тяхната асоциация с биполярно афективно разстройство и шизофрения при български пациенти**

**Докторант:** Радосвета Димитрова Божилова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Радка Кънева, дб

**Базова организация:** Катедра медицинска химия и биохимия, Ул. Здраве 2, 1431 София

**РЕЗУЛТАТИ:** Волтаж-зависимите йонни канали са важни медиатори на физиологичните функции в централната нервна система. Активация на тези канали повлиява различни процеси в нервната тъкан, сред които са освобождаването на невротрасмитери, невронната възбудимост, невропластичността. През последните години нараства броя на изследванията, при които се установява, че варианти в йонните канали се свързват с патогенезата на психиатрични заболявания. Мутации в гени, кодиращи йонни канали, се асоциират с редица психиатрични заболявания, сред които са аутизъм, биполярно разстройство, шизофрения и забавено умствено развитие. В рамките на настоящия проект бяха изследвани 5 редки варианти в гените *CACNA1C*, *CACNAIS*, *SCN3A*, *SCN9A* и *SCN1B*, открити при предходно проучване на научния колектив. За наличието на вариантите беше бяха изследвани 100 пациенти с БАР и шизофрения и 100 клинично здрави контроли чрез директно секвениране по Сангер. От изследваните варианти, само вариант rs369438564 в екзон 44 на ген *CACNA1C* беше открит при още един от изследваните пациенти. Останалите варианти не бяха открити в извадката от 100 пациенти и 100 контроли. В резултат на изследването на общо 282 болни с БАР и 153 с шизофрения, бе определена честотата на изследваните варианти: rs369438564 с честота 0.013; rs150590855 с честота (0.006), rs147678484 с честота (0.009), rs182650126 с честота 0.009; и rs782583508 с честота (0.025). Това потвърждава, че изследваните редки варианти в гени, кодиращи волтаж зависими йонни канали вероятно допринасят за предразположението и развитието на биполярно афективно разстройство и шизофрения. Резултатите от това проучване подпомагат по-точното определяне на честотите на изследваните варианти сред болни с психиатрични заболявания и здрави контроли от българската популация.

**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 137/2019 Ефект на пречистен екстракт от AMANITA MUSCARIA върху мозъчни синаптозоми, невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y и активността на човешки рекомбинантен ензим MAO-B**

**Докторант:** Мария Венциславова Войнова.

**Научен ръководител:** Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф и Проф. Илина Манова, дф

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

**РЕЗУЛТАТИ:** В настоящето проучване са проследени *in vitro* ефектите на екстракт от червена мухоморка (*Amanita muscaria*) (AME) на суб-клетъчно (изолирани мозъчни синаптозоми) и клетъчно (невробластомна клетъчна линия *SH-SY5Y*) нива, както и ефектите му върху активността на човешки рекомбинантен MAOB ензим (hMAOB).

Върху клетъчна линия *SH-SY5Y*, приложен самостоятелно, АМЕ не проявява статистически значим невротоксичен ефект в изследваните концентрации, спрямо контролата (не-третирани клетки). При модел на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуциран оксидативен стрес обаче, екстрактът проявява статистически значим невропротективен ефект като съхранява клетъчната жизнестойност и намалява освобожаването на LDH, спрямо контролата (токсичния H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Върху изолирани мозъчни синаптозоми, приложен самостоятелно, екстрактът също не проявява статистически значим невротоксичен ефект в изследваните концентрации, спрямо контролата (не-третирани синаптозоми). При модел на 6-хидроксидопамин-индуциран оксидативен стрес, единствено най-високата концентрация проявява статистически значим невропротективен ефект, съхранявайки синаптомалната жизнестойност и нивото на редуциран глутатион, спрямо контролата (токсичния 6-хидроксидопамин). Екстрактът не повлиява активността на човешки рекомбинантен MAOB ензим (hMAOB). Установените невропротективни ефекти на екстракта от червена мухоморка, най-вероятно се дължат на способността му да улавя свободните радикали или да съхранява нивото на клетъчния протектор – редуциран глутатион.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Kondeva-Burdina M, Voynova M, Shkondrov A, et al. Effects of *Amanita muscaria* extract on different *in vitro* neurotoxicity models at sub-cellular and cellular levels. Food Chem Toxicol. 2019;132:110687

#### **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 139/2019 Изследване на промените в химичните и физични качества на многосиловите ортодонтични дъги в клинична обстановка. Отчитане на дискомфорта на пациента**

Докторант: Мирела Валериева Георгиева

Научен ръководител: Проф. Лаура Андреева-Гургуриева, дмн,

Базова организация: Катедра Ортодонтия, ул. Георги Софийски 1, София

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на изследванията е да се установи дали престоят на дъгите в устната кухина оказва влияние върху техните физични и химични качества. **Методи:** Изследвани са два вида многосилови ортодонтични дъги Tritanium® на АО® и Bio-active® на GC® с размер на сечението 0.016 x 0.022 инча. Всяка една дъга е разделена на три сегмента (преден, среден и заден). За изследване на дъгите за използвани следните методи: Наноиндентация, която установява твърдостта в съответните участъци от дъгата и нейната промяна след клинична употреба. LIBS дава информация за химичния състав на сплавта, от която са изработени изследваните дъги. Рентгено-структурен анализ (XRD), определя фазата, в която се намира дъгата на стайна температура. Получените резултати от метода на Наноиндентация показват, че има голяма разлика между механичните свойства в различните области на изследваните Tritanium и Bio-active дъги. Твърдостта и модула на еластичност в задната област са най-високи, а предният участък има най-ниската твърдост и модул на еластичност. Сравнението на механичните свойства на неизползвани и използвани в продължение на 6 седмици TriTanium и Bio-active дъги показаха, че

твърдостта и модулът на еластичност, намаляват драстично във всички 3 области. Резултатите от LIBS анализ на BIO-ACTIVE® неизползвани дъги по цялото протежение на дъгата, показваха наличието на основните елементи на никел-титаниева сплав - Ni, Ti, както и следи от Fe и Cr. LIBS анализ върху неизползвана Tritanium® дъга е отчетел съдържание само на елементите Ni и Ti. Кристалната структура на дъгата TiTanium и Bio-active, оценени чрез XRD, при стайна температура 25<sup>0</sup> C, показва кубична структура с параметри a = b = c = 3.1323, β = 90°, за всички сегменти. При 25<sup>0</sup> C дъгата се намира в аустенитна фаза. Изводите са: Многосиловите ортодонтски дъги притежават диференцирано освобождаване на сили в различните участъци, но след клинична употреба за 6 седмици, се наблюдава спад в механичните качества. Общо заключение от проведеното изследване върху химичния състав на двете ортодонтски дъги е, че те са изработени от Ni-Ti сплав. От рентгено-структурния анализ направихме следното заключение и за двата вида дъги: при стайна температура са в аустенитна фаза, което означава че не притежават свойството „двуосочен ефект“ на памет на формата, а супереластичност.

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 140/2019    Скрининг на флавоноиди от *Gypsophila glomerata* Pall ex M.B. (Caryophyllaceae) за *in vitro* модулиране на активността на холинестерази и каспази**

**Докторант:** Божана Ивайлова Димитрова

**Научен ръководител:** Доц. Румяна Симеонова, дф и Доц. Ренета Гевренова, дф

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Ензимите каспази и ацетилхолинестеразата са ключови ензими в процеса на апоптоза. Целта на изследването е да се направи оценка на потенциалната *in vitro* модулираща активност върху ефекторни и инициаторни каспази, ацетилхолинестераза и бутирилхолинестераза на C, O- гликозилирани флавоноиди, изолирани от надземната част на *Gypsophila glomerata* Pall ex M.B. (Caryophyllaceae). Водно-метанолният екстракт е охарактеризиран с ултра високо-ефективна течна хроматография – фотодиодна матрица (UHPLC-DAD) и ултра високо-ефективна течна хроматография – високоразделителна мас спектрометрия (UHPLC-HRMS). Чрез флаш хроматография и полу-препаративна ВЕТХ са изолирани 8 съединения с чистота над 95%. Те са структурно охарактеризирани чрез HRMS-базирана стратегия за аотация на C- и C, O- флавоноидни гликозиди. Всички изолирани съединения са 2"-O-пентозил-6-C-хексозиди на лутеолин, метиллутеолин и апигенин, като в 5 от тях пентозният остатък е ацетилян с една или две групи. Суровият екстракт и изолираните индивидуални компоненти показват умерена неспецифична концентрационно зависима инхибиторна активност спрямо ензимите ацетилхолинестераза и бутирилхолинестераза. C, O- флавоноидите гликозиди са тествани спрямо каспаза 1, 3 и 8 и са селектирани четири флавоноидни гликозида с перспективна инхибиторна активност срещу изпълнителните каспази. Суровият екстракт и изолираните съединения не

повлияват възпалителните и инициаторните каспази. Построени са кинетичните криви на ензимните реакции за каспаза 3 и каспаза 7 в присъствие на еквимолни количества на селектираните съединения. Те показват висока инхибиторна активност спрямо изпълнителните каспази 3 и 7, като проявяват по-висока степен на инхибиране спрямо каспаза 3. Инхибиторната активност на 2"-*O*-пентозил-6-*C*-хексозил-лутеолин по отношение на каспаза 3 е съизмерима с тази на необратимия каспазен инхибитор Z-VAD-FMS. Съединенията 2"-*O*-пентозил-6-*C*-хексозил-апигенин и 2"-*O*-(ацетилпентозил)-6-*C*-хексозил-лутеолин/метиллутеолин показват висока инхибираща активност по отношение на каспаза 3 и 7, без наличие на специфичност. 2"-*O*-пентозил-6-*C*-хексозил-лутеолин, показва висока специфичност на инхибиране спрямо каспаза 3. Резултатите от проекта хвърлят светлина върху ролята на специфична група флавоноиди - *C*-гликозиди на флавононите с *O*-гликозилиране в захарния остатък в модулиране на ключовите ензими в апоптозата каспази и холинестерази.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Sugareva P, Lozanova V, Dimitrova B, et al. Selective caspase inhibitors from *Gypsophila glomerata* Pall. Ex M.B. (Caryophyllaceae). 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation. Borovetz, Bulgaria. 21-24. 11. 2019.

#### **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 141/2019 Проследяване на клинични и хисто-патологични параметри, включително *AR* (CAG)n и *VDR* (AT)n генетични маркери във връзка с повишена предизпозиция и агресивен клиничен ход на заболяването простатен карцином след радикална лапароскопска простатектомия при български пациенти**

**Докторант:** Георги Маргаритов Иванов

**Научен ръководител:** Доц. Красимир Янев, дм и Доц. Маринчо Георгиев, дм

**Базова организация:** Катедра по Урология, ул. Св. Г Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В периода 05.2019 – 02.2020 в клиниката по Урология към УМБАЛ „Александровска“ при 30 пациента беше проведена радикална лапароскопска простатектомия по повод простатен карцином. 10 пациента бяха селектирани за провеждане на по-нататъшен анализ. Целта на изследването беше да се проследи отношението на алелните варианти на *AR*(CAG)n и *VDR*(AT)n към повишена предизпозиция и агресивно клинично поведение на заболяването простатен карцином (ПК) при български пациенти след радикална лапароскопска простатектомия. Пациентите бяха разделени в две групи според техния хистологичен Глийсън сбор (GS) – умерено рискова група (GS=7), n=6 (60%); и високо рискова група (GS  $\geq$  8), n=4 (40%). Избрани показатели бяха отбелязани и документирани: възраст на пациента, простатоспецифичен антиген (PSA) при поставяне на диагнозата, Глийсън сбор от предхождащата операция трансектрална биопсия на простатната жлеза и Глийсън сбор от оперативния хистологичен препарат, хистологични особености на препарата (например наличие на перинеурална инвазия, лимфоваскуларна инвазия и други), капсулна инвазия на карцинома и разпространение в семенните мехурчета. Извърши се PCR анализ на

алелните варианти на  $AR(CAG)_n$  и  $VDR(AT)_n$ . Рискови варианти по  $AR(CAG)_n$  ( $\leq 22$  повтора) се установиха в 30% от пациентите. По  $VDR(AT)_n$  пациентите се поделиха в следните групи: нисък риск – 10% (SS генотип); умерен риск – 60% (SL генотип); висок риск – 30% (LL генотип). Корелирането на посочените клинични и хистологични показатели с рисковите алелни комбинации на двата генетични маркери в изследваната извадка доказва, че: при пациенти с доказан  $AR(CAG)_n \leq 22$  повтора и пациентите с рисков генотип SL и LL по  $VDR(AT)_n$  се демонстрира по-висок PSA при поставяне на диагнозата, по-високи стойности на GS от простатната биопсия и хистологичния препарат от радикална простатектомия, по-висока честота на хистологични особености свързани с агресивно заболяване, по-висок риск от ангажиране на семенните мехурчета. При пациентите с SL и LL генотип по  $VDR(AT)_n$  се доказва и значима склонност към патологична прогресия на заболяването при сравнение на GS-биопсия и GS-радикална простатектомия.

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 142/2019 Изследване на полиморфизма rs2736340 в FAM167A-BLK региона като фактор за развитието на дерматомиозит у възрастни**

**Докторант:** Йоана Владимирова Пожарашка

**Научен ръководител:** Доц. Любомир Дурмишев, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** BLK (B Lymphoid Tyrosine Kinase) е член на Src-семейството на тирозин киназите. Изследванията върху мишки с дефицит по отношение на BLK показва, че BLK влияе върху развитието и пролиферацията както на В, така и на Т-клетките. Промени в неговата експресия се свързват с развитието на редица автоимунни заболявания. Целта на настоящото проучване е да се определи дали полиморфизма rs2736340 в FAM167A-BLK региона е рисков фактор за развитието на ДМ у възрастни в български пациенти. Бяха изследвани 47 (16 мъже и 31 жени) пациента с дерматомиозит и 99 (26 мъже и 73 жени) здрави контроли посредством PCR в реално време. Генотипното и алелното разпределение не показват статистически значима разлика между пациенти и контроли. Няма асоциация с клиничните параметри. Не се наблюдават разлики между пациенти с ДМ и паранеопластичен дерматомиозит ( $p=0.5, 1.3, 0.3-5.5$ ). Полиморфизмът FAM167A-BLK rs2736340 не играе роля за възникването и развитието на дерматомиозит при български пациенти.

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 144/2019 TP53 мутационен статус при не-дребноклетъчен белодробен карцином**

**Докторант:** Вероника Йорданова Петкова

**Научен ръководител:** Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн и Проф. Радка Кънева, дб

**Базова организация:** Катедра по медицинска химия и биохимия, ул. “Здраве” № 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Един от най-важните и най-често мутирвали тумор-супресорни гени е TP53 генът. Той регулира транскрипцията на множество гени имащи участие в ДНК поправката, метаболизма, задържането на клетъчния цикъл, апоптозата и ангиогенеза, имунния отговор и метастазирането. Целта на настоящия проект е анализ на спектъра на мутации, настъпили в TP53 гена при пациенти с НДРБД и тяхната роля в етапите на карциногенеза и прогресията на заболяването. В рамките на настоящия проект бяха изследвани 24 пациента с не-дребноклетъчен рак на белия дроб – 12 аденокарцинома (АК) и 12 плоскоклетъчни карцинома (ПК) чрез директно секвениране по Сангер на кодиращите екзони на TP53 гена. Повечето от мутациите се откриват в ДНК свързващия домен на p53 белтъка, който се кодира от екзони от 5 до 8. При ПК всички открити варианти са миссенс мутации, които променят една аминокиселина в p53 белтъка и влияят по различен начин на пространствена конфигурация. Наблюдава се преобладаване на еднонуклеотидната замяна C>A/G>T, преобладаващия мутационния профил, характерен за тютюнопушетето. При АК се откриват 5 миссенс мутации и две малки делеции – една еднонуклеотидна делеция и една 6 нуклеотидна делеция. В резултат на делециите се измества рамката на четене и се транслира скъсен белтък, който не може да изпълнява основната си биологична роля. При един от пациентите с АК и един пациент с ПК се откриват 2 варианта в TP53 гена. Поради малкият брой на изследваните пациенти, не можа да се докаже статистически значима асоциация на мутациите в TP53 гена и вида на НДРБД, както и с останалите клинично-патологични характеристики. Резултатите от това проучване биха могли да помогнат за по-доброто изясняване патогенезата на това заболяване. За да се потвърди или отхвърли хипотезата, че мутациите в TP53 гена са подходящ маркер при рака на белия дроб, имащи отношение и към прогнозата и избора на терапия, е необходимо увеличаване на изследваната кохорта. Необходимо е и търсене на връзка между мутациите в TP53 и други мутации в туморната тъкан

**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 145/2019 In vitro оценка на възможния протективен ефект на сапонини от род *Astragalus* (*A. membranaceus*, *A. glycyphyllos* и други) при модел на невротоксичност, индуцирана от биотоксини**

**Докторант:** Виктория Божидарова Илиева

**Научен ръководител:** Доц. Магдалена Кондева-Бурдина, дф и Проф. Цвета Георгиева, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Въведен е PCR in real-time като бърз, специфичен и чувствителен метод за качествен и полуколичествен контрол на цианотоксини във водоеми. Разработен е метод за доказване на цианобактерии и за токсични видове *Microcystis*. Във водните басейни Вая, Дуранкулак, Мандра и Пчелина се установява цианобактериална ДНК, а единствено Дуранкулак е положителен за токсични видове *Microcystis*. Пробите от язовир Искър, източник на питейна вода за град София, са отрицателни и по двата изследвани показателя. Върху невробластомна клетъчна линия SH-SY5Y, анатоксин-а, приложен самостоятелно не проявява статистически значим невротоксичен ефект. Върху изолирани синаптозоми обаче анатоксин-а проявява статистически значим невротоксичен ефект при концентрации 500  $\mu$ M. И двата изследвани сапонина проявяват изявен статистически значим невропротективен ефект при модел на анатоксин-а-индуцирана невротоксичност върху изолирани синаптозоми. Сапонинът S1, изолиран от *Astragalus glycyphyllos*, обаче проявява по-изявен статистически значим невропротективен ефект, спрямо сапонин S2, изолиран от *Astragalus glycyphylloides*.

**Научни публикации и прояви:**

- Пиева V, Kondeva-Burdina M, Georgieva T, et al. In vitro toxicity assessment of toxic cyanobacteria as an emerging environmental risk in Europe. 55<sup>th</sup> Congress of the Eur societies of toxicology EUROTOX 2019, 9-11 Sep 2019, Helsinki, Finland
- Пиева V, Shkondrov A, Aluani D, et al. Early detection of toxic cyanobacteria in Bulgarian dam water and *in vitro* evaluation of the effect of saponins from *Astragalus glycyphyllos* and *A. glycyphylloides*, in cyanotoxin (anatoxin- $\alpha$ )-induced neurotoxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)* 2020;30:202-13.

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 146/2019** *In silico* анализ на имуногенни протеини с бактериален произход  
Докторант: Невена Емилова Захаријева

**Научен ръководител:** Проф. Ирини Дойчинова-Цекова, дн и Доц. Иван Димитров

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Идентифицирането на протективни имуногени е най-важната начална стъпка в дългия и скъп процес на дизайн и разработване на ваксини. Методите за машинно обучение (ML) са много ефективни при извличане и анализ на големи бази данни (big data) като микробните протеоми. Те дават възможност последващата експерименталната работа да бъде значително съкратена и процесът по създаването на нова ваксина да бъде ускорен. В настоящото изследване са приложени шест метода за машинно обучение (дискриминантен анализ, базиран на метода на частични най-малки квадрати (PLS-DA), k най-близки съседи (kNN), произволна гора (RF), машини с поддържащи вектори (SVM), метод на произволно подпространство (RSM) и метод на екстремно увеличаване на градиента (xgboost)) върху набор от 317 известни бактериални имуногенни и 317 бактериални неимуногенни протеини и са изведени модели за оценка на имуногенността. Моделите са валидирани чрез вътрешен кръстосан тест в 10 подгрупи на обучаващата

група и от външна тестова група. Всички модели показаха добра оценъчна способност. Моделът xgboost показва най-висока способност за идентифициране на имуногени, като разпозна 84% от известните имуногени във външната тестова група. Комбинираният RSM-kNN модел показва най-висока способност да разпознава неимуногени, като идентифицира 91% от тях в тестовата група.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Dimitrov I, Zaharieva N, Doytchinova I. Immunogenicity prediction by machine learning methods. *Vaccines (Basel)*. 2020 Nov 30;8(4):709.
- Zaharieva N, Doytchinova I, Dimitrov I. Immunogenicity Prediction of Bacterial Proteins by Machine Learning Algorithms. *High performance computing – Bulgaria 2019, Bulgaria, Sep 2-6, 2019, Borovets*.
- Zaharieva N, Doytchinova I, Dimitrov I. Immunogenicity Prediction of Bacterial Proteins by Random Forest Algorithm, oral presentation. 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation, Nov 21-24, 2019, Borovets

#### **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 147/2019 Фракциониране на водно-алкохолен екстракт от *Clinopodium vulgare* L. на базата на биологични тестове**

**Докторант:** Газела Мохамед Насър-Еддин

**Научен ръководител:** Проф. Николай Данчев, дм и Доц. Румяна Симеонова, дф

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

**РЕЗУЛТАТИ:** *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae), е използвано в традиционната българска медицина за лечение на рани, диабет и стомашна язва. Проектът бе насочен към фракциониране на водно – метанолен екстракт от растението, базиран върху биологични анализи. Антиоксидантният капацитет на изследвания екстракт и неговите фракции, е изследван посредством методите: DPPH, ABTS и FRAP. Също така са определени ензим – инхибиторните активности спрямо липидна пероксидация, ацетилхолинестераза,  $\alpha$ -гликозидаза и  $\alpha$ -амилаза. За контрола е използвана розмаринова киселина. Фитохимичният анализ на екстракта и най-активните фракции, бе направен чрез ултра високоефективна течна хроматография (UHPLC) комбиниран с мас-спектрометрия с висока разделителна способност (HRMS). С най – висока радикал улавяща активност, се отличи фракцията CV3 със стойности на IC<sub>50</sub> - 0.02 mg/ml (DPPH), 0.0002 mg/ml (ABTS) и с най-висок желязо редуциращ потенциал - 0.89 mM TE/mg dw. Суровият водно – метанолен екстракт също показва висока активност с IC<sub>50</sub> - 0.05 mg/ml (DPPH), 0.04 mg/ml (ABTS) и 0.89 mM TE/mg dw (FRAP). Също така CV3 показва много добър  $\alpha$ -гликозидаза и умерен  $\alpha$ -амилаза инхибиторен ефект. На основата на точните маси, MS/MS и сравнение с литературните данни, във водно – метанолния екстракт са установени: 7 флавоноида, 2 изомера на кафеената киселина, 7 димера на кафеената киселина, 8 тримера на кафеената киселина и 2 тетрамера на кафеената киселина. Розмариновата киселина е основен компонент в суровия екстракт. Във фракция CV3, основната съставка е



клиноподиева киселина О, придружена от салвианолова киселина А с нейните изомери, както и розмаринова киселина. Идентифицирани са и флавоноидите нарингенин – О – хексуронид и изокверцитрин. В заключение, изследваният екстракт и фракции от *C. vulgare*, съдържат голямо разнообразие от фенилпропаноиди с антиоксидантен и ензим – инхибиторен потенциал. Профилът, получен от UHPLC-HRMS, показва *C. vulgare* като нов, богат източник на водноразтворими олигомери на кафеената киселина.

**Научни публикации и прояви:**

- Nasar-Eddin G, Simeonova R, Zheleva-Dimitrova D, et al. Phenylpropanoids from *Clinopodium vulgare* with antioxidant activity. 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 Jun 2019
- Nasar-Eddin G, Simeonova R, Zheleva D, et al. *Clinopodium vulgare* and its major constituent rosmarinic acid, protect against scopolamine-induced oxidative stress in rat brain. 7th Congress of Pharmacy with international participation. Borovets, Bulgaria. 21-24 Nov 2019

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 120/2018 Изследване на сърдечно-съдови рискови маркери при пациенти със захарен диабет тип 1 с и без метаболитен синдром**

**Докторант:** д-р Мина Стефанова Сердарова-Евтимова

**Научен ръководител:** Проф. Д-р Цветалина Танкова, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел: Да се изследва разширен липиден профил, серумен остеопонтин и някои маркери на ендотелна дисфункция – ендотелин-1, sE-селектин и VEGF-A при пациенти със захарен диабет тип 1 (ЗДТ1) с и без метаболитен синдром (МС) и да се сравнят нивата на тези показатели спрямо лица с нормален глюкозен толеранс с и без метаболитен синдром. Материали и методи: В настоящото крос-секционно проучване са включени 96 лица разделени в 4 групи: 24 лица със захарен диабет тип 1 с метаболитен синдром (ЗДТ1+МС), 24 лица със ЗДТ1 без МС, 24 лица с нормален глюкозен толеранс (НГТ) с МС, 24 лица с НГТ без МС. При всички пациенти са измерени антропометрични показатели и артериално налягане и са изследвани: плазмена глюкоза на гладно, гликиран хемоглобин, разширен липиден профил - общ, HDL-, LDL-холестерол, триглицериди, липопротеин (а), аполипопротеин А1, аполипопротеин В100, пикочна киселина, креатинин, чернодробни трансаминази, ендотелин-1, sE-селектин, VEGF-A, остеопонтин и hsCRP. Отношението албумин/креатинин (ACR) е изследвано в първа сутрешна урина. Анализът на телесния състав е направен с биоимпедансно изследване с апарат InBody 720 (BIOSPACE). Тъканното натрупване на крайни продукти на гликирането (AGEs) е определено с апарат AGE Reader. Резултати: Установи се значимо по-високи нива на кръвната захар на гладно, артериалното налягане, HDL-холестерола и триглицеридите в групите с МС. ACR и AGEs са значимо по-високи в групата със ЗДТ1 и МС спрямо НГТ. В групите със захарен диабет тип 1 се наблюдава по-ниски нива на пикочна киселина и по-високи нива на HDL-холестерол спрямо кореспондиращите им по МС групи с НГТ. Аполипопротеин А1, липопротеин (а), остеопонтин и ендотелин-1 маркират пациенти с по-висок риск при ЗДТ1, независимо от наличието на метаболитен синдром. Изводи: Гликемията е независим рисков фактор за ендотелна дисфункция и нискостепенно възпаление при ЗДТ1. АпоА1, липопротеин (а), ендотелин-1 и остеопонтин са свързани с по-висок сърдечно-съдов риск при пациентите със захарен диабет тип 1 с и без метаболитен синдром.

**Научни публикации и прояви:**

- Serdarova M, Dimova R, Chakarova N, et al. Relationship between cardiac autonomic neuropathy and cardio-metabolic risk profile in adults with type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2021 Feb 25;174:108721.

**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 121/2018    Оценка на прокалцитонин като диагностичен и прогностичен маркер при диабетно стъпало**

**Докторант:** Ани Стефанова Тодорова

**Научен ръководител:** Проф. Цветалина Танкова, дмн

**Базова организация:** Катедра по Ендокринология, ул. „Здраве“ № 2, София

**РЕЗУЛТАТИ:** Цел на настоящото проучване е да сравни диагностичната ефективност на прокалцитонин (PCT) и високо чувствителен С - реактивен протеин (hsCRP) при пациенти с диабет и лека до средно тежка инфекция при диабетно стъпало. Общо 119 пациенти (102 със Захарен диабет тип 2 и 17 със Захарен диабет тип 1), на средна възраст  $60.29 \pm 10.05$  години, разпределени в три групи – пациенти с диабетно стъпало с язва и активна инфекция (ИДС, n=41), диабетно стъпало с язва без клинични белези на инфекция (НИДС, n=35) и контролна група пациенти с диабет без диабетно стъпало (n=43). Тежестта на инфекцията бе оценена според препоръките на Международната Група за Изучаване на Диабетно Стъпало – групата НИДС бе определена като Степен 1, групата ИДС бе разделена на подгрупи с лека инфекция или Степен 2 (n=22) и със средно тежка инфекция или Степен 3 (n=19). Серумния hsCRP бе измерен по имунотурбидиметричен метод и PCT по ЕСLIA метод. Левкоцитния брой е оценен с Медоник хематологичен анализатор и СУЕ по метода на Вестергрен. Серумните нива на hsCRP, броя на левкоцити и СУЕ са значимо по-високи в групата с ИДС в сравнение с групата с НИДС и контролната група, докато нивата на PCT не се различават между групите. hsCRP демонстрира по-висока чувствителност (80%) и специфичност (79%), площ под кривата - 0,856, в сравнение с PCT (чувствителност 63%; специфичност 62%, площ под кривата - 0,617) при пациентите с ИДС, както и в подгрупата със Степен 3 инфекция (84 % чувствителност и специфичност, площ под кривата - 0,911). Комбинираният модел от двата маркера няма по-добра диагностична точност спрямо hsCRP самостоятелно. В заключение hsCRP изглежда е по-добър диагностичен биомаркер от PCT при диагностицирането на умерено тежка инфекция на язва при диабетно стъпало. И двата маркера са неефективни за диагноза на лека инфекция. PCT не е ефективен като прогностичен маркер при инфекции на диабетно стъпало.

**Научни публикации и прояви:**

- Todorova A, Dimova R, Chakarova N, et al. Comparative evaluation of the diagnostic value of procalcitonin and hsCRP for the presence of mild to moderate diabetic foot infections. Int J Low Extrem Wounds. 2021 Apr 28;15347346211011849.

**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 123/2018    Генен експресионен анализ на избрани гени и сравнение със серумните нива на техните продукти при български пациенти с доброкачествени възли на щитовидната жлеза и с папиларен тиреоиден карцином**

**Докторант:** Инна Димитрова Димитрова

**Научен ръководител:** Проф. Русанка Ковачева, дм и Проф. Радина Иванова, дмн

**Базова организация:** Катедра по ендокринология, ул. Здраве № 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се изследва генната експресия на TIMP1 и SH3L1 в клетъчен материал от тънкоиглена пункционна биопсия (ТПБ) и да се сравни със серумното ниво на техните генни продукти - тъканен инхибитор на металопротеиназа-1 (TIMP-1) и UKL-40 при пациенти с доброкачествени възли на щитовидната жлеза и папиларен тиреоиден карцином (ПТК). Бяха включени 80 пациенти, 40 с цитологично доказани доброкачествени възли на щитовидната жлеза и 40 с ПТК. При половината от тях (20 с доброкачествени възли и 20 с ПТК) се извърши експресионен анализ на гените TIMP1 и SH3L1 с real-time PCR в цитологичен материал, получен при рутинни ТПБ. При всички 80 пациенти, включени в проучването, се изследва серумното ниво на генните продукти (TIMP-1 и UKL-40). Пациентите с доброкачествени възли на щитовидната жлеза не се различават по пол и по възраст от пациентите с ПТК (жени:мъже=9:1;  $40.75 \pm 11.0$  г. в групата на доброкачествените възли срещу  $40.50 \pm 11.7$  г. в групата на ПТК,  $p=0.922$ ). Установи се по-високо ниво на експресия на двата гена в групата на ПТК в сравнение с групата на доброкачествените възли ( $p<0.001$  за TIMP1;  $p<0.018$  за SH3L1). Серумният TIMP-1 бе по-висок при пациенти с ПТК отколкото с доброкачествени възли ( $93.6 \pm 23.4$  ng/ml срещу  $82.9 \pm 19.9$  ng/ml,  $p=0.033$ ), като за UKL-40 такава разлика липсваше ( $85.8 \pm 54.3$  ng/ml в групата на доброкачествените възли срещу  $85.4 \pm 38.0$  в групата на ПТК),  $p=0.447$ ). Корелация между генната експресия на TIMP1 и SH3L1 и серумните нива на техните протеинови продукти (TIMP-1 и UKL-40) не беше установена. Диференциращата експресия на TIMP1 и SH3L1 при ПТК предполага, че тези гени имат роля в патогенезата му. Установената липса на корелация между генната експресия на TIMP1 и SH3L1 и серумните нива на техните протеинови продукти може да се дължи на влиянието на посттранскрипционните механизми върху протеиновата синтеза, както и на комплексната структура на периферната кръв.

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 125/2018 Оптимизация на хемодинамичния контрол по време на лапароскопска адреналектомия**

**Докторант:** Гергана Русева Иванова

**Научен ръководител:** Доц. Маргарита Атанасова, дм

**Базова организация:** Катедра по Анестезиология и интензивно лечение, бул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Основен метод за лечение на адреналните тумори е лапароскопската адреналектомия. Периоперативният мениджмънт на хемодинамиката при тези операции е труден, поради продуцираните от жлезата хормони, които имат основна роля в контрола на артериалното налягане. Целта на настоящото изследване е оптимизацията на контрола на хемодинамиката при мини-инвазивна адреналектомия чрез инвазивно измерване на артериалното налягане. Последното се осъществява чрез канюлация на a.radialis и се измерва систолно и диастолно налягане чрез интраартериален трансдюсер на подлежащата ръка при поставяне на пациента в странично положение. Неинвазивното артериално налягане се измерва по осцилометричен метод на надлежата ръка. Сравняват

се измерванията на инвазивното и неинвазивното артериално налягане в пет ключови момента от периоперативния период – след увода в анестезия, при поставяване на пациента в странично положение на операционната маса, при създаване на ретропневмоперитонеум, при манипулиране върху жлезата и тумора, при клампиране на v.centralis. Получените резултати и направеният статистически анализ показаха, че разликата в информативността на данните, получени по инвазивна и неинвазивна методика, е пренебрежима при оперативни интервенции по повод хормононепродуциращи тумори, рецидивиращи тумори, Къшинг аденоми, Кон аденоми и метастатични тумори. При адреналектомии по повод феохромоцитом измерването на инвазивно артериално налягане има съществено предимство пред измерването на неинвазивното артериално налягане за контрол на хемодинамичните промени и оптимизация на терапевтичния подход. От представените данни могат да се направят следните изводи: измерването на неинвазивно артериално налягане носи достатъчна информативност за адекватен хемодинамичен контрол по време на лапароскопска адреналектомия по повод хормононепродуциращи аденоми, рецидивни аденоми, Къшинг аденоми, Кон аденоми и метастатични тумори; инвазивното артериално налягане не е необходимо да се включва в стандартния хемодинамичен мониторинг при посочените патологии; измерването на инвазивно артериално налягане при лапароскопски адреналектомии по повод феохромоцитом трябва да се включва стандартно в периперативния мониторинг. Получените резултати и направените изводи са на базата на изследване при едва 20 (двадесет) пациенти, което налага по-нататъшни проучвания за потвърждаване на резултатите.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Иванова Г, Атанасова М, Цонева Д, и др. Оптимизация на хемодинамичния контрол по време на лапароскопска адреналектомия. Хирургия 2019;1

#### **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 126/2018 Имуноглобулинов и антителин профил при пациенти с ТАО – потенциал за прогнозиране ефективността на приложената терапия**

**Докторант:** Мария Асенова Стойнова

**Научен ръководител:** Проф. Русанка Ковачева-Георгиева, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се потърси връзка между нивата на някои имуноглобулини и антитела и клиничните аспекти на тиреоид-асоциираната офталмопатия (ТАО) и да се проучи потенциалът им за прогнозиране ефективността на глюкокортикоидната (ГК) терапия. В проучването са включени 120 пациенти с Базедова болест (ББ), средна възраст 50 г., жени - 87%, разделени в 3 групи: ББ без ТАО/ТАО, лека форма/ТАО, умерена-към-тежка форма; 40 здрави контроли. При всички са изследвани нивата на ANA, IgE и IgG4 чрез ELISA. Информация относно нивата на TRAb, TAT и TPO е взета от медицинската документация. При пациентите, показани за системна ГК терапия (n=42), се проследи динамиката на TRAb. Липсваше значима разлика по отношение на възрастта и половото

разпределение между четирите изследвани групи. TRAb не се различаваше при пациентите с ББ с и без ТАО, както и при различна по тежест ТАО. Процентът на позитивни ТРО и ТАТ беше значимо по-висок сред пациентите с ББ без ТАО спрямо пациентите с ТАО (70% срещу 46.3% за ТРО; 60% срещу 31.3 за ТАТ). При ТАО се наблюдаваше значимо по-висок процент на позитивни ANA в сравнение с ББ без ТАО и здравите контроли (36% срещу 20% срещу 2,5%). При ББ с и без ТАО значимо по-често се откриваха повишени титри на IgE спрямо здрави контроли (13.3% срещу 2.5%). IgG4>2500 ng/ml наблюдавахме само при шестима от пациентите - петима с ТАО (четирима с умерена-към-тежка форма) и един с ББ без ТАО. Установихме по-изразено релативното намаляване на TRAb (64% срещу 40%,  $p<0.05$ ) и значимо по-нисък процент на позитивни ANA сред пациентите с пълен отговор на ГК терапия. Релативното намаление на TRAb и ANA могат да се използват за прогнозиране на отговора на ГК лечение. ANA и IgG4 вероятно участват в патогенезата на някои форми на ТАО.

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 127/2018 Нови подходи за оценка на бъбречната функция при пациенти с хронични вирусни хепатити и различна степен на хронично бъбречно заболяване**

**Докторант:** Мария Димитрова Петкова

**Научен ръководител:** Проф. Красимир Антонов дмн и Проф. Емил Димитров дмн

**Базова организация:** Катедра Вътрешни болести, ул. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да оценим тежестта на бъбречната увреда чрез изследване серумната концентрация на NGAL (сурогатен маркер за остро бъбречно увреждане) при наличие на активна вирусна HCV – инфекция в българската популация в група пациенти с хронично бъбречно заболяване и бъбречно-трансплантирани болни. След ерадикация на HCV-инфекцията се наблюдава подобряване на бъбречната функция при пациенти в разнородни стадии на ХБЗ, което кореспондира с понижаване стойностите на серумния NGAL – маркер за остра бъбречна увреда. Стойностите на серумния NGAL кореспондират с тежестта на бъбречната увреда, като при по-тежките степени на ХБЗ ( 4-та и 5-та) се наблюдават статистически значимо по-високи стойности на изследвания показател. В изследваната група се наблюдава силна обратна корелация между гломерулната филтрация 1 година след приключване на противовирусното лечение и стойностите на NGAL в серума. Показателите за редукция на чернодробното възпаление ACAT, APRI проследени 1 година след лечение корелират с гломерулната филтарция ( $p=0.02$ , при  $r_s = 889$ , Pearson), което показва, че подобряването на чернодробната и подобряването на бъбречната функция са взаимно свързани. В подкрепа на това твърдение е и корелацията на серумния албумин (свързан с чернодробната функция), с гломерулната филтрация при проследяване ( $p=0.03$ , при  $r_s = 846$ , Pearson). Серумният билирубин в израз на чернодробната синтетична функция също корелира с гломерулната филтрация при проследяване, като  $p=0.05$ , но при нисък  $r_s = 286$ , Pearson. Установява се статистически значимо подобрене в чернодробната функция при всички пациенти по отношение на

следните показатели – серумен албумин, серумен билирубин, протромбиново време, АЛАТ, АСАТ, при висока достоверност :  $p < 0.001$ , и висок  $r_{s} > 0.571$ .

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 128/2018** Имуномодулаторен ефект на секретирани от човешки мезенхимни стволови клетки разтворими фактори, осъществяван върху Т-хелперни лимфоцити, добити от периферна венозна кръв от пациенти с ревматоиден артрит

Докторант: Георги Христов Василев

Научен ръководител: Проф. Доброслав Кюркчиев, дмн

Базова организация: Катедра по клинична имунология, бул. Акад. Ив Гешов 15, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Периферни моноклеарни клетки, добити от 15 пациента с ревматоиден артрит бяха разделени на две, едната част беше култивирана със среди за клетъчно култивиране (контролна среда), а другата част със кондиционирани среди от стволови клетки. След 72-часов инкубационен период клетките бяха изследвани посредством флоуцитометрия, получените от клетъчното култивиране среди след това бяха тествани посредством имуноензимен метод (ELISA) за наличието на IL-6, PGE<sub>2</sub>, VEGF, IL-17A. В кондиционираните среди от адипозно тъканни мезенхимни стволови клетки (AT-MCK) бяха детектирани всички от изследваните цитокини съответно в концентрации: IL-6 (250 pg/ml, Min-Max 210-290 pg/ml), sVEGF (3069 pg/ml, Min-Max 2499-3639 pg/ml), PGE<sub>2</sub> (249 pg/ml., Min-Max 200-298 pg/ml.), IL-17A (2 pg/ml, Min-Max 2.1-2.9 pg/ml). Под действие на средите от AT-MCK наблюдавахме сигнификантно понижение в нивата на IL-17A (4.2 pg/ml IQR 3.1–6.1 pg/ml vs 2.3 pg/ml, IQR 0.75–5.42 pg/ml,  $p = 0.021$ ).

**Научни публикации и прояви:**

- Vassilev G, Ivanova M, Ivanova-Todorova E, et al. Secretory Factors Present In AT-MCK Conditioned Medium Exert Immunosuppressive Effect On T Helper Cells In Rheumatoid Arthritis In Vitro. VII Int Workshop “Autoimmunity in 2019: The good and the bad news”. Pleven, Hotel Balkan, Bulgaria, 10-11 April, 2019.
- Vasilev G, Ivanova M, Ivanova-Todorova E et al. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate th17 and increase tper. Cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. Rheumatol Int (2019) 39: 819-26.

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 135/2018** Честота и спектър на мутациите в Р1К3СА-гена в българска популация от пациенти с рак на гърдата

Докторант: Славяна Славчева Ушева

**Научен ръководител:** Доц. Теофил Седлоев, дм

**Базова организация:** Катедра по гастроентерология, ул Бяло море 8, София 1527

**РЕЗУЛТАТИ:** В ерата на персонализираната медицина генетичните фактори привличат все по-голямо внимание, смятани за най-отговорни за процесите на инициация, прогноза и терапевтична резистентност при всички видове онкологични заболявания. Важен интрацелуларен сигнален път, детерминиращ туморния клетъчен растеж, включително при рака на млечната жлеза (РМЖ), представлява phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/Akt/mammalian, явяващ се мишена на геномни аберации - мутации, амплификации и пренареждания. Централна роля в него има PIK3CA-онкогенът. Неговите мутации се срещат с честота около 30% при РМЖ, като най-често засягат екзон 9 и 20 и са на второ място след TP53-мутациите. В настоящия проект беше проведен молекулярно-генетичен анализ на 50 пациентки с хистологично и имунохистохимично верифициран чрез tru-cut биопсия инвазивен карцином на гърдата на средна възраст 56 години (34-82 г.), лекувани в Клиниката по хирургия на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, МУ София. 30% от болните бяха диагностицирани с мултифокален карцином. Болните бяха сепарирани в 3 групи въз основа на рецепторния си статус: група на тройно-негативните карциноми – n=18 (36%), на ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> тумори с негативен нодален статус – n=16 (32%) и на ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> с позитивен нодален статус – n=16. Изолира се ДНК от туморната тъкан с помощта на QIAamp DNA Mini Kit на Qiagen. След методична подготовка се извърши директно секвениране на екзони 9 и 20. Общо при 18% от изследваните тумори беше установен соматичен вариант на PIK3CA-мутация с патогенен ефект за развитието на заболяването. С най-висока честота беше вариантът c.3140A>G, p.Glu545Gly (H1047R) в екзон 20, следван от c.1634A>G, p.Glu545Gly в екзон 9. Обобщено това представляват 6 мутации в екзон 20 и 3 в екзон 9. Тези първоначални резултати демонстрират високата честота на мутации на този онкоген в българската популация от болни и затвърждават ролята му в епителната карциногенеза при РМЖ. Тези мутациите не са ексклузивни за специфична субгрупа на карцинома на гърдата, т.е засягат различни сигнални пътища от тези на ER, PR и HER2.

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 136/2018** Генетични маркери за прогресия на неалкохолната стеатоза при хроничен вирусен хепатит С

**Докторант:** Доника Красиминова Кръстева

**Научен ръководител:** Проф. Асен Алексиев, дм и Проф. Радина Иванова, дмн

**Базова организация:** Катедра по Вътрешни болести, бул. “Акад. Иван Гешов“ 15, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Известно е, че носителите на PNPLA3 rs738409[G] мутацията са предразположени към поява и прогресия на стеатоза и фиброза, развитието на чернодробна цироза и/или хепатоцелуларен карцином (ХЦК) на фона на метаболитно, алкохолно или вирусно чернодробно увреждане. Целта на изследването беше да оценим наличието на PNPLA3 rs738409[G] мутацията при болни с хроничен вирусен хепатит С,



генотип 1, с и без придружаваща неалкохолна стеатоза, с оглед генетичния риск от прогресиране на чернодробното увреждане. В проучването бяха включени 62 пациента (20 мъже и 42 жени, на средна възраст  $52.65 \pm 11.83$  г, от 26 до 80 г), хоспитализирани в клиниката по гастроентерология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ по повод хроничен вирусен хепатит С, генотип 1. Пациентите бяха разделени в 2 групи според наличието на хистологично диагностицирана стеатоза в чернодробната биопсия. При всички пациенти бе извършен генетичен анализ за наличие на rs738409[G] мутации на PNPLA3 гена. Оценката на връзката между наличието на мутация и риска за прогресия на чернодробното заболяване с оглед наличието на стеатоза и стадия на фиброза извършихме при контролното проследяване на пациентите на 2-рата година след постигнатата успешна ерадикация на хроничната хепатит С вирусна инфекция посредством неинвазивни сурогатни маркери. Честотата на мутацията на PNPLA3 rs738409[G] (I148M) при болните с ХВХ С е висока и достига 42%, с относително равен дял на хомо- и хетерозиготното носителство. Наличието на стеатоза при пациентите с ХВХ С е свързано с тенденция за по-висока честота на носителство на мутацията в сравнение с липсата ѝ. Няма пряка връзка между мутацията на PNPLA3 rs738409[G] (I148M) и метаболитните нарушения при болните с ХВХ С. За разлика от това, метаболитният синдром и наднорменото тегло/затлъстяването корелират с чернодробната стеатоза. Подобриенето на фиброзата оценено с неинвазивни сурогатни маркери постигнато с ДДАС не зависи от носителството на мутацията и наличието на стеатоза.

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 148/2018 Създаване на биобанка на пациенти за клинично-генетично проучване на miRNA експресионен профил при коронарна атеросклероза**

**Докторант:** д-р Михаил Бориславов Ганев

**Научен ръководител:** Чл-кор. проф. Драга Тончева, дбн и Доц. Савина Хаджидекова, дм

**Базова организация:** Катедра по медицинска генетика, ул. „Здраве“ 2; София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Заложените по проекта задачи бяха изпълнени. Събрани са кръвни проби от 35 пациенти с коронарна атеросклероза и 15 здрави индивиди. От всички кръвни проби, с кит за изолиране на РНК от плазма, се изолира тотална РНК. Извърши се качествен и количествен контрол на изолираната РНК. Осъществи се преференциална обратна транскрипция на микро РНК в кДНК. Определи се качеството и количеството на кДНК, съгласно протокола на производителя и са записани в създадено за целта електронно досие на пациента. Извърши се кодиране и описание на всички проби. Оптимизираха се техники за изолиране на РНК и превръщането и в кДНК. Създаде се база данни за пациентите и контролите, достъп до която имат само членовете на изследователския екип. Създадената биобанка ще бъде основа на бъдещи проучвания върху експресионни профили на микро РНКи, свързани с регулацията на активността на гени, участващи в патогенезата на атеросклерозата.

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 121/2019 Хепатокини и тяхната връзка с неалкохолната стеатозна болест и метаболитния синдром при пациенти със затлъстяване и предиабет****Докторант:** Вера Начева Карамфилова**Научени ръководители:** Проф. Здравко Каменов дмн и Проф. Людмила Матева дмн**Базова организация:** Катедра по вътрешни болести, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В проучването бяха включени 82 души с ехографски установена чернодробна стеатоза разделени на две групи - *група 1* със затлъстяване без въглехидратни нарушения (n=46) и *група 2* със затлъстяване и предиабет (n=36). Средната възраст на участниците в проучването е 50,22±10,86 години. Установихме сигнификантно по-високи стойности на фибробластен растежен фактор 21 (FGF-21) в групата на НАСБ, затлъстяване и предиабет в сравнение с групата със затлъстяване и НАСБ без въглехидратни нарушения (450.98±264.82 vs. 360.60±298.09 pg/ml, p=0.010). FGF-21 е с повишена експресия и при лицата с НАСБ и метаболитен синдром, както и при тези с НАСБ инсулинова резистентност и дислипидемия, в сравнение с пациенти със затлъстяване и НАСБ без метаболитен синдром, дислипидемия и инсулинова резистентност (p<0.01, p=0.020 и p= 0.04, съответно). FGF-21 корелира с VLDL, TG, ГГТ, кръвна захар на 60 мин. и на 120 мин. от ОГТТ. Не се установява корелация между FGF-21 и показателите за микро- и макроангиопатия, както и с изследваните фиброзни скорове. При нива на FGF-21 ≥ 320 pg/ml рискът за възникване на въглехидратни нарушения е около 4,2 пъти по-висок спрямо този на пациентите с по-ниски стойности (p=0.002). При нива на FGF-21 ≥ 270 pg/ml рискът за възникване на метаболитен синдром е около 4 пъти по-висок спрямо този на пациентите с по-ниски нива (p=0.006), както и при стойности ≥ 260 pg/ml рискът за възникване на инсулинова резистентност е около 3,2 пъти по-висок спрямо този на пациентите с по-ниски нива (p=0.024). Не се установи корелация между Фетуин А, Ангиопоетин-свързан растежен фактор и SHBG с въглехидратните нарушения, метаболитния синдром и инсулиновата резистентност, както и с изследваните фиброзни скорове. Налице е слаба корелация между Фетуин А и индекса глезен-мишница (p=0.221).

**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 122/2019 Изследване на ролята на МІСА и МІСВ полиморфизма на алелно ниво при дълголетие****Докторант:** Бушра Набил Ал Хадра**Научен ръководител:** Проф. Милена Иванова-Шиварова, дм**Базова организация:** Катедра по Клинична имунология, Св. Георги Софийски 1. София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Дълголетие то от части е асоциирано с гени, регулиращи имунологичните функции, като полиморфизмът на тези гени може да повлияе процесите на „успешно остаряване“ чрез модулиране на отговора на индивида към възрастово-асоциирани заболявания. В настоящето проучване за пръв се анализира MICA и MICB полиморфизма на алелно ниво чрез използване на секвениране от следващо поколение и са идентифицирани разширени HLA профили при дълголетници от здравата българска популация. Положителна асоциация със стареенето е установена за *MICB\*002:01* ( $P=0.00055$ ), който е описан като протективен при автоимунни заболявания. За MICA не се установява наличие на статистически значима такава. Анализ на HLA-B-MICA хаплотипното разпределение установява наличието на три хаплотипа със статистически значима повишена честота при възрастни: *B\*35-MICA\*016* ( $P=0.02$ ), *B\*57-MICA\*017* ( $P=0.049$ ) и *B\*08-MICB\*002:01* ( $P=0.04$ ). Два от хаплотипите се наблюдават със статистически значима повишена честота и при анализ на HLA-A-B-MICA три локусните хаплотипи, където се установяват четири позитивни асоциации с дълголетие то: *A\*02:01-B\*57:01-MICA\*017* ( $P=0.01$ ), *A\*01:01-B\*35:02-MICA\*016* ( $P=0.039$ ), *A\*01:01-B\*15:17-MICA\*008:01* ( $P=0.039$ ), *A\*01:01-B\*38:01-MICA\*002:01* ( $P=0.039$ ). Анализ на MIC-DRB1 хаплотипното разпределение идентифицира позитивна асоциация с процесите на стареене за следните хаплотипи: *MICA\*008:01-DRB1\*11:04* ( $P=0.0005$ ), *MICA\*008:01-DRB1\*13:01* ( $P=0.04$ ) и *MICB\*002:01-DRB1\*03:01* ( $P=0.02$ ). Получените данни, съвпадат с предходни резултати на екипа върху класическите HLA гени, като разширяват познанията относно HLA асоциацията с продължителността на живот, като обхващат и неklasическите MIC. Интересно е наблюдението за HLA-B\*35:02-MICA\*016, за който се открива позитивна асоциация с дълголетие то при няколко различни проведени хаплотипни анализа. HLA-B\*35:02 алела от хаплотипа е описан като протективен при хематологична неоплазия, докато A5 трансмембранный полиморфизъм характерен за MICA\*016 алела е описан като протективен за карциноми при кавказоиди. Данните от това проучване са в съгласие с хипотезата, че вероятно дълголетие то се определя от селекцията на HLA алели и хаплотипи осигуряващи защита срещу живото-заstrашаващи заболявания. Идентифицирането на популационно специфични имуногенетични детерминанти, свързани с продължителността на живот и устойчивостта към възрастово асоциирани заболявания ще допринесе за развитието на стратегии за възстановяване на имунната система и превенция на репликативното стареене.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Ал Хадра Б, Луканов Ц, Цицелкова Л, и др. Оценка на нова секвенционна технология. 34 Европейска конференция по имуногенетична и тъканна съвместимост. 26-29.04.2020, Глазгоу, Шотландия.

#### **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 123/2019 Роля на адипокините в развитието на диабетното стъпало**

**Докторант:** Цветан Владимиров Гатев

**Научен ръководител:** Проф. Здравко Каменов, дмн и Доц. Добрин Йтков Василев, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Диабетното стъпало е напреднало усложнение на захарния диабет, което е свързано с тежка инвалидизация и висока смъртност при засегнатите хора. В неговата патогенеза участват множество фактори, като не всички са изяснени. Целта на настоящето изследване е да утвърди влиянието на анализирани адипоцитокини, както и на някои неврологични и съдови фактори върху развитието на диабетно стъпало. В проучването бяха включени 80 пациенти със захарен диабет тип 1 и 2, разделени в 2 групи – без (n=44) и с диабетно стъпало (n=36). Бяха направени стандартни антропометрични изследвания и определяне на телесен състав чрез апарат на импедансен биоелектричен принцип. Чрез ELISA метод бяха измерени плазмените нива на адипокините – Хемерин, Висфатин и Ретинол свързващ протеин-4. За оценката на неврологичните фактори бяха използвани: Neuropathy disability score (NDS), оценка на вибрационен праг чрез Биотезиометър, судомоторно изследване със Судоскан, както и въпросниците – MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument) и NSS (Neuropathy Symptom Score). Съдовите фактори бяха изследвани чрез изчисляване на индекс глезен/мишница (ABI) и ултразвуково измерване на дебелината на интима медиа на общата каротидна артерия (IMT). Установиха се значимо по-ниски плазмени нива на Хемерин при хората с диабетно стъпало, в сравнение с другата група. Контингентът с диабетно стъпало имаше по-високи NDS, вибрационен праг и MNSI сбор, по-нисък ABI както и по-ниска Судоскан проводимост на ръцете и краката, при по-голяма судомоторна асиметрия на стъпалата. Тези методи се доказаха с добра дискриминативна и предиктивна стойност за диабетно стъпало. По-ниските нива на Хемерин, в комбинация с описаните неврологични и съдовите фактори, биха могли да се включват на различни нива в патогенезата на диабетното стъпало. Необходими са допълнителни проучвания, за да се разяснят потенциалните механизми, подлежащи на наблюдаваните асоциации.

**Научни публикации и прояви:**

- Gatev T, Vassilev D, Poromanski I et al. “Adipocytokines (Chemerin, Visfatin and Retinol Binding Protein 4) and diabetic foot”, 19<sup>th</sup> Int Congress of Endocrinol 2021, 24-28 Feb 2021

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 124/2019 Нови маркери за оценка на бета-клетъчната функция и сърдечно-съдовия риск при пациенти със затлъстяване и нормална въглехидратна обмяна и такива с предиабет и новооткрит захарен диабет**

**Докторант:** Ивета Славянова Недева

**Научен ръководител:** Проф. Здравко Каменов, дмн

**Базова организация:** Катедра по вътрешни болести, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Известно е, че промените в ендотела са първата стъпка от каскадата на патофизиологични процеси, свързани с развитието на атеросклеротичната плака. Непрекъснато се откриват нови биомаркери, показващи тясна корелация със съдовия

ендотел и бета-клетъчна функция като особен интерес представлява връзката им с различните етапи на нарушена глюкозна хомеостаза при пациенти със затлъстяване. В нашето проучване бяха включени 163 пациенти на средна възраст  $52,45 \pm 11,27$  години, разделени в четири групи - група 1- здрави контроли (n=42), група 2 със затлъстяване без въглехидратни нарушения (n=40), група 3 с предиабет (n=42), група 4 с новооткрит захарен диабет (n=39). Установихме, че нивата на серумния Неоптерин са сигнификантно по-високи при пациентите със затлъстяване и предиабет, в сравнение със здравите контроли, както и спрямо лицата с новооткрит захарен диабет. Нивата му корелират позитивно с ИТМ, обиколката на талията, отношението т/х, т/р, кръвната захар на гладно и серумните триглицериди. Нивата на Неоптерин  $\geq 0,47$  – увеличават с 2,7 пъти риска за развитие на въглехидратни нарушения, а тези  $\geq 0,56$  – с около 6 пъти риска за затлъстяване. Не се установиха статистически значими разлики в нивата на Секретагогина сред здравите контроли и пациентите със затлъстяване и нарушение във въглехидратната обмяна. Липсваше корелация между маркера и изследваните лабораторни и инструментални показатели. Еднствена слабо позитивна корелация се установи с дебелината на интима-медиа.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Nedeva I, Gateva A, Assyov Y, et al. Neopterin in the Evolution from Obesity to Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Metab Syndr Relat Disord*. 2021;19(4).

#### **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 126/2019    Генетични основи на кардиомиопатиите при пациентите от български произход**

**Докторант:** Моника Иванова Шумкова

**Научен ръководител:** Доц. Добрин Василев, дм

**Базова организация:** Катедра вътрешни болести, бул. Георги Софийски 1, софия 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Настоящото проучване включва четирима пациенти с дилатативна кардиомиопатия (ДКМП) и изключена вторична форма на заболяването. Участниците са мъже между 40 и 50 г. Методиката, която е използвана е New-Generation Sequencing с панел TruSight Cardio Sequencing Panel, включващ общо 207 гена, свързани със сърдечно-съдови заболявания. И при 4та пациенти се регистрират мутации в гени отговорни за ДКМП. При двама от тях се отчитат различни *missence* мутации в гена за титина. При изследването на пациентите се установиха две нови, неописани до момента мутации в гените за титин и АВСС9. При пациент №1 се регистрират мутации в гена за белтъка титин - два хетерозиготни варианта - TTN:c.98716G>A (p.Val32906Ile) и TTN:c.72766A>G (p.Asn24256Asp), мутация в гена за актинин - c.1040C>T (p.Thr347Met) и мутация в гена за алфа-субеденицата на волтаж-зависимите натриеви каналчета (SCN10A) - c.3674T>C (p.Ple1225Thr). При пациент №2 се намериха две мутации в гена за титина - c.54703C>T (p.Arg18235Cys) и c.47090G>C (p.Arg15697Pro), която е нова неописана до момента мутация. При него се наблюдава и мутация в гена за белтъка филамин - c.5071G>A

(p.Asp1691Asn). От скрининга на пациент № 3 се установиха мутации в гена за белтъка десмин - с.407T>A (p.Leu136His). При последния пациент се открива неописана до момента *splice* мутация в гена за белтъка ABCC9: с.3567-5T>C. Откритите мутации са редки, определени като такива с неясно клинично значение. Наличието на ДКМП с изключена вторична причина, ниската честота на мутациите в популацията, литературните данни за изследваните гени и тяхната асоциация с кардиомиопатии, ни дава основание да смятаме че тези мутации участват в патогенезата на заболяването. При част от тях има генотипно-фенотипна корелация. Откриването на мутации и установяването на наследствен компонент води до последващ скрининг на роднините и търсене на носителство на заболяването или клинична изява. Това от своя страна подпомага откриването на високо рискови групи и тяхното проследяване.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Shumkova M, Vassilev D, Karamfilov K. Left ventricular non-compaction with a dilative phenotype and novel genetic mutations. *Kardiol Pol.* 2021;79(6):716-7.

#### **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 132/2019 Откриване на субклиничните форми на синдром на Кушинг при пациенти с надбъбречни инциденталомии посредством LC-MS изследване на разширен стероиден профил в серум и урина**

Докторант: Анелия Бойдева Нанкова

Научен ръководител: доц. Атанаска Еленкова, дм

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Натрупаните литературни данни показват, че част от привидно несекретиращите случайно открити надбъбречни аденоми (инциденталомии) в действителност имат автономна свръхпродукция на някои стероидни хормони. Методът течна хроматография-мас спектрометрия (LC-MS) дава възможност за много по-прецизно определяне на нивото на стероидните хормони, с което до голяма степен биха се избегнали трудностите в диагностиката на субклиничните форми на заболяванията на надбъбречните жлези. С оглед на това целта, която си поставихме, бе да се сравнят две методики (рутинни скринингови тестове за поставяне на диагноза хиперкортизолизъм – свободен уринен кортизол, вечерен кортизол и кортизол след експресен блокаж, измерени чрез радиоимунологични методики и стероиден профил, изследван чрез LC-MS) по отношение на чувствителността им за откриване на субклинични форми на хиперкортизолизъм при пациенти с надбъбречни инциденталомии. Резултатите от нашите изследвания показаха по-висока средна стойност на свободния уринен кортизол (определена чрез LC-MS) при пациентите с надбъбречни инциденталомии, оценени като хормоннесекретиращи при използване на рутинните скринингови тестове, спрямо здравите контроли. Средната стойност на ДХЕАС (определени чрез LC-MS) бе по-ниска при пациентите с надбъбречни инциденталомии, оценени като хормоннесекретиращи при използване на рутинните скринингови тестове, спрямо здравите контроли. Този резултат е в подкрепа на евентуална автономна кортизолова секреция с оглед на хипотезата, че

свръхсекрецията на кортизол по механизма на отрицателната обратна връзка води до потискане на АКТХ и съответно липса на стимулация на синтеза на надбъбречни андрогени с основен представител ДХЕАС. Последният се счита за инхибитор на 11 $\beta$ HSD 1, което от своя страна повишава риска от метаболитни усложнения вследствие на хиперкортизолизма. В съответствие с това нивата на кортизон при нашата кохорта пациенти с надбъбречни инциденталомии бяха по-ниски от тези на здравите ни контроли. Безспорно, интегрална оценка на стероиден профил позволява изследване с много по-голяма скорост и точност на хормони, които в противен случай отпадат от диагностичния план, но системното изследване на които би спомогнало за прецизността в диагностиката на пациенти с надбъбречни инциденталомии.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Нанкова А. Оценка на терапевтичния подход и качеството на живот при пациенти със синдром на Кушинг. Дисертационен труд. София, 2021.

#### 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 136/2019 Динамиката в стойностите на тъканните инхибитори на металопротеиназите и алфа-2 макроглобулинът като потенциални маркери за обратно развитие на фиброзата при напредналата чернодробна болест

Докторант: Христо Пенчев Пенчев, докторант

Научен ръководител: Проф. Красимир Антонов, дмн

Базова организация: Катедра по вътрешни болести, УМБАЛ "Св. Иван Рилски" ЕАД

**РЕЗУЛТАТИ:** Предполагаме връзка между стойностите на ТИМП-1 и алфа-2 макроглобулин със степента на чернодробната болест, както и динамика в показателите изходно и поне 6 месеца след успешна ерадикация на хроничен вирусен хепатит С с директно-действащи антивирусни средства. Целта е да докажем ТИМП-1 и алфа-2 макроглобулин като сурогатни маркери за фиброза и фибринолиза. Определихме стойностите на ТИМП-1 и алфа-2 макроглобулин по методът на ELISA изходно и поне 6 месеца след края на успешна терапия с ДААС. Установихме статистически значими разлики в стойности на ТИМП-1 и алфа-2 макроглобулин при пациенти с декомпенсирана чернодробна цироза. Нямаше статистически значима динамика в стойностите на ТИМП-1 и алфа-2 макроглобулин изходно и в периода на проследяване. Необходими са още проучвания и комбиниране на ТИМП-1 и алфа-2 макроглобулин с други сурогатни маркери за определяне на фиброза и фибринолиза.

#### 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 138/2019 Изследване на генна идентичност между ларингеален карцином и шийни метастази**

**Докторант:** Венелин Маринов Маринов

**Научен ръководител:** доц. Юлиан Рангачев, дм

**Базова организация:** Клиника по УНГ-болести, ул. Бяло море 8, София1527

**РЕЗУЛТАТИ:** Изследвана е биопсична тъкан, която е взета по време на оперативна интервенция с лечебна цел от онкоболни пациенти, доброволно участващи в проучването. Взета е тъкан от пациенти с пхи: доказан ларингеален карцином- сърцевина и периферия, и тъкан от шийни лимфни възли суспектни за метастатични. Тъканта е замразена в течен азот и своевременно транспортирана до Център по Молекулна Медицина, където е изследвана. За пръв път в България е изследвано генетично сродство между първичен тумор и метастаза при карциноми на ларинкс и метастазите им. Целта е изследване на генетично сродство между биопсична тъкан от областта на туморната сърцевина, периферия и лимфен възел съмнителен за метастатичен. Методите са щателна анамнеза с онкологична насоченост, патохистологична верификация, генетичен анализ на базата на ДНК изследване. При 14 комплекта проби- тумор сърцевина и тумор периферия съществува корелация на мутациите между мутациите наблюдавани в център и периферия. При трима пациента има разлика между мутациите открити в център и периферия. При всички пациенти с доказани метастатични ЛВ се установява съответствие между мутациите открити в тях, с тези в център и периферия. При двама от пациентите се установява засягане само на тумор – сърцевина, без изменения в пробата от тумор периферия и ЛВ. При един от пациентите се установяват изменения в тумор периферия , без да са налични в тумор сърцевина и препарат от лимфни възли. При един пациент не са открити никакви вариации в изследваните гени-TP53, PIK3CA. Не се откриват мутации в тъканната проба от метастатични ЛВ , които да не присъстват в туморен център и периферия, не се откриват нововъзникнали мутации в изследвания материал. При 24 от пациентите не са установени мутации в биопсираните ЛВ. Установени са повече на брой мутации в тумор сърцевина и периферия, съпоставени към метастатичните лимфни възли. Само 6 от пациентите с мутации в първичния тумор, имат съответните мутации и в метастатичните ЛВ. Не са установени мутации присъстващи в метастатичните ЛВ, които отсъстват в пробите от тумор сърцевина или периферия. Може да се твърди , че хипотезата за генетично сродство между първичен тумор и метастаза не се доказва (тъй като броя на пациентите с мутации в първичния тумор, но без мутации в ЛВ е по-голям).

### **Научни публикации и прояви:**

- Маринов В, Кънева Р, Станчева Г и др. Специфични аспекти в проучването на онкогенезата и метастазирането на ларингеален плоскоклетъчен карцином. Международен бюлетин по оториноларингология брой 3/2020
- Marinov V, Rangachev Y, Petkova V et al. Expression of TP53 and PIK3CA in patients with laryngeal squamous cell carcinoma and neck metastases - 91. JAHRESVERSAMMLUNG Deutsche Gesellscha für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Bonn, Mi woch, 20. Mai bis Samstag, 23. May 2020

### **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 125/2019 Изследване ролята на пациента в оценката на здравните технологии чрез прилагане на обоснована теория (Grounded theory)**

**Докторант:** Клаудия Ивайлова Георгиева

**Научен ръководител:** Проф. Антония Янакиева, дм

**Базова организация:** Катедра «Оценка на здравните технологии», София, ул. Бяло море 8

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на изследването е да бъдат проучени нагласите на пациента за участие в ОЗТ и степента на познаване на процеса. Проучването се базира на обработка на качествени данни, чрез софтуерът NVivo, събрани при интервюиране на пациенти, хоспитализирани в различни лечебни заведения в България. Използван бе въпросник, съдържащ 10 отворени въпроса. Методологията на проучването следва концепцията на обоснованата теория (Grounded Theory), представляваща системна методология в областта на социалните науки. Резултатите показват непознаване на процеса ОЗТ от страна на пациентите у нас, ниско ниво на компетентност по отношение на ОЗТ методики, но желание за споделяне на мнение и личен опит. Пациентите имат позитивната нагласа и готовност да се обучават, да участват в конференции и кръгли маси и да се срещат с представители на ОЗТ институции. Интерпретирането на проведените интервюта доведе до няколко заключения, относно евентуалните лични мотиви пациентът да се включи в процеса по ОЗТ. Сред тях водещи са намаляване на нежеланите ефекти от терапии с различни здравни технологии, надежда за по-добър контрол на заболяването или за да помогнат на други хора. Пациентите имат определени очаквания при евентуално участие от тяхна страна в ОЗТ, свързани с придобити ползи, касаещи здравословното им състояние. Те очакват да обменят знания и опит с други пациенти и експерти, което да им помогне в справянето с болестта. Биха се включили в процеса, за да научат повече за дадена здравна технология, свързана с тяхното здравословно състояние, а също и да могат да помагат в прилагането на здравни технологии върху свои близки. Тези очаквани ползи и готовност да споделят опит обуславят позитивната нагласа на пациентите в България за участие в ОЗТ.

**Научни публикации и прояви:**

- Георгиева К, Янакиева А, Стоименов В. Изследване приносът на пациентското участие в оценката на здравни технологии в България, Списание Здравна политика и Мениджмънт, 2020, том 20

**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 133/2019 Здравните грижи като фактор за превенция на усложненията при пациенти с артериална хипертония**

**Докторант:** Любомир Христов Маринов

**Научен ръководител:** Доц. Александрина Воденичарова, дм и Доц. Павлинка Добрилова, дм

**Базова организация:** Катедра по Здравна политика и мениджмънт, Враца 3000, бул. Втори юни 179

**РЕЗУЛТАТИ:** Проведено е анкетно проучване на медицински сестри и пациенти в седем лечебни заведения в страната, като са установени проблемите при организацията и предоставянето на здравните грижи от медицинските сестри с акцент върху медико-педагогическите и медико-социалните сестрински функции. Разработен е аналитичен подход за определяне потребностите от грижи при пациентите с артериална хипертония. Представена е методика за практическо приложение на планирането на сестринските грижи при хронично болни, в частност с артериална хипертония. Създаден е методичен подход за оценка и анализ на качеството на грижите. Предложен е организационен подход, който ще подобри дейността на медицинската сестра при предоставянето на здравни грижи основно в два аспекта: медико-педагогическите и медико-социалните сестрински функции, както и ще доведе до повишаване ефективността и качеството на грижата за всеки пациент.

**Научни публикации и прояви:**

- Маринов Л. Проучване дейностите на медицинските сестри при осъществяване на здравни грижи при болни с артериална хипертония Сборник доклади трета научна конференция с международно участие „Медико-социални аспекти на здравните грижи”, Враца

**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 143/2019 Организационни аспекти на здравните грижи при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт**

**Докторант:** Маргарита Димитрова Лаловска

**Научен ръководител:** Проф. Тодор Черкезов, дм и Доц. Павлинка Добрилова, дм

**Базова организация:** Катедра »Здравна политика и мениджмънт«, Враца 3000, бул. Втори юни 179

**РЕЗУЛТАТИ:** Проведено е анкетно проучване на медицински сестри и пациенти в пет многопрофилни болници за активно лечение и две рехабилитационни болници в Северозападна България, като са установени проблемите при организацията и предоставянето на здравните грижи от медицинските сестри при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт. Разработен е подход за определяне на потребностите от грижи при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт, повишаване на тяхната удовлетвореност от

предлаганите здравни грижи и подобряване качеството им на живот. Предоставена бе методика за планирането на сестринските грижи, която гарантира непрекъснати, качествени и адекватни на здравните потребности здравни грижи, в насока към индивидуалния подход на пациента. Разработена е Програма за помощ и самопомощ при пациенти с преживян мозъчен инсулт, която ще доведе до повишаване ефективността и качеството на здравните грижи при пациенти с исхемичен мозъчен инсулт.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Лаловска М, Добрилова П. Подобряване качеството на живот при пациенти с мозъчен инсулт. Сестринско дело 2020;52(2):8-11.
- Лаловска М. Здравните грижи – потребност при пациенти с преживян мозъчен инсулт; Медико – социални аспекти на здравните грижи, под редакцията на Т Златанова, П Добрилова, Р Златанова-Великова, и др., МУ – София Централна медицинска библиотека, 2019,75-79.
- Лаловска М, Добрилова П. Анализ потребностей в медицинском уходе у пациентов с ишемическим инсультом. В. Восточно – Сибирской открытой академии. 2020; 37.

#### 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.

## КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ 2018”

### **Договор 207/2018 Микроинвазивен подход в детската дентална медицина чрез използване на дентален операционен микроскоп**

**Изследователски екип:** Доц. Наталия Христова Грънчарова, дм

- Проф. Мая Рашкова, дм
- Гл. ас. Надежда Митова, дм
- Ас. Красимир Христов
- Ас. Ралица Боговска-Гилова
- Ас. Зорница Лазарова
- Ас. Христина Танкова-Златева

**Базова организация:** Катедра по детска дентална медицина, бул. Г. Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Лечение с минимална интервенция е нова философия в съвременната дентална медицина. В практиката се налагат нови високотехнологични диагностични и увеличителни средства, улесняващи откриване на заболяванията в начална фаза, което дава възможност за щадящо лечение с минимална загуба структури. Използването на дентален операционен микроскоп (ДОМ) в детската дентална медицина има своята специфика, свързана с особеностите на детето като пациент и управление на поведението му при използване на тази нова технология. Цел на проекта е да се проучат нови възможности за приложение на ДОМ в детската кариесология и ендодонтия с минимална интервенция. При изпълнение на проекта бяха използвани клинични методи за диагностика 146 деца (176 постоянни молара и 100 временни молара) и направен дигитален анализ на фотоснимки за микроморфология на оклузални фисури.

Получените резултати дават основание за следните изводи и приноси от проекта: При използване на ДОМ, броят на диагностицираните ранни кариозни лезии по оклузалните повърхности се увеличава с 7%. Увеличителната техника дава възможност за по-точна диференциалната диагностика между дълбока фисура и ранни оклузални кариозни лезии при скоро пробили постоянни молари. Позволява прецизна диференциална диагноза между дълбок дентинов кариес и асимптоматичен затворен пулпит във временното съзъбие. Използването на ДОМ в хода на диагностиката допринася за по-детайлно и прецизно определяне на големината на кариозните лезии. Дава възможност за наблюдение на по-голямо разнообразие в цветовете и нюансите на кариозния дентин, което осигурява по-голяма прецизност при определяне скоростта на кариозния процес; При биологично лечение на асимптоматичен затворен пулпит на временни зъби, използването на ДОМ дава възможност за прецизна диагностика и вземане на решение за избора на лечебен метод. Това е предпоставка за успешния изход от него, както и за по-точна преценка и контрола на екскавация в хода на лечението. Използването на ДОМ улеснява идентифицирането на важни анатомични белези в пулпната камера на временните зъби, от значение при провеждане на ендодонтско лечение. ДОМ дава възможност за изследване с

увеличение и фотодокументиране в клинични условия на оклузалната анатомия на детските молари. Използвайки тези възможности, ние установихме, че фосите и фисурите на новопробилите постоянни молари заемат до 1/5 от площта на тяхната оклузална повърхност. Това е съществена част от рисковата емайлова повърхност за развитие на кариозна лезия, непосредствено след техния пробива.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Христов Кр, Митова Н, Гатева Н. Дентален оперативен микроскоп и микроинвазивен подход в детската дентална медицина – обзор. Проблеми на денталната медицина, 2019;44(2):22-27.
- Христов К, Митова Н, Гатева Н и др. Изследване на морфологията на пулпната камера при долни втори временни молари с помощта на дентален микроскоп, Проблеми на денталната медицина.
- Христов К, Митова Н, Гатева Н. Методи за увеличение в денталната практика – обзор. Проблеми на денталната медицина.
- Боговска-Гигова Р, Костурков Д, Рашкова М и др. Характеристика на оклузални повърхности на първи постоянни молари в детска възраст. Проблеми на денталната медицина.
- Rashkova M, Gigova R, Tankova N et al. Application of contemporary magnifying methods in the diagnostics of occlusal carious lesions on first permanent molars in children. Folia Medica, 2019;62(3):585-91.
- Rashkova M, Gateva N, Mitova N et al. Using a dental operating microscope in the diagnosis of asymptomatic pulpitis in primary teeth. Journal of IMAV 2020;26(1).
- Rashkova M, Mitova N, Lazarova Z et al. Using a dental operating microscope in the treatment of reversible pulpitis in primary teeth. Cumhuriyet Dental Journal. 2021;23(1)

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

#### **Договор 208/2018 Оптимизация на ехографската диагностика за студенти от Медицински колеж**

**Изследователски екип:** Доц. Валери Стефанов Чакърски, дм

- Доц. Димитър Йовчев, дм
- Гл. ас. Петранка Гагова, дм
- Невенка Бонинска
- Бинназ Асанова, докторант

**Базова организация:** МК „Й. Филаретова“, ул. Й. Филаретова 3, София 1606

**РЕЗУЛТАТИ:** Резултатите от анкетните проучвания на студентите относно проблемите на теоретичното и практическото обучение по ехографска диагностика показват необходимост от промяна на съществуващият модел за усвояване на знания и умения. Възможността практически да се приложат теоретично усвоените знания чрез използването на апарат за ултразвукова диагностика в обучението показва повишаване на мотивацията и активността на обучаваните, подобри ефекта на обучението и позволи на преподавателя да повиши качеството си на преподаване. Това бе доказано от сравнителния анализ направен сред избраната група за допълнително практическо обучение, чиито резултати след провеждането му отчетоха положителна промяна. Създаде се и се апробира програма за обучение по ехографска диагностика. Разработената

програма за оптимизация на ехографската диагностика включва следните етапи: теоретична подготовка, контрол на теоретичната подготовка, нагледно представяне на ехографската техника от обучаващия, като прави демонстрация на възможностите на апарата, на основни позиции на трансдюсера и практическите начини за провеждане на ултразвуковото изследване. След демонстрацията, под контрола на обучаващия следва упражняване на техниката от студента и краен етап – оценяване, което включва оценка на студента. За оценка на резултатите получени след провеждането на допълнително обучение на ехографски апарат се използваха предварително подготвени изпитни фишове. Студентите считат, че обучение в кабинета по ехографска диагностика е довело до значително повишаване на теоретични им знания и усвояване на практически умения. Удовлетвореността на студентите е значително по-голяма от обучението в практическия кабинет отколко в учебно-практическите бази. В рамките на проекта преподавателският екип структурира учебното съдържание, нагледните материали по съответните теми за учебно-практическите занятия и изпитните фишове. Създадената програма за практическо обучение на студентите от Медицински колеж на Медицински университет – София може да бъде използвана за основа за следдипломна подготовката на квалифицирани кадри, които чрез разширените си компетенции и дейности да доведат до икономическа и пазарна ползност, чрез оптимизиране и подпомогане на работния процес в здравните и лечебни заведения.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Гагова П, Една обобщена гледна точка за мястото на рентгеновия лаборант в ехографската диагностика, Осемнадесети конгрес на БАР, Варна, 26-28.09.2019 г.
- Гагова П, Цветкова Т, Бонинска Н. Имат ли интерес и какви са теоретичните знания на студентите рентгенови лаборанти в областта на ултразвуковата диагностика. Сборник с публикации от Осма научна сесия на МК- Варна., Сп. Варненски медицински форум 209;8(3):57-61
- Гагова П, Чакърски В, Бонинска Н и др., Качество на обучението по ултразвукова диагностика при студенти рентгенови лаборанти – оценка на учебното съдържание и организацията на учебния процес. Сборник с доклади от Седемнадесета национална научна сесия за студенти и преподаватели, гр. Плевен, 24-25.10.2019 г
- Бонинска Н, Гагова П, Мирчева Ц и др., Физични принципи и особености на ултразвуковата диагностика. Сборник с доклади от Седемнадесета национална научна сесия за студенти и преподаватели, Плевен, 24-25.10.2019 г., стр. 57-63;
- Asanova B, Gagova P. Motivation in the education process. XXII international conference The power of Knowledge, Kavala, Greece, 11-13.10.2019

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

## КОНКУРС „ИЗГРАЖДАНЕ НА ИНФРАСТРУКТУРА ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В МУ – СОФИЯ’2019”

### **Договор 236/2019 Микроинвазивна диагностика и лечение на зъбен кариес и ендодонтски заболявания**

**Изследователски екип:** Проф. Радосвета Иванова Василева, дм

- Ас. Александър Бончев
- Ас. Виктория Петрова-Пашова

**Базова организация:** Катедра по консервативно зъболечение, ул. Св. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целите на настоящия изследователски проект са ранно диагностициране на зъбния кариес и проследяване на ефекта от реминерализиращата терапия чрез количествената светлинно-индуцирана флуоресценция (КСФ) и повишаване на успеха на ендодонтското лечение чрез използване на дентален микроскоп. Изследването с КСФ се проведе върху 30 екстрахиранни трети молари. Върху вестибуларанта половина от всеки зъб се създаде изкуствена кариозна лезия като се използва гел, съдържащ 0.1% млечна киселина. Лезиите се третират с два вида реминерализиращи системи – самоорганизиращ се пептид P11-4 и новосинтезираната ПДМАЕМА/Карбомер/СаР, след което зъбите се съхраняват в разтвор на изкуствена слюнка за седем дни. Получените резултати доказаха, че разтворът на млечна киселина (0.1M, рН=4.5), приложен за 6 дни върху емайлови образци създава изкуствени кариозни лезии. В резултат на това се намалява излъчената флуоресценция, което може да се регистрира чрез КСФ. Прилагането и на двете реминерализиращи системи доведе до повишаване на интензитета на излъчената флуоресценция, което се свързва с настъпилата реминерализация на емайловата лезия. Тези данни се потвърдиха от изследването с Раманова спектроскопия и СЕМ. Това определя КСФ като надежден метод за ранна диагностика на кариеса и мониториране на ефекта от реминерализиращата терапия. Изследването за установяване на брой открити коренови канали се извърши върху 50 екстрахиранни горни и долни молари. Изработиха се 50 стандартни ендодонтски кавитети. Първоначално, без да се използва увеличителна техника, се локализираха и преброиха наличните коренови канали. След това, чрез използване на дентален микроскоп с увеличение 16x, на същите зъбни образци отново се локализираха и преброиха кореновите канали. Получените резултатите доказаха, че използването на увеличителна техника, в проведения експеримент – дентален операционен микроскоп, статистически повишава успеха от установяване на кореновите канали при молари. Това дава основание за препоръка за използване на денталния микроскоп като неизменна част от съвременното ендодонтско лечение.

### **Научни публикации и прояви:**

- Bonchev A, Vasileva R, Dyulgerova E, et al. Self-assembling Peptide P11-4: A Biomimetic Agent for Enamel Remineralization. Int J Pept Res Ther 2020;32(19).
- Petrova V, Vassileva R, Yantcheva S. Radix entomolaris: a case report. Medinform 2020.



- Bonchev A, Vasileva R, Dyulgerova E. Polymer controlled system for remineralization of demineralized enamel – an in vitro study. Jubilee Annual Assembly of IMAB, 18-21 Oct 2020, Varna, Bulgaria

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

## КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2018”

**Договор 209/2018** Изследване на най-честите бактериални и вирусни патогени, замесени в репродуктивни несполуки при жени върху менструална кръв, като прицелна биологична проба

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

- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Гл. ас. Биляна Георгиева, дб
- Ас Анита Кавръкова, дб
- Кремена Месечкова, докторант
- Ас Ани Митева

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото проучване беше да се проучи участието на бактериални (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, *Mycomplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*) и вирусни (*HSV1*, *HSV2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV6*, *HHV7*, *HHV8*) патогени, като потенциална причина за репродуктивна несполука при инфертилни български жени, чрез анализ на менструална кръв. Изследвахме ДНК изолирана от менструални тъкани проби от 48 пациентки, подбрани въз основа на анамнеза за безплодие- повтарящи се спонтанни аборти, трудности в естественото зачеване, физиологична обструкция на конкретни анатомични отдели на женския генитален тракт, неуспешни процедури за асистирана репродукция, наличие на автоимунно заболяване и др. Използваните методи са изолиране на високомолекулна ДНК, PCR, Real-time qPCR, агарозна гел електрофореза. При 64,6% от изследваните менструални проби от инфертилни жени отчетохме позитивни резултати за наличие на бактериални и/или вирусни патогени. При 41,4% от изследваните жени откриваме бактериален, а при 37,5% вирусен патоген. От всички позитивни бактериални проби при 58,3% се открива *Ureaplasma parvum*, и при 54,2%- *Gardnerella vaginalis*. От всички позитивни вирусни проби при 38,9% се открива *EBV*, при 55,6%- *HHV7*, и при 11,1%- *HHV6*. Комбинирана бактериална и вирусна коинфекция се открива при 22,6% от всички изследвани жени. По отношение на *Chlamydia trachomatis*, *Mycomplasma hominis*, *Mycomplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *HSV1*, *HSV2*, *CMV*, *VZV* и *HHV8*, молекулните резултати са негативни. Настоящата разработка дава нов диагностичен подход за детекция на инфекции в горен женски генитален тракт чрез анализ на менструална тъкан. Възможността за детекция на асимптоматични бактериални и вирусни инфекции на горен женски генитален тракт, подпомагат изясняването на причината за стерилитет. Важно значение има диагностиката не само на активна, но и на асимптомна субклинична вирусна инфекция, често провокирана към реактивация чрез хормонална стимулация. Прилагането на този подход ще доведе до изясняване инфекциозната

етиология на репродуктивни несполуки и носи терапевтични ползи и по-лесен избор за лекарите, работещи по проблемите на репродукцията.

#### **Научни публикации и прояви**

- Mesechkova K, Kavrakova A, Georgieva B, et al. Bacterial and viral pathogens implicated in female reproductive failure investigated on menstrual blood. 30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, France, 18-21 April, 2020.

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

#### **Договор 210/2018 Изследване на микросателитните *AR(CAG)n* и *Polly A 3'UTR VDR* маркери, като генетични рискови фактори за развитие на простатен карцином и асоциация с агресивен клиничен ход**

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

- Акад. проф. Ваньо Митев, дм, дбн
- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Ас Анита Кавръкова, дб
- Ас Ани Митева

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се проучи ролята на различни алелни варианти на двата маркера *AR(CAG)n* и *VDR PolyA 3'UTR* за оценка на повишен риск от развитие на простатен карцином (ПК) и агресивен ход на заболяването. Мутации в гените *AR* and *VDR* (кодиращи андрогеновия рецептор и рецептора за витамин Д, респективно) осигуряват селективно предимство на кастрация-резистентен ПК, съхранявайки го активен дори след андроген подтискаща терапия. Изследвахме ДНК/РНК от 57 български пациенти с ПК. Използваните методи са PCR, Real-time qPCR, фрагментен анализ, агарозна гел електрофореза. В 42% от изследваните пациенти с ПК детектирахме *AR(CAG)n*  $\leq 20$  повтора, което се асоциира с вродена предизпозиция към ПК. Този процент е значително по-висок в сравнение с докладваните контролни групи (*AR(CAG)n*  $\leq 20$  при 27%). Най-късите 16/17/19 *AR(CAG)n* алели открихме в агресивни клинични случаи с напреднал кастрация-резистентен ПК, множество метастазирание и рецидив. Детектирахме следните алели и алелни честоти относно 3'*VDR PolyA* микросателитита: "къси алели" SS 17/17; SL 17/23; SL 17/24; SL 17/25 - 36% и „дълги алели“ LL 23/23; SL 17/23 - 26%; LL 24/24; SL 17/24 - 36%; SL 17/25 – 2%. Установихме следното разпределение на *VDR* алелите: SS 12%; SL 47%; LL 41%. В контролни групи се наблюдава следното разпределение: SS 20%; SL 43% и LL 36%. Най-дългите *VDR* алели 23, 24, 25, особено в хомозиготна комбинация са детектирани при пациенти с андроген-неподатливо поведение на ПК, биохимичен рецидив и напреднал кастрация-резистентен ПК профил. Всички пациенти с ПК показаха завишена *PCa3* тумор-специфична експресия и съотношение *PCa3/PSA*  $\times 100$  над 30. *AR(CAG)n* и *VDR PolyA 3'UTR* микросателитните маркери имат независима роля, като генетични рискови фактори за развитие на ПК. Най-късите *AR(CAG)n* и най-дългите *VDR PolyA 3'UTR* алели допринасят за развитие на агресивни и напреднали тумори с неблагоприятен ход и прогноза.

#### **Научни публикации и прояви**

- Kavrakova A, Georgieva B, Mitev V, et al. Microsatellite AR and VDR markers as genetic risk factors in association with Prostate cancer and aggressive profile. 10<sup>th</sup> European Multidisciplinary Congress on Urological Cancers – EMUC 2018, 8-11 Nov 2018, Amsterdam, The Netherlands;

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

**Договор 211/2018 Влияние на кетогенна диета върху термичния профил на мозъчния протеом в модел на хронични епилептични припадъци**

**Изследователски екип:** Професор Борис Гоцев Тенчов, дбн, д-р по физика

- Доц Павлина Гатева, дм
- Гл.ас. Любомир Трайков, дб
- Гл.ас. Силвия Абарова, дб
- Ас. Зафер Сабир
- Калина Каменова
- Стела Захаринова, студент

**Базова организация:** Катедра по медицинска физика и биофизика, ул. Здраве 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В проведеното изследване са получените ред нови, оригинални резултати относно влиянието на киндлинга и на кетогенната диета върху денатурационните профили на мозъчни супернатанти и на кръвна плазма от мишки. Тези резултати съдържат фундаментални научни приноси и разкриват нови възможности за приложения на разработения експериментален модел за изследване на молекулните механизми на патологичните процеси при индуцирана посредством киндлинг епилепсия. Най-забележителният нов фундаментален резултат се състои в установяването на ясно изразени противоположни ефекти на киндлинга и на кетогенната диета върху нискотемпературните екзотермни преходи в термограмите на мозъчните супернатанти. Тези ефекти добре корелират с установените метаболитни ефекти (промени в телесното тегло и в нивата на глюкоза и кетотела в кръвта), както и с нивата на оксидативен стрес на белтъците (АОРР) в мозъчния протеом. Тези противоположни ефекти се проявяват съвсем отчетливо в поведението на двата добре изразени екзотермни прехода при  $\sim 20^{\circ}\text{C}$  и  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ , получени посредством деконволюция на термограмите на мозъчните супернатанти, и демонстрират силен компенсаторен ефект на кетогенната диета спрямо въздействието на киндлинга. Сравнителната характеристика на резултатите, получени от изследванията на кръвна плазма от контролната група, както и от групите животни, подложени на киндлинг и/или кетогенна диета, разкрива съществени промени в профилите на албумина, чийто денатурационен преход е отместен към по-ниски температури при кетогенна диета, докато при киндлинг е отместен към по-високи температури, които са в областта на глобулиновите преходи в денатурационните профили. Тези резултати показват несъмнения потенциал на диференциалната сканираща калориметрия като диагностичен метод както при установяване на заболяването, така също и за оценка на ефекта от прилаганите терапии (кетодиета в настоящото изследване). Настоящата работа създава предпоставки за оценка на потенциала на използвания подход за евентуални приложения за диагностика и мониторинг на епилептични заболявания при хора посредством анализ на ДСК термограми на взети от пациенти проби от кръвна плазма.

### Научни публикации и прояви:

- Andreeva-Gateva P, Bakalov D, Sabit Z, et al. Effects of ketogenic diet on corneal kindling mouse model. Acta Medica Bulgarica 2020;47(2):7-11.
- Койнова Р, Тенчов Б."Микрокалориметрия на белтъци – нов подход за изследване на молекулярния механизъм на болестите" Сборник доклади на Национална Научна Конференция "75 години Съюз на Учените в България – в полза на науката и образованието" (2019)

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

### Договор 212/2018 Скрининг за неинвазивни кандидат-биомаркери за диагноза на ендометриоза чрез миРНК експресионно профилиране

Изследователски екип: Гл. ас. Рада Георгиева Станева-Цветкова, дб

- Проф. Савина Хаджидекова, дм
- Гл. ас. Весела Карамешева, дм
- Чл.кор., проф. Драга Митева, дм, дбн
- Ас. Виктория Спасова, докторант
- Гл. ас. Олга Антонова, дб
- Славяна Стайкова, докторант
- Ас. д-р Михаил Ганев, докторант
- Зора Хамуде, дб

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Ендометриозата е хронично гинекологично заболяване, чието диагностициране на този етап изисква хирургична намеса. Целта на нашето проучване е откриване на миРНК експресионни промени в кръв и тъкан от пациенти с ендометриоза, които имат потенциала да бъдат използвани като диагностични и стадиращи биомаркери. В проекта бяха включени 15 пациентки с ендометриоза в I-II стадий, 15 пациентки в III-IV стадий и 15 здрави контроли. След изолиране на РНК от кръв с кит miRNeasy Serum/Plasma Kit и от тъкан с кит miRNeasy MiniKit бяха формирани общо 6 РНК сборни проби – по 3 кръвни и 3 тъканни проби - 1)ранна ендометриоза, 2)напреднала ендометриоза и 3)здрави контроли. Всяка сборна проба беше подложена на обратна транскрипция чрез miScript II RT Kit. За експресионен анализ на 84 миРНКи в кръв беше използван miScript miRNA PCR Array Human Serum & Plasma и съответно с Human miFinder miRNA PCR Array в тъкан. Количествената PCR реакция беше извършена на апарат Applied Biosystems™7500. Данните са обработени с Qiagen's GeneGlobe Data analysis centre софтуер. Резултатите от анализа на плазмените проби показаха 33 миРНКи със значително повишена експресия в ранните стадии на ендометриоза и 49 миРНКи със значително повишена експресия в късните стадии на ендометриоза в сравнение със здрави контроли. От 24те миРНКи с променена експресия и в двете групи пациенти, miR-106a-5p/miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-16-5p показаха над 10-кратно повишена експресия в късните спрямо ранните стадии, което ги определя като подходящи кандидат биомаркери за диагноза и стадиране на ендометриоза. Анализът на експресионните профили на миРНКите в тъкан показа 3 миРНКи със значително понижена експресия в ранните стадии на ендометриоза и 10 миРНКи със значително понижена експресия в късните стадии на ендометриоза в сравнение със здрави контроли. MiR-200c-3p и miR-196b-5p, които

показаха между 5 и 9,9-кратно понижена експресия в късните спрямо ранните стадии, което определя техния потенциал като кандидат биомаркери за стадиране. Научният отчет е приет с **ДОБРА** оценка по скалата на СМН.

**Договор 213/2018 Проучване ролята на полиморфизма на хаптоглобин върху обмяната на желязо при здрава група доброволци от българската популация**  
**Изследователски екип:** Доц. Савина Петрова Хаджидекова, дм

- Гл. ас. Виктор Манолов, дм
- Гл. ас. Радослава Грозданова, дб - НЦЗПБ
- Проф. Огнян Георгиев, дм
- Чл. кор., проф. Лъчезар Трайков, дмн
- Проф. Камен Цачев, дмн
- Проф. Юлия Петрова, дмн
- Проф. Борис Богов, дм
- Доц. Евгений Хаджиев, дмн
- Доц. Венцислава Пенчева-Генова, дм
- Ас. Гургана Цветкова
- Гл. ас. Георги Ангов, дм
- Ас. Ирен Петрова-Иванова
- Проф. Мария Николова, дмн - НЦЗПБ
- Гл. ас. Мариета Караджова, дм
- Тодор Кунчев, докторант
- Ас. Виктория Спасова

**Базова организация:** Катедра по медицинска генетика, ул. Св. Георги Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В хода на проучването бяха изследвани 217 здрави доброволца за определяне на хаптоглобиновия фенотип и проучване на неговата роля в обмяната на желязо чрез синтеза на хепсидин. На включените участници бяха измерени дебелина на интима-медия на каротидната артерия (ИМТ) и индекс глезен-брахиум (АВІ), кръвно налягане и определен боди-мас индекс (ВМІ). Беше взет биологичен материал (венозна кръв) с цел определяне на общ брой еритроцити, еритроцитни индекси – MCV, MCH, MCHC, хемоглобин, хематокрит, високочувствителен С-реактивен протеин, серумно желязо, ТЖСК, серумен трансферин, феритин, хаптоглобин, CRP, LDH, СРК, ASAT, ALAT, креатинин, глюкоза, липиден профил (общ холестерол, HDL- и LDL-холестерол, триглицериди), хепсидин, TNF- $\alpha$ , IL-6, фенотипизиране на хаптоглобин. Определена беше корелационна зависимост между серумните нива на изследваните параметри, както и бяха актуализирани референтните граници на хепсидин за българската популация. Включените доброволци бяха разделени в две възрастови граници – а) от 18 до 50 г.в. и б) над 50 г.в. Разпределението беше следното: мъже – общ брой 103, под 50 г.в. 59 (57.3%), жени – общ брой 114, под 50 г.в. 69 (60.5%). При изследваната група здрави доброволци от българската популация при 195 (89.9%) се установи хаптоглобинов фенотип 2-2. При мъжете – 92 (89.3%), при жените 103 (90.4%). С хаптоглобинов фенотип 2-1 бяха 6 мъже (5.8%) и 7 жени (6.1%); с фенотип 1-1 съответно мъже 5 (4.9%) и жени 4 (3.5%). Средната

серумна концентрация на хепсидин при мъжете (в двете възрастови групи и трита хаптоглобинови типа) беше  $21.0 \pm 4.9 \mu\text{g/L}$ . Средната серумна концентрация на хепсидин при жените (в двете възрастови групи и трита хаптоглобинови типа) беше  $14.3 \pm 5.1 \mu\text{g/L}$ . Средната хепсидинова концентрация при мъже с хаптоглобинов фенотип 2-2 е  $22.6 \pm 5.4 \mu\text{g/L}$ . Средната хепсидинова концентрация при жени с хаптоглобинов фенотип 2-2 е  $16.6 \pm 5.6 \mu\text{g/L}$ . Серумният хепсидин при изследваните здрави доброволци с хаптоглобинов фенотип 2-1 беше  $21.3 \pm 4.9 \mu\text{g/L}$  за мъже и  $13.3 \pm 4.7 \mu\text{g/L}$  за жени. Серумните концентрации на хепсидин при изследваните здрави доброволци с хаптоглобинов фенотип 1-1 беше  $19.1 \pm 4.4 \mu\text{g/L}$  за мъже и  $12.1 \pm 4.9 \mu\text{g/L}$  за жени. Разделянето на получените резултати по хаптоглобинов фенотип при изследвани здрави доброволци от българската популация доведе до актуализиране на референтните граници за хепсидин. Хаптоглобинов фенотип 2-2 е свързан с повишен риск от развитие на оксидативен стрес на организма с по-голяма честота на настъпване и прогресиране на редица социално-значими заболявания. При сравнение на някои показатели и маркери свързани със системно и вътресъдово възпаление (високо-чувствителен С-реактивен протеин, TNF- $\alpha$ , IL-6), настъпване на оксидативен стрес в организма чрез промяна на метаболизма на желязото (серумен хаптоглобин) и ранно развитие на атеросклеротични промени (IMT, ABI) се установи нарастваща зависимост спрямо фенотипа хаптоглобин при здравите доброволци. В хода на нашето проучване установихме по-високи серумни нива на общ холестерол, LDL-холестерол и триглицериди, както и по-ниско ниво на HDL-липопротеините при здрави доброволци с хаптоглобинов фенотип 2-2 спрямо 2-1 и 1-1 ( $r=0.893$ ,  $P<0.005$  – усреднени стойности за четирите показателя). По-високи стойностите на eGFR се установиха при здрави доброволци с хаптоглобинов фенотип 2-2 спрямо 2-1 и 1-1 ( $r=0.971$ ,  $P<0.001$ ). Получихме по-високи серумни нива на желязо и феритин при здрави доброволци с фенотип хаптоглобин 2-2 спрямо другите типове хаптоглобин ( $r=0.854$  и  $r=0.903$ , съответно,  $P<0.005$ ). В хода на нашето проучване установихме по-високи стойности на кръвната захар на гладно при здрави доброволци с хаптоглобинов фенотип 2-2 спрямо 2-1 и 1-1 ( $r=0.771$ ,  $P<0.005$ ). В хода на изпълнение на проектът се установи зависимост и различия в експресията на хепсидин спрямо фенотипа хаптоглобин. След прилагането на съответните статистически методи за определяне на референтни граници при  $n=195$  актуализирахме референтните стойности за серумен хепсидин за българската популация. При хаптоглобинов фенотип 2-2 определихме референтна област  $4.19 - 37.89 \mu\text{g/l}$ .

#### **Научни публикации и прояви:**

- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Haptoglobin phenotype changes IMT in atherosclerosis. International Congress on Neurology and Brain Disorders (ICNBD-2019). 16.09.-18.09.2019, London, UK
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Oxidative stress and haptoglobin polymorphism. XII<sup>th</sup> National Conference in Clinical Laboratory. 04.10.-06.10.2019, Aheloy, Bulgaria
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Changed iron homeostasis due to haptoglobin polymorphism. 7th World Intracranial Hemorrhage Conference (WICH 2019). 19.05.-21.05.2019, Granada, Spain
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Polymorphism of haptoglobin may cause oxidative stress. 28th Euro-Global Neurologists Meeting (Neurologists Congress 2019). 13.06.-14.06.2019, Barcelona, Spain

- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Oxidative stress caused by haptoglobin polymorphism. International Conference on Neurology and Brain Disorders. 22.07.-24.07.2019, Rome, Italy
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Haptoglobin polymorphism may cause atherosclerotic changes. 27<sup>th</sup> Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Congress and 30<sup>th</sup> National Biochemistry Congress (NBC) of TBS. 27.10.-31.10.2019, Antalya, Turkey
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Oxidative stress and haptoglobin type 2-2. World Congress & Expo on Advanced Nursing and Healthcare. 11.11.-12.11.2019, Rome, Italy
- Manolov V, Hadjidekova S, Grozdanova R, et al. Haptoglobin polymorphism changes iron homeostasis regulator hepcidin. Global Summit on Neurology and Psychiatry. 28.11.-29.11.2019, Paris, France

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

**Договор 214/2018 Сравнение на молекулярно-генетични и имунохистохимични методи за определяне на туморна микросателитна нестабилност при пациенти с колоректален карцином**

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

- Янка Дангулова
- Гл. ас. Биляна Георгиева, дб
- Проф. Жасмина Миланова, дм - ВМА

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Ракът на дебелото черво е едно от най-често срещаните животозастрашаващи онкологични заболявания. Идентифицирането на МСН е клинично важно, защото се асоциира с различна преживяемост и отговор при лечени с 5-флуорурацил. Научната идея на настоящият проект е да се въведе изследване за МСН, чрез използване на микросателитни (STR) маркери, като разширяването на броя и различния им вид (моно, ди- и тетрануклеотидни маркери), може да дава допълнителна информация на лекуващия лекар и да хваща случаите с ниско ниво на МСН, което лесно може да се изпусне при използването само на имунохистохимия за определяне на МСН. По проекта бяха изследвани 40 пациента с клинична диагноза колоректален карцином, от тях във втори стадии са 26 и 14 са метастатични. Подбраните маркери представляват къси тандемни повтори, за които е известно че често проявяват нестабилност при проблеми в MMR поправящата система на клетките. Избрани са моно-, ди- и тетрануклеотидни повтори. Конкордантност между получените данни от микросателитните маркери и имуносистохимичните изследвания има в 32 (80%) от. Други автори цитират сходна конкордантност между двата метода – 83% - 85%. Прави впечатление, че във всички случаи без един, при наличие на МСН, независимо дали е ниска или висока степен, има изменен поне един мононуклеотиден STR (BAT25 или BAT26), предполага че те са почувствителни към изменения в MMR система и поради това се променят първи в сравнение с по-стабилните ди- и тетрануклеотидни маркери. Изследователският екип успешно използва микросателитните маркери за изследване на микросателитна



нестабилност. На база на получените резултати смятаме, че към момента въпреки сравнително високата конкордантност на метода в сравнение с имунохистохимияните изследвания, е препоръчително по възможност да се използват едновременно и имунохистохимичните изследвания и микросателитните маркери за определяне на микросателитната нестабилност, както и да се увеличи броят на използваните моноклеотидни STR маркери, тъй като те очевидно показват по-висока чувствителност и спрямо останалите типове STR marker.

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

### **Договор 215/2018 Моделиране на човешкия епидермис *in vitro* за основни и приложни изследвания**

**Изследователски екип:** Доц Мария Димитрова Драгнева, дб

- Гл. ас Николай Ишкитиев, дм, дб
- Гл. ас Силвия Календерова - Вълкова, дб
- Гл. ас Весела Лозанова, дб
- Марина Митева, докторант

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

**РЕЗУЛТАТИ:** С настоящия проект целяхме да изработим *in vitro* моделните системи, наподобяващи човешки стратифициран епидермис и пълноценна кожа и да анализираме възможностите тези модели да бъдат използвани за изучаването на процесите, протичащи по време на програмата на диференциация във вроговяващия епител, както и взаимоотношенията между кератиноцити и фибробласти при формирането на кожата и в моделни системи на кожни патологии. Успешно изолирахме нормални кератиноцити и фибробласти. С разработен от екипа системен подход сепарирахме и стволовите епидермални клетки. Следващата стъпка в нашите изследвания се оказа препятствие, с което не успяхме да се справим с наличните консумативи, закупени със средствата по договора. Опитвахме да моделираме дерма, като полимеризираме човешки колаген. За съжаление търговският продукт, който използвахме и който по данни на фирмата – производител трябваше да полимеризира в рамките на 15 до 30 минути следвайки протокола на производителя, не успя да желира за това време. Едва след инкубация от повече от 12 часа колагенът се превърна в гел, но за това време фибробластите се утаиха на дъното на съда и не успяха да оцелеят и да заселят колагена. След повторен неуспешен опит този ключов консуматив беше изчерпан, а тъй като средствата по договора бяха изчерпани, трябваше да намерим алтернативен подход. За целта решихме да приготвим колаген от човешка кожа, която се очакваше вземаме от Клиниката по пластично-възстановителна и естетична хирургия на УМБАЛ Александровска. За огромно съжаление, с налагането на противоепидемичните мерки, плановете операции бяха прекратени и ние нямаше как да продължим с планираната експериментална работа. До настоящия момент се опитваме и очакваме да възстановим работата по проекта. Свързахме се и с Катедрата по лицево-челюстна хирургия на Александровска болница, за да можем да получаваме необходимия ни биологичен материал. Закупените химикали и консумативи със средствата по договора се съхраняват надлежно до готовност да бъдат използвани, за да завършим експериментите, предвидени в проекта.

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

**Договор 216/2018 Изследване на генотип-фенотипните корелации при пациенти с дистония-тремор синдром - вариант на Болест на Louis-Vaг, обусловен от хомозиготна мутация p.V2716A в АТМ гена**

**Изследователски екип:** Доц. Теодора Кънчева Чамова, дм

- Проф. Ивайло Търнев, дмн
- Ани Танева, докторант
- Тихомир Годоров, дб
- Ас Марин Пенков, дм

**Базова организация:** Катедра по неврология, Бул. Свети Георги Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Атаксия-телангиектазия е рядко генетично заболяване с автозомно-рецесивен тип на унаследяване, обуславено от мутации в АТМ- гена, клинично характеризиращо се със широк спектър от прояви на ранна малкомозъчна атаксия, телангиектазии, имунен дефицит, повишен риск от неоплазми, радиочувствителност, типични при класическата форма и различни по тежест и характер екстрапирамидни хиперкинези, водещи при т.нар. вариант на АТ. Цел: Да се характеризират основните клинични прояви и мутационния спектър на българските пациенти с атаксия-телангиектазия- вариант и да се определи на честотата на носителство на мутацията p.V2716A в АТМ гена в региона на гр. Доспат и Сърница. В изследването са включени 28 болни от гр. Доспат и Сърница с генетично доказани мутации в АТМ-гена от 4 родословия, при които са проведени неврологично, изследване, невроофтальмологична и невропсихологична оценки, изследване на серумното ниво на алфа-фетопротеин (AFP), електроневрографско изследване и магнитно-резонансна томография (МРТ) на главен мозък. Засягането на имунната система е оценено при 5. Честотата на носителство на най-честата мутация p.V2716A е изследвана в 100 филтърни бланки от новородени от региону на гр. Доспат и Сърница. Средната възраст на начало е 8.3 г. ± 9.3 г., с вариация от 14 дена до 40 г. Основните клинични прояви включват дистонии, хореични хиперкинези, статичен и постурален тремор, ангажиращи предимно шията и горните крайници, дистонична дизартрия и дисфагия. Тези прояви бавно прогресират във времето и са с различна тежест. Лека статична и локомоторна атаксия е налице при 5/28. При 4/28 се установяват дилатирани конюктивални съдове. Когнитивното им функциониране нормално. При 4/17 засегнати са налице данни за лека аксонна невропатия в долните крайници. МРТ на главен мозък е нормален при 16/17 изследвани, като само при една пациентка се установява малкомозъчна атрофия. AFP е повишен при всички 13 болни, при които е изследван. При 5/5 имунологично изследвани се установяват повишени ANA, като 3/5 са с абсолютна лимфопения, без анамнестични данни за чести инфекции. Генетичната диагноза е поставена чрез екзомно секвениране. Хомозиготи с мутация p.V2716A в АТМ гена са 24 от изследваните, останалите 4 са двойни хетерозиготи, при които горепосочената мутация се комбинира с p.Lys119 или c.4909+1G>A. От скриринговото изследване е установен 1 носител- 1% носителство на p.V2716A в АТМ гена. Мутациите в АТМ- гена обуславят широк спектър от клинични прояви. Пациентите с дистонично-хореични хиперкинези и тремор, особено от региона на гр. Доспат и гр. Сърница, с начало в детско-юношеска

възраст и повишен серумен АФР, дори без наличие на атаксия, телангиектазии и имунен дефицит следва да се изследват за АТ.

**Научни публикации и прояви:**

- Чамова Т, Търнев И. Клинична и генетична вариабилност при атаксия-телеангиектазия (синдром на Louis Var). Българска неврология. 2019; 1:17-21.
- Чамова Т, Тодоров Т, Кънчева Д, и др. Клиничен спектър на атаксия-телеангиектазия-вариант при български пациенти с мутации в АТМ- гена. Научно-практическата конференция "Ден на редките болести", София 28-29.02.2020

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

**Договор 217/2018 Клинико-генетичен спектър на прогресивни мускулни дистрофии тип пояс-крайник в България**

**Изследователски екип:** Проф. Ивайло Людмилов Търнев, дмн,

- Доц. Теодора Чамова, дм
- Ани Танева, докторант
- Тихомир Тодоров, дб
- Ас Марин Пенков, дм

**Базова организация:** Катедра по неврология, Бул. Св Георги Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на проучването е да се допълни клинико-генетичната и генетично-епидемиологичната база данни на гореспоменатите наследствени невромускулни заболявания, която би допринесла за систематизиране на наличната клинична информация, подобряване на грижите и проследяване на тези болни, насочването им за генетично консултиране и генна терапия, научни проучвания и колаборация на международно ниво. В изследването са включени 72 болни с проксимална мускулна слабост в долни крайници. Проведени са клиничен преглед, включително неврологичен статус, приложени са функционални скали за изследване на мускулната сила, електромиографско изследване, генеалогичен и молекулярногенетични методи- на всички пациенти, МРТ/КТ на мускули на долни крайници и тазов пояс- на 22 души. Клиничният спектър е широк по отношение на възрастта при настъпване и скоростта на прогресия. Първоначалните прояви включват проксимална мускулна слабост в долните крайници, последвана от засягане на горните крайници като при ПКМД 2С, 2А, 2Z, или дисталните мускули на краката при 2G, *TARDPB1*. При *MYH7* свързаните миопатии началото е от дисталните мускули на долни крайници с последващо ангажиране на проксималните. Често се наблюдават скъсяване на ахилесовите сухожилия, криловидни лопатки.ЕМГ изследването при всички отчита миогенна увреда. Сърдечните и дихателните функции са запазени при повечето пациенти. МРТ изследването на мускули описва характерни находки при отделните групи. Създаването и допълването на характерните находки от описанията на МРТ изследването на мускули на пациентите с пояс-крайник мускулни дистрофии допринася за по- лесното генетично диагностициране на тези пациенти и осъществяване на по-подробни и пълни клинико- генетични корелации. Конкретните МРТ патерни на засягане на мускулите при пациентите с пояс-крайник мускулни дистрофии допринася за насочване към генетични изследвания за конкретна форма. МРТ на мускули се превръща в един от основните диагностични методи в общия алгоритъм на диагнозата на ПКМД.

### **Научни публикации и прояви:**

- Танева А, Чамова Т, Бичев С и др. Пояс-крайник мускулна дистрофия 2G в религиозно малцинство на българо-мохамедани, хомозиготи по мутация с.75G>A, р.Тр25х. Българска неврология 2019; 2:71-76.
- Танева А, Чамова Т, Търнев И. Клинико-генетични корелации на формите на Пояс-крайник мускулна дистрофия в България. Научно-практическата конференция "Ден на редките болести", София 28-29.02.2020 г.
- Танева А, Чамова Т, Търнев И. Клинико-генетично и епидемиологично проучване на Пояс-крайник мускулна дистрофия 2С (гамасаркогликанопатия) с С283У мутация в България. Научно-практическата конференция "Ден на редките болести", София 28-29.02.2020 г.

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

### **Договор 218/2018 Нови биомаркери за ендотелна дисфункция при пациенти с нарушения във въглехидратната обмяна**

**Изследователски екип:** проф. Здравко Асенов Каменов, дмн

- Ивета Недева, докторант
- Гл. ас. Антоанета Гатева, дм
- Ас. Вера Карамфилова
- Ас. Явор Асьов, дм

**Базова организация:** Катедра по вътрешни болести, ул. „Георги Софийски” 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В проучването бяха включени 163 пациенти на средна възраст  $52,5 \pm 11,3$  години, разделени в четири групи - група 1- здрави контроли (n=42), група 2 със затлъстяване без въглехидратни нарушения (n=40), група 3 с предиабет (n=42), група 4 с новооткрит захарен диабет (n=39). Установихме, че нивата на серумния ендокан са сигнифактно по-високи при пациентите със затлъстяване и предиабет, в сравнение със здравите контроли. Корелира позитивно с отношението т/х и негативно с нивата на HDL. Серумният Нетрин-1 има по-ниски нива при пациентите със затлъстяване, предиабет и диабет в сравнение със здравите контроли. Има статистически значима правопрпорционална зависимост между нивата му, риска за автономна невропатия и индекса на телесна маса. Негативно корелира с чернодробните показатели и триглицеридите и има добра предиктивност по отношение риска от развитие на въглехидратно нарушение. Статистически значима разлика се отчете между нивата на подокаликсина при пациентите с и без нарушение във въглехидратната обмяна. Позитивно корелираше с ИТМ, обиколката на талията и някои от показателите за микро и макросъдови усложнения (дебелината на интима-медиа; индекса глезен-мишница и риска за развитие на автономна невропатия). Не се установиха статистически значими разлики в нивата на Киспептина сред здравите контроли и пациентите със затлъстяване и нарушение във въглехидратната обмяна. Липсваше корелация между маркера и изследваните показатели за макро и микросъдови усложнения.

### **Научни публикации и прояви:**

- Nedeva I, Gateva A, Assyov Y, et al. Relationship between circulating netrin-1 levels, obesity, prediabetes and newly diagnosed type 2. Arch Physiol Biochem. 2020; 1-6.

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

**Договор 219/2018 Невропсихологични, ликворни и невроизобразяващи маркери при ранна диагностика на Болест на Алцхаймер и сродни заболявания**

**Изследователски екип:** Акад. проф. Лъчезар Динчов Трайков, дмн

- Доц. Шима Мехрабиан-Спасова, дмн
- Доц. Маргарита Райчева, дп
- Гл. ас. Мария Петрова, дм
- Гл. ас. Силвия Скелина, дм
- Ас. Тодор Кунчев, дм
- Дияна Бележанска, докторант

**Базова организация:** Катедра по неврология, ул. "Св. Георги Софийски" №1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Основната цел на настоящето проучване е да се установят чувствителни и специфични невропсихологични, ликворни и невроизобразяващи маркери за ранна диагноза/диференциална диагноза на болестта на Алцхаймер и сродни заболявания. Диференциалната диагноза на различните форми на болестта на Алцхаймер (БА) и вариантите на фронтотемпорална деменция (ФТД) често представлява предизвикателство поради припокриващите се клинични симптоми. Изследвахме нивата на фосфо181-тау (ф-тау), тотален-тау (т-тау) и амилоид  $\beta$  1-42 ( $A\beta$ 42) в ликвора на n=55 пациенти с Фронтотемпорална деменция (ФТД) и Болест на Алцхаймер. Пациентите с ФТД са разделени на две подгрупи - поведенчески вариант (П-ФТД, n=21) и първична прогресивна афазия (ППА, n=10). Групата на пациентите с БА включва типични (n=13) и атипични форми (n=11). Диагнозите са базирани на ревизираните критерии за БА, П-ФТД и ППА. На пациентите също беше проведено невроизобразяване и детайлно невропсихологично изследване, включително инструменти за оценка на невропсихиатричния, емоционалния и когнитивен статус. Ликворните нива на амилоид  $\beta$ 42 са значително по-ниски при типичните и атипичните форми на БА в сравнение с ППА и П-ФТД, докато съответно нивата на т-тау и ф-тау са значително по-високи. Отношението между ликворните т-тау/амилоид  $\beta$ 42 е значително ниско при различните варианти на ФТД в сравнение с БА. В подгрупите отношението между ликворните т-тау/амилоид  $\beta$ 42 е значително по-високо при пациентите с ППА в сравнение с тези с П-ФТД. Биомаркерният профил при БА с ранно начало е много сходен между типичните и атипичните форми на БА, докато вариантите на ФТД нямат сигурен биомаркерен профил. Визуалните оценъчни скали на магнитно-резонансното невроизобразяване показват, че ликворните нива на тау корелират значително с коровата атрофия. След изследване на ликворните биомаркери настъпи промяна на диагнозата при 21% от пациентите, базирайки се на корелация между клиничната картина на заболяването, невроизобразяването, подробния невропсихологичен профил и резултатите от ликворното изследване.

**Научни публикации и прояви:**

- Belezhanska D, Popivanov I, Stoyanova K, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease and Frontotemporal dementia. XVIII National neurological congress. Golden sands. 16-19.05.2019
- Belezhanska D, Popivanov I, Stoyanova K, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Early

onset dementia. WPA thematic congress. Ohrid. 15-18.05.2019

- Бележанска Д, Мехрабиан Ш, Трайков Л. “Ликворни биомаркери при болест на Алцхаймер”. - “Неврология и невропсихология”, том 2, брой 2, 2018

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

### **Договор 220/2018    Комплексна оценка на характеристиките на глюкозния профил при предиабетни състояния**

**Изследователски екип:** Проф. Цветалина Иванова Танкова, дмн

**Членове на изследователския екип:**

- Гл.ас. Грета Грозева-Дамянова, дм
- Гл. ас. Невена Чакърлова, дм
- Гл. ас. Румяна Димова-Драганова, дм
- Ани Годорова, докторант
- Мина Сердарова, докторант
- Полина Царкова, докторант

**Базова организация:** Катедра по Ендокринология, ул. Здраве № 2, София 1431,

**РЕЗУЛТАТИ:**Целта на изследването е да се направи оценка на глюкозната вариабилност при лица с предиабет. Изследвани са 107 лица (24 мъже и 83 жени, средна възраст 49.7±11.5 години, среден ИТМ 30.4±6.3 кг/м<sup>2</sup>). Според глюкозния толеранс участниците са разделени в две групи – 43 с нормален глюкозен толеранс (НормГТ) и 64 с предиабет като групата с предиабет включва три подгрупи – 24 с нарушена гликемия на гладно (НГТ), 24 с нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и 16 с комбинацията от двете (НГГ+НГТ). Глюкозният толеранс е оценен с ОГТТ с изследване на серумна глюкоза по хесокиназен метод. Изследван е HbA1c имунотурбидиметрично. Проведено е продължително глюкозно мониториране с професионален сензор FreeStyle LibrePro. В групата с предиабет се установяват значимо по-високи индекси на глюкозна вариабилност SD (p<0.0001), CV (p<0.0001), CONGA1 (p=0.014) L-index (p<0.0001), J-index (p<0.0001), HbGI (p<0.0001), GRADE (p=0.019) и MAGE (p<0.0001), ниво на HbA1c (p=0.020) и средна глюкозна концентрация (p=0.006) спрямо групата с НормГТ. Времето в прицелния диапазон е значимо намалено (p<0.0001), а времето над прицелния диапазон – значимо увеличено (p<0.0001) при предиабет спрямо НормГТ. Между групите с НГГ и НГГ+НГТ не се установяват сигнификантни различия в индексите за глюкозна вариабилност, средната глюкозна концентрация и HbA1c (p>0.05). Групата с НГТ показва значимо по-ниски нива на HbA1c (p=0.020), средна глюкозна концентрация (p=0.011), CONGA (p=0.011), J-index (p=0.023), LBG1 (p=0.036), M-value (p=0.047) спрямо групата с НГГ+НГТ и значимо по-ниски нива на средна глюкоза (p<0.0001), CONGA (p<0.0001), L-index (p=0.016) J-index (p=0.001), LBG1 (p=0.001), M-value (p=0.001) и MAG (p< 0.0001) спрямо групата с НГГ. При предиабет се наблюдава значимо повишение както на средната глюкозна концентрация, така и на глюкозната вариабилност. Вероятно има известни различия в глюкозната вариабилност между отделните състояния на предиабет. Изследването на глюкозната вариабилност вероятно има допълнителна роля в оценката на глюкозната хомеостаза още на този ранен етап на отклонения.

**Научни публикации и прояви:**

- Dimova R, Chakarova N, Grozeva G, et al. Evaluation of the relationship between cardiac autonomic function and glucose variability and HOMA-IR in prediabetes. Diab Vasc Dis Res. 2020;17(5): 1479164120958619.

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

### **Договор 221/2018 Проучване на митохондриална ДНК при пациенти с шизофрения**

**Изследователски екип:** Гл асист Елена Михайлова Иванова-Генова, дм

- Проф. Вихра Миланова, дмн
- Доц. Снежина Кандиларова, дм
- Айсел Читакова
- Ас Цветелин Луканов, дм

**Базова организация:** Катедра по психиатрия и медицинска психология, бул. Св. Г Софийски 1, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящото пилотно проучване е търсене на патогенни мутации или варианти потенциално свързани с развитието на шизофрения. Изследвани бяха 37 пациенти с шизофрения (27 мъже и 10 жени) и 23 (7 мъже и 16 жени) неродствени здрави контроли. Използвани бяха MiSeq® System Illumina платформа. Биоинформационните данни бяха обработени посредством mtDNA Variant Processor, mtDNA Variant Analyser (Illumina), mtDNA-Server. За оценка на психичното състояние при пациентите с шизофрения беше използван Positive and negative syndrome scale (PANSS), а за скрининг на психичното състояние на здравите контроли General Health Questionnaire (GHQ) D. Goldberg с нормативен праг за българската популация от  $\leq 11$  точки. Резултатите от проведеня анализ, получени от NGS платформата разкриват наличието на общо 338 варианта при болните и 237 при здравите (единични нуклеотидни варианти, точкови инсерции, делеции). При пациентите се установиха две патогенни мутации, съответно m.11778 A>G и m.4115 T>C, като последната е новоидентифицирана. Полиморфният вариант m.1811A>G (MT-RNR2) се описа при 30% от пациентите (1811G, P=0.0272) и при нито един здрав. Установяването на две дефинитивно патогенни мутации (асоциирана с леберова оптична невропатия - LHON, и новоустановена в консервативен участък в гена за NADH dehydrogenase 1) при пациентите с шизофрения е значимо доказателство за ограничена биоенергична гъвкавост на митохондриалното окислително фосфорилиране. Установеният полиморфен вариант на позиция 1811, участва в кодирането на 16S рибозомна РНК и е обещаващ потенциален биомаркер за заболяването.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Иванова Е, Михайлова Сн, Читакова А и др. Проучване на митохондриалната ДНК при пациенти с шизофрения. Обща медицина 2020;1.
- Ivanova E, Mihailova S, Chitakova A, et al. Potential implication of genetic variations in mitochondrial genome for schizophrenia development. Xth international medical congress, Clinical & Translation Medicine. Challenges in the Healthcare Systems - 21 century. Values & Principles, Sofia, 5-8 Sep 2019

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

**Договор 222/2018 Фитофармакологичен потенциал на растения от сем. Asteraceae (Сложноцветни) оценен чрез химично и биологично профилиране**

**Изследователски екип:** Доц. Ренета Славова Гевренова, дф

- Доц. Димитрина Желева-Димитрова, дф
- Гл. ас. Весела Балабанова-Бозушка, дб
- Доц. Нико Бенбасат, дф
- Доц. Параскев Недялков, дф
- Доц. Юлиан Войников, дф
- Божана Димитрова, докторант
- Александра Петрова, студент
- София Нузикиру, студент

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Подробното химично и биологично профилиране, заедно с биоинформационните методи са основни подходи в парадигмата на съвременните фитофармакологични изследвания. Целта на научния проект е да се проведе фитохимично и биологично профилиране на 8 растителни вида представителни за 5 триба от сем. Asteraceae (Сложноцветни): *Telekia speciosa*, *Cirsium appendiculatum*, *Senecio nemorensis*, и *Tanacetum macrophyllum*, разпространени в България, и турските ендемични видове *Centaurea patula*, *C. urvielli* subsp. *hayekiana*, *C. kotschyi* var. *persica*, *C. drabifolia* subsp. *detonsa*. Проведено е метаболитно профилиране и анализ на таргетни метаболити чрез ВЕТХ-УВ, течна хроматография – високоразделителна мас спектрометрия (LC-HRMS) и газова хроматография – високо разделителна мас спектрометрия (GC-HRMS). Проведени са тестове на екстрактите за радикал-улавяща активност, редуцираща способност на желязни и медни йони, метал-хелатираща активност, фосфомолибденов тест, съдържание на общи полифеноли и флавоноиди. Определена е ензим инхибиторната им активност върху ацетилхолинестераза, бутирилхолинестераза,  $\alpha$ -глюкозидаза,  $\alpha$ -амилаза и тирозиназа. Разработена е LC - Орбитрап MS стратегия за идентифициране или предварително структурно охарактеризиране на над 150 вторични метаболита: 10 хидроксibenзоени и хидроксиканелени киселини, 13 фенилетаноидни гликозиди, 36 ацилхинни киселини, 19 флаволи и флавоноли, 23 метоксилирани флавоноидни, 35 сесквитерпени, 8 монотерпени, 2 свободни мастни киселини, 1 мастен алкохол и 6 пирилизидиновите алкалоиди и N-оксидите им. Корените и цветните кошнички от *T. speciosa* се характеризират с фенилетаноидни гликозиди; кошничките от *T. macrophyllum* – с разнообразие от диацилхинни киселини и сесквитерпенови лактони; кошничките и корените от *C. appendiculatum* – с метоксилирани флаволи. За първи път е охарактеризиран фитохимичния профил на проучваните видове *Centaurea*. *T. macrophyllum* (кошнички и корени) и *Cirsium appendiculatum* (корени) са с най-висок антиоксидантен потенциал. Корените на *C. appendiculatum* показва най-висока ацетилхолинестеразна, бутирилхолинестеразна и тирозиназна инхибиторна активност. Корените от *C. appendiculatum* и *T. speciosa*, и кошничките от *T. macrophyllum*, са многофункционални агенти за повлияване на оксидативния стрес и инхибитори на ключови ензими, а таксоните са растения лидери за по-нататъшни проучвания. Проектът е с теоретичен и приложно-научен характер.

**Научни публикации и прояви:**



- Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R et al. A comparative assessment of the LC-MS profiles and cluster analysis of four *Centaurea* species from Turkey. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;20:101189.
- Balabanova V, Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Benbassa Nt, Gevrenova R. A view on biological activity of selected Asteraceae species grown on Vitosha Mt. (Bulgaria). 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 June, 2019. Book of Abstracts,
- Voynikov Y, Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V, Nedyalkov P, Gevrenova R. UHPLC-HRMS profilings of selected Asteraceae species grown on Vitosha Mt. (Bulgaria). 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 June, 2019. Book of Abstracts,
- Zheleva-Dimitrova D, Zengin G, Balabanova V, Nedyalkov P, Gevrenova R. UHPLC-HRMS profilings of Bulgarian and Turkish endemic species from Asteraceae. 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 June, 2019.
- Balabanova V, Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Benbassat N, Gevrenova R. Phytochemical and biological insight into *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. and *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. & Kit) Schultz Bip. (Asteraceae). 7<sup>th</sup> Congress of Pharmacy with international participation. Borovets, Bulgaria. 21-24 November 2019.

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

**Договор 223/2018 Изследване на биологичните и молекулярните характеристики на клетъчните култури от перикоронарни фоликуларни тъкани и фоликуларни кисти in vitro**

**Изследователски екип:** Доц. Павел Кирилов Станимиров, дм

- Ас Зорница Михайлова,
- Гл. ас. Николай Ишкитиев
- Марина Митева, студент
- Доц. Мария Драгнева
- Гл. ас. Силвия Календерова-Вълкова
- Гл. ас. Евгений Петков

**Базова организация:** Факултет по Дентална медицина, ул. Г. Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Зъбният фоликул е рехавна съединителна тъкан, която заобикаля развиващия се зародиш преди пробива на зъба. Стволовите клетки на перикоронарните фоликуларни тъкани могат да бъдат изолирани и култивирани при подходящи условия. Целта на това изследване е да се изолират перикоронарни стволови клетки от дентални фоликули и да се разкрие тяхната способност за експресия на мезенхимни и епителни маркери, както и да се диференцират до различни типове клетки. Клетките се изолират и засяват при стандартни условия за клетъчно култивиране. Клетъчната морфология и експресията на специфични за стволови клетки и тъканно специфични маркери се определят чрез флуоресцентна микроскопия. Стимулирана е остеогенна, адипогенна и хондрогенна диференциация на изолираните клетки. За тази цел клетките се засяват в продължение на 10 дни с дексаметазон, аскорбинова киселина и  $\beta$ -глицерофосфат за остеогенна, дексаметазон, IBMX и инсулин за адипогенна и дексаметазон, аскорбинова

киселина и TGF- $\beta$ 1 за хондрогенна диференциация. Способността за диференциране на стволовите клетки се установява чрез имунофлуоресценция или оцветяване с багрилата Alizarin red, Oil red-O и Alcian blue. Изолираните клетки разкриват положителна флуоресцентна експресия както за мезенхимни, така и за епителни маркери. Клетките експресират маркери на стволови клетки и са способни при подходящи условия да се диференцират до различни типове клетки, включително остеобласти, хондробласти и адипоцити. В зъбния фоликул има резерв от стволови клетки със специфичен фенотип, способни да се диференцират до високоспециализирани клетъчни типове. Денталният фоликул е представен като нов източник на мезенхимни стволови клетки от възрастни организми.

**Научни публикации и прояви:**

- Ishkitiev N, Miteva M, Mihaylova Z, et al. Dental Follicle: a Source of Stem Cells, poster, 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), June 2019, Vancouver, Canada.

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

# КОНКУРС „СТИМУЛИРАНЕ НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТИ С ПОСТИГНАТИ ВИСОКИ ПОСТИЖЕНИЯ’ 2019”

## Договор 237/ 2019 Приложение на PRF(Platelet rich fibrin) в хирургичната пародонтална терапия

Изследователски екип: Доц. Антоанета Митева Млъчкова, дм

- Гл. ас. Величка Досева - Панова
- Ас. Христина Майналовска
- Ас. Здравка Пашова-Тасева, докторант
- Проф. Христина Попова
- Иван Иванов, докторант

**Базова организация:** Катедра по пародонтология, ул. Св. Георги Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** В настоящия проект участие взеха 20 пациенти с диагноза умерен до тежък генерализиран пародонтит. Диагнозата е потвърдена чрез клинични – дълбочина на пародонталните джобове, загуба на клиничен аташман (прикрепване) и рентгенографски методи на изследване. Рентгенографски бяха установени места с вертикална костна загуба и присъствие на инфраосални костни дефекти. Пациентите бяха разделени на две групи: - I-ва група - при които беше извършено хирургично лечение с комбинирано прилагане на PRF и костен заместител, и II-ра група - хирургично лечение с прилагане на костен заместител без прилагане на PRF. Целта на настоящото проучване беше да изследват ефектите на два хирургични протокола при лечението на пародонтити с присъствие на вертикални костни дефекти. Установените резултати от проведеното изследване са съизмерими с критерия печалба на клинично прикрепване в резултат от формирането на реаташман - възстановяване на загубено вследствие деструкция съединително - тъканно прикрепване по кореновата повърхност. Според изследователите от настоящият екип са изпълнени основните цели на регенеративната терапия, свързани с: формиране на нов цимент; формиране на нов периодонтален лигамент; формиране на нова кост. Получените резултати показват съществена печалба на кост при всички пациенти – 3.48 мм (средна аритметична стойност). В същото време, сравнявайки двете изследвани групи, установихме статистически значими разлики в показателите като има данни за рентгенографско присъствие на остатъчен костен джоб от 0.56 мм в I-ва група Cerabone+PRF в сравнение с II-ра група само Cerabone самостоятелно – 1.64 мм. В първия случай се установява получено костно запълване 4.05 мм, а във втория – 2.54 мм. При изследваните пациенти постигнатите резултати са свързани с рентгенографски определен ъгъл на костния дефект от около 30° (29.34° средна стойност). Тъй като в групата със Cerabone самостоятелно средната стойност на този ъгъл е 26.82°, а в групата Cerabone+PRF – 30.89°, бихме могли да направим извод, че рентгенографският ъгъл до 30°- 33° е благоприятен за осъществяване на оптимална костна регенерация. В настоящото изследване са установени следните статистически значими разлики (p<0.05) в зависимост от пола по показателите: Дълбочина на сондиране на джоба; Печалба на клинично прикрепване; Рентгенографска дълбочина на костния дефект преди и след пародонталната хирургия; Костна загуба/възраст на пациента; FMPS; BOP. Между двете изследвани групи

са установени са статистически значими разлики ( $p < 0.05$ ) по показателите: Дълбочина на сондиране на джоба; Печалба на клинично прикрепване; Печалба на кост. Между двете изследвани групи са установени статистически значими разлики ( $p < 0.01$ ) по показателя: Рентгенографска дълбочина на костния дефект преди и след пародонталната хирургия = костно запълване в милиметри.

#### **Научни публикации и прояви:**

- Maynalovska H, Popova C, Mlachkova A. Radiographic evaluation of bone filling in intrabony periodontal defects with Cerabone® as a bone replacement graft: case series. Journal of IMAV 2022;22(2)

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

### **Договор 238/2019 Проследяване степента на изчистване от инфекция с високорискови типове човешки папиломни вируси при жени с койлоцитни цервикални зони и/или наличие на нискостепенни сквамозни интраепителни лезии на цервикса**

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

- Проф. Албена Тодорова-Георгиева, дбн
- Ас. Анита Кавръкова, дб
- Кремена Месечкова
- Янка Дангулова

**Базова организация:** Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, ул. Здраве 2, София, 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта е да се проследи ефективността на изчистване от инфекция с високорискови типове човешки папиломни вируси (ЧПВ) при жени с койлоцитни цервикални зони и/или наличие на нискостепенни сквамозни интраепителни лезии на цервикса (ASC и LSIL). Приложихме съвременни скринингови методи, които включват ДНК анализ за генотипиране на високорискови ЧПВ и течна-базирана цитология (ТБЦ). Най-често детектираните високорискови типове ЧПВ в групата на пациентките с ASC цитологични изменения са: 16 тип ( $8/25=32\%$ ); 18 тип ( $6/25=24\%$ ); 31 тип ( $5/25=20\%$ ). Високорисковите типове 33, 35 и 56 са разпространени с еднакъв процентен дял  $33;35;56/25=8\%$ . Детектирахме 3 пациентки с ко-инфекция на 16/31 тип ЧПВ (12%) и 2 с ко-инфекция на 16/31/35 тип ЧПВ (8%). Най-често детектираните високорискови типове ЧПВ в групата на пациентките с LSIL са: 16 тип ( $5/10=50\%$ ); 18 тип ( $3/10=30\%$ ), докато 31 и 56 тип са детектирани с еквивалентен процентен дял на разпространение  $33,56/10=10\%$ . Детектирахме 1 пациентка с ко-инфекция 16/31, 1 с ко-инфекция 16/18 и 1 с ко-инфекция 16/56, т.е 10% е представен всеки вариант на ко-инфекция в тази подгрупа. В групата на ASC и LSIL позитивните пациентки са приложени терапевтични схеми: с изопринозин, кориолус, изопринозин + адювант кордицепс и палиативно наблюдение. След проведените лечения в двете цитологични групи се наблюдава почти пълно изчистване на високорисковите типове ЧПВ в ~ 70% и цитологична регресия към подобрение или норма. Като персистиращ високорисков тип и в двете групи се наблюдава тип 16, който се счита за най-висок онкогенен потенциал и преобладава дълговременна инфекция с него в пациенти с вариантите на ко-инфекция. В тези случаи няма положителна промяна в цитологичната оценка. Трите терапевтични схеми показаха сходни резултати по отношение период на

изчистване на инфекция с високорискови типове ЧПВ, като най-висока ефикасност регистрирахме за кориолус. Високорисков тип ЧПВ 16 показва най-висока резистентност към различните терапевтични схеми.

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

**Договор 239/ 2019** Роля на генетичните полиморфизми на CYP2C9 и VKORC1 при управление на антикоагулантната терапия в постоперативния период след кардиохирургия

**Изследователски екип:** Доц. Милена Георгиева Велизарова, дм

- Проф. Добрин Свинаров, дмн
- Гл. ас. Жулиета Христова-Димитрова, дм
- Гл. ас. Филип Абединов, дм

**Базова организация:** Катедра по клинична лаборатория, ул. Св. Г Софийски 1, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Сърдечната хирургия се свързва с възпалителен отговор и хиперкоагулно състояние, които изискват надеждна постоперативна антикоагулация. Целта на нашето проучване е изследване на влиянието на генетичните варианти в два генни локуса, отговорни за терапевтичния отговор към аценокумарол след кардиохирургия. В проучването са включени 200 постоперативни пациенти с аценокумаролова тромбoproфилактика, които бяха мониторирани според стойностите на INR в първите пет дни от лечението. Извършено бе генотипиране на VKORC1 1639G>A и CYP2C9\*2&\*3 полиморфизми чрез RT-PCR. Анализирани са сигнификантните разлики в INR на първи, трети и пети ден от началото на лечението с аценокумарол. Средната възраст към момента на хирургичната интервенция бе 63.9±10.8 години; 66.5% от пациентите бяха мъже. Средният BMI бе 28.6±5.4 kg/m<sup>2</sup>. Разпределението на VKORC1 и CYP2C9 генотипи беше за G/G\*1/\*1–24.5%, G/G\*1/\*2–9.5%, G/G\*1/\*3– 7%, A/G\*1/\*1–27%, A/G\*1/\*2–10%, A/A\*1/\*1– 9.5% и A/A\*1/\*2–5%. Сравнението на стойностите на INR, не показва статистически значими разлики сред генотипните групи на първи (p =0.51) и пети (p =0.67) ден. По-големи разлики в INR бяха установени на трети ден (p = 0.02). Вероятността за субтерапевтичен антикоагулантен отговор (INR < 1.5) на трети ден бе по-висока (P<0.05) в групата с нормален в сравнение с тази с мутантен генотип. Генотиповете A/G\*1/\*1, A/G\*1/\*2, A/A\*1/\*1 и A/A\*1/\*2 се асоциираха с по-висок риск от "хиперреактивни" резултати (INR> 3.5) и по-висок риск от кървене. Сравняването на тези с нормален отговор (n = 82) с общата кохорта на „хиперреактивните“ показва, че първата група е имала сигнификантно по-ниски стойности (p=0 .006)) и по-висок риск от неадекватна тромбoproфилактика (61% vs. 16.2%, P<0.001) на третия ден от терапията. Наличието на мутантни алели в VKORC1 1639G>A и CYP2C9 \*2 §\*3 предполага приложението на по-ниски дози аценокумарол. Пациентите с див тип на двата гена по-често не достигат терапевтични нива на INR в сравнение с тези с мутантни алелни варианти.

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

**Договор 240/2019    Разработване на прицелен панел-базиран генетичен тест за идентифициране на мутации, водещи до наследствени очни заболявания**

**Изследователски екип:** Проф. Радка Петрова Кънева, дб

- Проф. Силвия Чернинкова, дмн
- Проф. Ивайло Търнев, дмн
- Кунка Каменарова, дб
- Даниела Пенчева, дб
- Калина Михова
- Радосвета Божилова
- Фелиция Шакола, дб
- Вероника Петкова
- Акад. проф. Ваньо Митев, дбн

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

**РЕЗУЛТАТИ:** Наследствените дегенерации на ретината (НДР) са хетерогенна група заболявания, които засягат главно ретината; повече от 300 гени са свързани със заболяването и са описани над 20 различни клинични фенотипа. Тази клинична и генетична хетерогенност значително усложнява идентифицирането на патогенните мутации. Следователно, поставянето на точна генетична диагноза е важно за генетичното консултиране и определяне на лечението. Целта на нашето проучване беше да се определи мутационния спектър при българска група от 16 несвързани пациенти с различни НДР. В това проучване разработихме метод, базиран на прицелно секвениране от ново поколение (НГС), който включва 149 гена, свързани с НДР в нашата и общата популация, 59-асоциирани с НДР интронни райони и три митохондриално-кодирани гени (0,6 Мб геномна област). Използван беше системен ход за филтриране, съчетан с анализ на промяна в броя на копията, за установяване на патогени варианти, впоследствие потвърдени от директно секвениране и сегрегационен анализ, когато беше възможно. Общо 16 патогенни мутации, 4 от които са описани за първи път в това проучване (25%), бяха открити при 81% от пациентите с НДР (13/16). Установени бяха мутации в 9 от най-честите НДР-гени, *ABCA4*, *PRPH2*, *USH2A*, *BEST1*, *GUCA1B*, *RPI*, *RGR*, *CDHR1* и *RHO*, обясняващи 100% от случаите с дегенерация на макулата, 57% от случаите на пигментен ретинит, 100% от случаите със синдром на Usher и 100% от случаите с дистрофия cone-rod. При трима пациенти от мъжки пол (19%) с пигментен ретинит генетичната причина за заболяването не бе открита, може би дължащо се на непокрита област в основен ген за X-свързаната форма на ретинопатията, *RPGR*. При един от пациентите, носещ мутация в *GUCA1B*, беше предположена междуфамилна фенотипна вариабилност в изявата на ретинопатията. В заключение, нашите резултати установяват прицелното НГС, основано на подбрано секвениране на често мутиращи и специфични за популацията гени, като успешен цялостен подход за генетична диагностика и консултиране на пациенти с НДР.

**Научни публикации и прояви:**

- Mermeklieva E, Kamenarova K, Mihova K, et al. A rare case of RGR/CDHR1 haplotype indentified in Bulgarian patient with cone-rod dystrophy, *Ophthalmic Genetics* 2021:1-6.

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

**Договор 241/2019 Изследване на промените в термодинамичните параметри на белтъците в кръвната плазма на пациенти с рак на млечната жлеза, вследствие от провеждането на химиотерапия и лъчелечение**

**Изследователски екип:** Гл. ас. Силвия Марчева Абарова, дф

- Акад. Борис Тенчов, дбн, дф
- Гл. ас. Борислава Мирчева, дф
- Проф. Петранка Кънева-Троянова, дм
- Ас Надя Накова
- Илия Габровски
- Гл. ас. Ива Вълкова, дх
- Стела Захаринова, студент

**Базова организация:** Катедра Медицинска физика и биофизика, ул. Здраве 2, София 1431

**РЕЗУЛТАТИ:** Целта на настоящия проект бе да се проучат настъпилите конформационни промени в основните белтъци в кръвна плазма на пациенти с РМЖ, в хода на приложените химио- и лъчетерапия, спрямо контроли от здрави индивиди. Това изследване би спомогнало за получаване на допълнителна важна информация относно въздействието на двата терапевтични подхода, както върху развитието на заболяването, така и върху ефекта от лечението. Друга основна цел на проекта бе проучване на процесите на взаимодействие между основния плазмен протеин – албумин, основният лекарствен транспортер, с лекарствени вещества, използвани в курса на лечение на РМЖ, изследване на структурните особености на белтъка след свързването му и типа на взаимодействие, което би имало отношение към терапевтичната ефективност на лекарството. Това според нас представлява интересна изследователска задача с голям принос в клиничната онкология. От проведените изследвания посредством ДСК, флуоресцентна и UV-Vis абсорбционна спектроскопия получихме следните резултати: ДСК термопрофилите на плазмения протеом на пациенти с РМЖ значително се различават от тези на контролните проби (от здрави доброволци). В термограмите на болни, подложени на адювантна химиотерапия, както и пациенти на комбинирана терапия от химио- и лъчелечение се наблюдава промяна в температурата на денатурация, уширяване на пиковете на албумина и имуноглобулините, както и наличие на допълнителни високотемпературни пикове. Епирубицин образува стабилен комплекс с плазмения протеин, дължащо се на неспонтанни хидрофобни взаимодействия между белтъка и лиганда, които водят до частична имобилизация на плазмения протеин. Високите концентрации на Епирубицин водят до силно нарастване на пост-денатурационната агрегация на HSA. Химиотерапевтикът Пертизумаб образува стабилни комплекси с плазмените протеини албумин и фибриноген, посредством статичен тип взаимодействия, водещо до значителни конформационни промени около мястото на свързване и драстични промени в термостабилността на плазмените протеин.

**Научни публикации и прояви:**

- Abarova S, Papageorgiu A, Ivanov Y, et al. Warfarin replaces dexamethasone in drug complexes with human serum albumin. A fluorescence spectroscopy study. Bulgarian Chemical Communications. 2020; 52 (3): 404-408.
- Abarova S, Antonova B, Stoichkova K. et al. Spectroscopic and thermodynamic characterization of the chemotherapy drug Epirubicin interaction with human serum albumin. Bulgarian Chemical Communications

- Захаринова С, Абарова С, Накова Н и др. Биофизични методи за изследване взаимодействието на плазмени белтъци с химиотерапевтици за лечение на рак на млечната жлеза. 48-ма национална конференция по въпросите на обучението по физика. гр.София. 2-4 октомври 2020 г.
- Antonova B, Abarova S, Zaharinoва S, et.al. Binding studies of cisplatin accord chemotherapy drug with blood plasma proteins, a microcalorimetry and spectroscopy study. XIII National medical physics and biomedical engineering conference: NMPEC-2020, Sofia. 2-13 Nov 2020.
- Nakova N, Troyanova P, Gabrovski I, et.al. Interaction of a monoclonal antibody drug, Pertuzumab, with human serum albumin (HSA): application of spectroscopic and thermoanalytical techniques. XIII National medical physics and biomedical engineering conference: NMPEC-2020, Sofia. 2-13 Nov 2020.

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



**SCIENTIFIC PROJECTS 2018 – 2019**  
**WITH FINANCIAL SUPPORT OF**  
**MEDICAL UNIVERSITY – SOFIA**

**Contract 53/2018 Molecular genetic study of *Clostridium difficile* strains isolated from asymptomatic patients and antibiotic resistance status****Research team:** Prof. Lyudmila Boyanova Georgieva, MD, PhD, DMSc

- Assoc. Prof. Romyana Markovska-Davidkova, PhD,
- Dr Daniel Yordanov, PhD
- Dr Galina Gergova
- Dr Nikolay Kalvachev, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology

**RESULTS:** There are scanty reports about *Clostridioides (Clostridium) difficile* colonization in asymptomatic children > 2 years. We evaluated asymptomatic *C. difficile* carriage among 61 children > 2 years of age hospitalized in a University pediatric hospital and a kindergarten and compared the results with those from some literature data published since 2010. In our study, *C. difficile* colonization was 6.6% and no colonization with toxigenic *C. difficile* was found. This can be explained by the reported high *C. difficile* colonization rates (from 0 to 45%, often >20%), but predominantly in children aged <2 years, while the children in our study were aged 2-17 years (mean age, 6.9 years). Asymptomatic prevalence of toxigenic *C. difficile* in childhood widely ranged from 0-2.5% as in our study, in a study of Japanese neonates, in healthy preschool children in Sweden and in rural Ghana to 23.1% in hospitalized Japanese children with underlying diseases. Presence of binary positive carriage was very low or absent. Inflammatory bowel disease and PPI use have been suggested as risk factors for *C. difficile* carriage. Similarly, in our study, only 4 nontoxigenic carriers were found, including one of 6 inflammatory bowel disease children and one of seven children taking proton pump inhibitors. In the literature, there has been a wide variation in prevalence of both *C. difficile* and toxigenic *C. difficile* carriage in asymptomatic children and the most common risk factors were age, recent antibiotic use, tube feeding and use of proton pump inhibitors. Briefly, the results of our study showed no detectable risks for *C. difficile* infections in the Bulgarian pediatric university hospital and in the day care centers evaluated. However, regular monitoring of *C. difficile* carriage, especially of the toxigenic *C. difficile* is necessary to minimize the risk of clinically expressed diseases.

**Scientific publications and presentations:**

- Boyanova L, Markovska R, Hadzhiyski P, et al. Recurrent *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in a patient suffering from inflammatory bowel disease and benefits of resistotyping. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 Aug;94(4):334-336.

**Contract 54/2018 Investigation of mechanisms of chromosomal and plasmidic quinolone resistance among cephalosporine third generation resistant or/and carbapenem resistant clinically significant isolates *Klebsiella spp* in university hospital “Saint Marina” Varna****Research team:** Assoc Prof. Romyana Donkova Markovska-Davidkova, MD, PhD

- Prof. Temenuga Stoeva, MD, PhD - MU-Varna

- Petya Stankova
- Gergana Kuyumjieva, MD, MU-Varna
- Prof. Lyudmila Boyanova, MD, PhD, DSI
- Kalina Mihova
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Corr. Member of BAS Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSI

**Organization unit:** Dept. of Medical Microbiology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the present project was to investigate quinolone and cephalosporin third generation and / or carbapenem resistant clinical isolates *Klebsiella spp* in the UH - Varna. A polymerase chain reaction and sequencing was used to determine the type of beta-lactamases for replicon typing. Epidemiological typing was by ERIC PCR and MLST. Between January 2014 and December 2017, a total of 1084 *Klebsiella pneumoniae* isolated in the St. Marina Marina University of Varna were studied. Of these, 159 isolates, third-generation cephalosporin and / or carbapenem resistant, from patients in the hospital were selected for a follow-up study, as well as one human hand isolate obtained under internal sanitary control. The collected isolates showed high levels of resistance to aminoglycosides and quinolones, and a relatively high level of resistance to carbapenems - 22.6%. With regard to ESBL, CTX-M enzymes, predominantly CTX-M-15 predominate in 91% of the strains. Very important is the presence of carbapenem-resistant *K pneumoniae* - 36 isolates. Twenty-eight of them produced KPC-2 and CTX-M-15, two KPC-2 only. Three isolates produced NDM-1, CMY-4 and CTX-M-15. We also demonstrated six isolates producing DHA-1 and CTX-M-3, as well as single isolates producing KPC-2 and VIM-1, VIM-1 and SHV-12 as well as OXA-48 and CTX-M-15. Isoelectric focusing confirmed the presence of these enzymes. In 146 conjugation experiments we received 56 transconjugants, the quinolone resistance coding determinants were transmitted at 16 transconjugants and *bla*<sub>ESBL</sub> in all the strains obtained. In 49% of the isolates we proved *qnrB*, with *qnrB9* being predominant. We found *qnrS1* at 8.4%. The *OqxA* gene positives in 100%, and *oqxB* in 96.1%. 17 MLST types corresponding to the specified ERIC types were identified. The most frequent were ST15 in 40.9% of the isolates, ST11 in 20.1% and ST35 in 5.2%.

**Scientific publications and presentations:**

- Nedelcheva G, Stoeva T, Markovska R, et al. Antibiotic susceptibility of clinically significant isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients hospitalized at the University of Medicine and Pharmacy "St. Marina" - Varna for the period 2014-2017.
- Markovska R, Stoeva T, Stankova P, et al. First report of *Enterobacter asburiae* isolate, producing NDM-1 and a novel ACT-68 enzyme in Bulgaria. Infect Dis (Lond). (ex-Scandinavian Journal of Infectious Diseases). 2019 Aug;51(8):627-629.

**Contract 55/2018 Haplotype analysis for identification of linkage between some *CLCN1* mutations in patients with myotonia congenital type Becker**

**Research team:** Assist. Prof. Bilyana Georgieva Georgieva, PhD

- Acad Prof Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSci
- Savina Tincheva, PhD
- Assist. Prof. Ani Miteva

- Angelina Mandadzhieva
- Zornitsa Pavlova - PhD student

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Srt., 1431 Sofia

**RESULTS:** The present study has a pilot role in linkage analysis of some *CLCN1* mutations in myotonia congenita type Becker patients in Bulgaria. In total, 46 probands from Bulgarian and Italian (Sicilian) descent have been subjected to haplotype analysis. In the Bulgarian group, the most frequent alleles for the p.Arg894\* carriers have been detected with a higher frequency compared with the control samples. However, LOD score analysis for the markers of choice did not show a satisfactory result ( $LOD \geq 3$ ) for identification of a particular haplotype linked to the mutation of interest. In order to achieve statistically significant results, analysis of a higher number of p.Arg894\* carriers has been planned for our future work. Our results have been compared to a founder haplotype found within a study of Russian *CLCN1* p.Arg894\* carriers. Unfortunately, only four of the investigated markers show overlapping result. This raises the question whether or not it is meaningful to hypothesize an Eastern European ancestry of the p.Arg894\* mutation. In regard to the Italian group, the comparison of the most frequent alleles among the p.Gly190Ser carriers with the controls did not show any significant difference. Hence, a founder effect can most probably be excluded, mostly in the context of the higher number of analysed patients. LOD score analysis provided a confirmation of this assumption, as no linkage between the p.Gly190Ser mutation and the analysed markers has been found. Based on the total results, obtained during the present work, no founder effect for mutations in the *CLCN1* gene can be proven yet, neither for the Bulgarian, nor for the Italian population.

### **Contract 56/2018    Molecular mechanisms of mutagenesis in Bulgarian patients with Angelmann syndrome**

**Research team:** Prof Albena Parvanova Todorova-Georgieva, PhD, DSc

- Acad Prof Vanyo Mitev, PhD, DSc
- Assist. Prof. Bilyana Georgieva, PhD
- Assist. Prof. Ani Miteva
- Slavena Ategin - PhD student
- Tihomir Todorov, PhD

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Srt., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the present work was to determine the molecular mechanisms of mutagenesis in Bulgarian patients with Angelmann syndrome (AS). Altogether 24 patients (11 boys, 13 girls) from 22 unrelated families with suspected clinical diagnosis AS were analysed. In 9 families (41%) pathogenic mutations were detected, which confirms on molecular-genetic level the clinical diagnosis. We applied modern molecular-genetic techniques- DNA sequencing, MLPA, MS-MLPA. Various molecular mechanisms of mutagenesis were found in our families- deletion of maternal 15q11-q13 region, point mutations in *UBE3A* gene, paternal uniparent disomy, imprinting defect. In 4 (44%) of the proven families we found of 15q11-q13 region deletion with breakpoints BP1-BP3 or BP2-BP3. In 1 (11%) of the proven families we found imprinting defect- deletion of the AS-SRO regulatory region (part of the PWS-AS imprinting

center). Such microdeletion leads to lack of methylation in the 15q11-q13 region and to overexpression of the genes from AS critical region. In 1 (11%) of the proven families we detect rare finding- uniparental dysomy (the patient did not inherit *UBE3A* gene from the mother). In 3 (33%) of the proven families we found different point mutations in the *UBE3A* gene- two missense mutations c.488T>C; p.Leu163Ser and c.1832A>T; p.Gln611Leu (described for the first time now) and one frameshift mutation c.2576\_2579delAAGA; p.Lys859Argfs\*4 (previously published). The obtained results highlight and support our hypothesis that the specific nucleotide architecture in relevant parts of the gene determines a higher probability of DNA polymerase errors resulting in generation of point mutations in the targeted regions. The obtained results helped us to develop a systematic diagnostic algorithm in order to provide proper diagnosis for the patients. Combining excellent knowledge in the molecular mechanisms of mutagenesis and proper molecular-genetic diagnosis gives opportunities for adequate genetic counseling and prophylaxis of the disease in the affected families with AS.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Pavlova Z, Todorov T, Ategin S, et al. Molecular mechanisms of mutagenesis in Bulgarian patients with Angelmann syndrome. Third Doctoral Symposium “Molecular biology – from the molecules to the cells and back”. Institute of Molecular Biology “Acad. Rumel Tzanev”, 7-8 March 2019, Sofia.
- Georgieva B, Ategin S, Todorova A, et al. Molecular-genetic diagnostics of Angelman syndrome – the Bulgarian experience. *Acta Medica Bulgarica* 2020;47(1).

#### **Contract 57/2018 Microbiological and genetic studies on antibiotic resistance in *Streptococcus pyogenes* and other beta-hemolytic streptococci**

**Research team:** Assoc. Prof. Raina Tzvetanova Gergova, MD, PhD

- Cor. Memb.Prof. Ivan Mitov, Dsci
- Assoc. Prof. Romyana Markovska - Davidkova, MD, PhD
- Assistant Professor Adile Muhtarova, PhD
- Assistant Dr Virna Maria Tsitou, PhD
- Professor Radka Kaneva, MD, PhD
- Kalina Mihova

**Organization unit:** Medical University - Sofia, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology

**RESULTS:** The aim of the work was to study the resistance to macrolides, lincosamides, tetracyclines, quinolones in Group A (GAS) and B (GBS) beta-hemolytic streptococci using both phenotypic and genotypic methods. A collection of 449 clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* (GAS), collected during the period 2013-2020, and 107 *Streptococcus agalactiae* (GBS), 2017-2018 was used to achieve this goal. The present study showed that 31.5% of GAS strains and 58.88% of GBS were macrolide-resistant and 14% GAS, respectively. 16% of the GBS have decreased sensitivity to clindamycin. Tetracycline/quinolone resistant are 10.3% / 0% GAS and resp. 94.62% /10.28% GBS. For the first time in Bulgaria, a new gene, *msr(D)*, has been discovered and sequenced, which proves the level of macrolide resistance in M-phenotype expression and occurs in all GAS with *mef(A)*. The connection between the rapidly growing macrolide resistance in recent years in Bulgaria, is connected with the appearance of a problem

clone *emm28* in a combination with *ermB*<sup>+</sup> isolates encoding a high level of resistance. The antigens of this serotype are including in the 30 valent vaccine. The vaccine is in the final stage of testing and covers all proven serotypes of the Bulgarian macrolide resistant isolates GAS. Despite the heterogeneity found in the *ermA*<sup>+</sup> strains, it can be said that the serotypes *emm12* and *emm77* were predominant. In the present study, the *tet(M)* gene was the predominant genetic determinant in the tetracycline-resistant strains at 85%, and was found in both macrolide-sensitive and macrolide-resistant GAS. Less commonly, *tet(O)* was present, in 15%, but more often correlated with macrolide resistance. The tendency for ascending gradation in macrolide resistance in Bulgarian clinically significant isolates of beta-hemolytic streptococcal groups A and B and the fact that more than 22% of the GBS isolates studied are already MDR. This shows that three of the antimicrobial groups considered suitable for the treatment of streptococcal infections are becoming ineffective.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Muhtarova A, Gergova R, Mitov I. Evolution of macrolide resistance in Bulgarian clinical isolates *Streptococcus pyogenes* during the period 2013-2018. Health and Science, num. 2019; 1-2, 21-25;
- Muhtarova A. Microbiological and Genetic Studies on Clinical Isolates *Streptococcus pyogenes*, PhD thesis, Sofia, 03.12. 2018. Scientific coordinator: Assoc. Prof. Dr. Raina Gergova.
- Muhtarova A, Mihova K, Markovska R, et al. Molecular *emm* typing of Bulgarian macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2019;1-4
- Muhtarova A, Gergova R, Markovska R, et al. "Macrolide resistance and emm type distribution of group A streptococcal isolates from Bulgarian patients" 14 Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, Hissarya, October, 10-13 13

#### **Contract 58/2018 Participation of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors in generation of oscillatory potentials in the ON and OFF response of the electroretinogram**

**Research team:** Assoc.Prof. Petia Nikolova Kuppenova-Sherbanova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Elka Popova, MD, PhD
- Prof. Liliya Vitanova, MD, DSci
- Veselina Mihaylova, student
- Alexander Alexandrov, student

**Organization unit:** Dept physiology, 1 G Sofiiski St, Sofia 1431

**RESULTS:** In order to clarify the participation of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors in generation of oscillatory potentials (OPs) in the ON- and OFF- response of the electroretinogram (ON-OPs and OFF-OPs), we fully separated the ON and OFF responses in the electroretinogram (ERG) of frog (*Rana ridibunda*) using stimuli of long (3s) duration applied at 30 sec intervals in the dark. The ERG oscillatory activity was isolated by means of frequency filters (20-300 Hz band-pass). We followed the effects of a selective blockade of GABA<sub>A</sub> receptors with bicuculline (1 μM, 10 μM 50 μM) and GABA<sub>C</sub> receptors with TPMPA (1 μM, 10 μM 100 μM) on the ERG. Both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptor blockade produced a significant increase in the b-wave (ON-response) and d-wave (OFF-response) of the ERG. However, the effects of the two blockades on

the OPs, superimposed on the b- and d-waves, differed significantly. The early OPs (O<sub>1</sub>-O<sub>3</sub>) and the following late OPs demonstrated different pharmacological reactivity. The GABA<sub>A</sub> receptor blockade resulted in an increase of the amplitude of the early OPs of both ON and OFF responses, but an amplitude decrease or abolishment of the late OPs. The GABA<sub>C</sub> receptor blockade affected only the ON-OPs and produced an enhancement of the amplitude of both early and late ON-OPs. Immunocytochemical study was performed, which showed specific distribution of subunits of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors in the ON and OFF sublayers of the inner plexiform layer, supporting the electrophysiological data. It also implied that neural networks, including serial synapses of horizontal or amacrine cells, may contribute to generation of OPs. The results obtained demonstrate that both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors are strongly involved in generation of oscillatory potentials in the electroretinogram and that there is a clear ON/OFF asymmetry in their contribution to the electrical oscillatory activity.

**Scientific publications and presentations:**

- Kупeнoвa P, Pоpоvа E, Mиhаyлoвa V. GABA-A receptor-mediated modulation of oscillatory potentials in the ON- and OFF-response of the frog electroretinogram. Bulgarian Society of Physiological Sciences – Sofia branch: Scientific meeting 23 November 2018, Sofia, Bulgaria.

**Contract 59/2018 New generation targeted sequencing for identification of genetic mutations in Bulgarian familial hematuria cases**

**Research team:** Assist. Prof. Olga Jivanova Beltcheva, PhD

- Assist. Prof. Galia Zlatanovа-Rashkova, MD
- Assoc. Prof. Polina Miteva-Shumnalievа, MD, PhD
- Assoc. Prof. Valentin Lazarov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Maria Gaidarova, MD, PhD
- Assist. Prof. Dimitar Roussinov, MD, PhD
- Kalina Mihova
- Darina Kachakova-Jordanova, PhD
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad Prof. Vanio Mitev, MD, PhD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave 2 Str. 1431 Sofia

**RESULTS:** Haematuria, the presence of red blood cells in the urine can be a symptom of multiple disorders, including genetically determined abnormalities in the glomerular basement membrane. The ethology of these familial haematuria is not completely understood, while at the same time the genes known to contribute to the disorder are very large and difficult to study, which hinders the genetic testing in affected patients. The next generation sequencing technique offer a solution to both these problems. We report here our attempt to use this approach by performing targeted exome sequencing using TruSight One (Illumina) gene panel for four patients with familial haematuria. In two of these cases a *COL4A5* mutation was detected and the affected males were diagnosed with X-linked Alport syndrome. In one of the families a novel splice variant affecting the donor site of exon 30 was identified, c.2509+2T>G. This nucleotide change is absent in the public databases and segregates with the disease in the family. This allowed us to classify it as pathogenic. The other variant identified in a patient was a known

mutation associated with a milder phenotype p.Gly624Asp. No collagen type IV variants were observed in the remaining two cases, although known mutations in other, potentially relevant genes were found – p.Gly34Arg in *CIQC* and p.Gly191Arg in *FGG*. Mutations in *CIQC* and *FGG* are associated with autosomal recessive conditions, C1Q deficiency and dysfibrinogenemia. Even though not commonly associated with these conditions, haematuria is observed in some cases. In our patients, both variants are heterozygous, which means they are not the causative factor for the disorder. Still, with both being pathogenic, we cannot exclude their having a modifying effect on the phenotype. In summary, we found the exome sequencing both sensitive and reliable technique for genetic diagnosis of familial forms of haematuria.

**Scientific publications and presentations:**

- Beltcheva O, Kamenarova K, Mihova K, et al. Next generation sequencing approach for determining the molecular basis of familial hematuria. Eur Human Genetics Conference, Gothenburg, Sweden, Jun 15-18, 2019

**Contract 60/2018 High-resolution genomic screening for unbalanced genomic alterations of transitional cell carcinoma of the urinary bladder**

**Research team:** Assist Prof Olga Sergeevna Antonova, MD, PhD

- Corr. Member of BAS Prof. Draga Toncheva-Miteva, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Savina Hadjidekova, MD, PhD
- Assist. Prof. Rada Cvetkova, MD, PhD
- Assist. Prof. Boris Mladenov
- Assist. Prof. Dragomira Nikolova, PhD
- Viktoria Spasova, MD, PhD student
- Michail Ganey, MD, PhD student
- Zora Hammoudeh, PhD
- Desislava Nesheva, PhD

**Organization unit:** Department Medical genetics, Zdrave 2 str, Sofia, 1431

**RESULTS:** The aim of this study is to perform a complete genomic scan of the transitional cell carcinoma samples from the patients suffering from bladder cancer and to detect unbalanced genomic microaberrations (Copy Number Variations- CNV's) related to tumor progression and metastasis; to thoroughly analyze already established chromosomal regions as well as genes related to tumorigenesis. CNV's of the collected samples were performed by using oligo DNA microarray and SNP array—routinely used for the diagnostic purpose of systemic genetic diseases. A total of 512 aberrations:173 deletions and 337 duplications, have been identified. The highest genetic imbalance was found in chromosomal regions:1p, 1q, 2q, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8q, 9p, 9q, 10p, 11q and 17q. Twelve chromosomal regions of significant interest were detected. They contain genes with tumor, metastatic and proliferative potential. Five loss of heterozygosity (LOH) regions containing 176 genes were also detected in the study. Mutations in *FGFR3* and *CDKN2A/CDKN2B* genes were established. The results obtained are of significant interest as they reveal phenotype-genotype correlations. High level of genomic instability of uroepithelial tumors was observed. Genes that could be used as potential target for precision therapy were defined. The results of this study elucidate the mechanism of tumor invasion due to genetic imbalance by activating genes with metastatic and proliferative potential, as well as select genes



from regions with LOH for evaluation their role as potential tumor-suppressor genes. The study of the genetic imbalances of uroepithelial tumors is still in the scientific field and is not being used as part of routine patient care. Determination of specific chromosomal regions - with duplication/amplification, related to metastatic potential of uroepithelial tumors, by CNV's molecular genetic techniques (oligo DNA microarrays and SNP microarrays), will allow an introduction of these genetic methods in urological practice as part of better patient care.

**Scientific publications and presentations:**

- Antonova O, Mladenov B, Rangelov S, et al. Perspectives for target therapy in the treatment of malignant neoplasms of the urinary bladder. Annual for Hospital Pharmacy, 2018;4 (1):11-17.
- Antonova O. My scientific experience on the quest for better bladder cancer treatment. Science 2018;5:65-66
- Antonova O. In search of the invisible answers for influencing socially significant diseases. European Scientists Night, Sofia, Bulgaria.27.09.2019.
- Antonova O, Mladenov B, Rangelov S, et al. The possibilities of modern genetic methods to improve the clinical prognosis in patients with bladder cancer. XIII National urology congress. 30.5-1.6.2019, Pravetz, Bulgaria. Uronet, 2019 (2):81-82
- Antonova O, Mladenov B, Rangelov C, et al. Clinical impact of copy number variation changes in bladder cancer samples. Exp Therap Med 2021;22:901
- Antonova O, Mladenov B, Rangelov S et al. Molecular signature for improvement of clinical prognosis accuracy in superficial bladder cancer, ESHG.Gothenburg, Sweden.15-18.06.2019. Eur J Human Genetics. 2019; 27(2):1539.
- Antonova O. Personal scientific experience on the quest for better bladder cancer treatment. program Bulgarian Young Scientists, 27-29.06 JRC Ispra.
- Antonova O, Staneva R, Ganev M et al. Detection of CNV's for unbalanced genomic alterations of transient cell carcinoma of the bladder. Second Young Scientists Seminar on Genetics with international Participation.3-5.10.2018, Sofia, Bulgaria
- Antonova O, Rangelov S, Hammoudeh Z et al. Evolution of chromosomal aberrations in patients with bladder cancer: from blood to bladder tumors.13 Balkan Congress of human genetics. Edirne, Turkey. 17-20.04. 2019.
- Antonova O, Mladenov B, Rangelov et al. The power of genetic methods for a personalized approach in the treatment of patients suffering from bladder cancer, II Balkan Conference on Personalized Medicine, Sofia, Bulgaria. 24-25.10.2019.

**Contract 61/2018      **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 Tafradjiiska, MD, PhD
- Assist. Prof. Mimoza Tzvetkova, MD, PhD
- Assist. Zafer Sabit
- Alfa Matheu, student

- Martin Dikov, 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. 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. 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 1hour of heat stress (1h HS) increased pain thresholds in experimental animals compared to animals after 1h HS. Antagonizing CB1-receptors (with AM251), as well as antagonizing the serotonergic 5HT<sub>1A</sub>-receptors (with DPAT) changed the interaction between the agonists (AEA and DPAT) decreasing pain thresholds in experimental animals compared to animals after 1h HS. 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. Agonists-antagonists of cannabinoid receptors in our experiments were injected *before* agonists-antagonists of the serotonergic receptors. It would be interesting to evaluate the effect on pain perception of CB-receptors agonists/antagonists administered *after* agonists/antagonists of the serotonergic receptors. Also of interest would be finding out the interaction between the two systems – endogenous cannabinoid and serotonergic, with agonists/antagonist of both receptors applied after, and not before, stress-induction, as it was in the presented work.

**Scientific publications and presentations:**

- Nocheva H, Sabit Z, Bakalov D, et al. Interactions between the cannabinoid and the serotonergic systems in modulation of pain perception. *Pharmacia* 2021;68:109-115.
- Evtimova Y, Mihaylova V, Angelov T, et al. Serotonergic and endogenous cannabinoid systems interact in modulation of heat stress-induced analgesia. XVII International Congress of Medical Sciences. Sofia. 09-12 May-2019. p89.

**Contract 62/2018 miRNA predictive profile for assessment of the risk for cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus**

**Research team:** Assoc. Prof. Ivanka Istalianova Dimova, MD, PhD

- Assist. Prof. Zheyneva Cherneva, MD, PhD
- Assist. Prof. Radostina Cherneva, MD, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Silva Giragosyan, PhD student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Department of Medical genetics

**RESULTS:** The discovery of miRNAs as promising new biomarkers in the field of cardiovascular disease has caused great expectations. Stability in the bloodstream, specific regulation, as well as high sensitivity and specificity suggest that the feasibility of miRNAs as

CCM biomarkers can even displace protein-based biomarkers. Recent studies of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells have expanded the spectrum of cellular biomarkers capable of providing valuable information in a number of clinical conditions including vascular lesions which are the most common complications of diabetes. In our study, we aimed to analyze by real-time PCR: 1) the mRNA expression in peripheral blood cells for *VEGFR2*, which is most widely recognized as a specific marker for endothelial line identification, and for *VEGFR1* (marker for haemopoietic stem cells) in patients with type 2 diabetes mellitus and different disease duration; 2) miRNA expression in plasma of patients with diabetes with and without cardiovascular disease. Gene-expression analysis showed a mean relative level of 1.77 for *VEGFR2* in the patients compared to the controls without a statistically significant difference; for *VEGFR1* we found statistically significant decrease of expression (0.59) in patients compared to controls. In subgroups with different diabetes duration, we found average relative expression for *VEGFR2* in peripheral blood cells of 1.09 for newly diagnosed diabetes, 2.36 for patients < 5 years of duration, and 2.80 for patients with more than 5 years of diabetes; for *VEGFR1* they were 0.62, 0.49 and 0.59, respectively. Comparison of the mRNA expression of *VEGFR2* in peripheral blood cells of patients without polyneuropathy and those with this complication showed a statistically significant decrease in expression ( $p < 0.05$ ) in patients with polyneuropathy compared to patients without this complication - 0.33 versus 2.18. Endothelial progenitor cells may be an optimal candidate for treatment of diabetic neuropathy, as they possess paracrine properties that include both angiogenic and neurotrophic effects. The results of the miRNA study unambiguously showed increased expression of miR-16, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-210, miR-221 and miR-424 in plasma of patients with diabetes and cardiovascular disease compared to patients having only diabetes. Cardiovascular risk supported by new circulating biomarkers, such as miRNAs, is important for stratification of high-risk individuals, optimizing treatment strategies, and raising our understanding of basic biology.

**Scientific publications and presentations:**

- Dimova I, Dimova R, Giragosyan S, et al. Gene-expression of endothelial marker VEGFR2 in patients with type 2 diabetes mellitus. Military medicine 2019

**Contract 64/2018    How does congenital Systemic lupus in mice affect the quality of oocyte meiosis – experimental mouse model for investigation of oocytes, obtained by hormonally stimulated ovulation and in vitro maturation**

**Research team:** 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. Nikola Mladenov
- Assoc. Prof. Andrey Tchorbanov, PhD
- Assist. Professor Kalina Nikolova-Ganeva, PhD
- Assist. Professor Nikolina Mihaylova, PhD
- Silviya Bradyanova, PhD student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Biology

**RESULTS:** The aim of our study was to investigate the quality of oogenesis in mice from the strain MRL/lpr which develops systemic lupus erythematosus spontaneously. For this aim the cytoskeletal and chromatin structures were analyzed in oocytes of mice at different stages of the disease progression. The following methods were applied: hormonally stimulated ovulation and IVM of lupus mice that did not give birth, as well as lupus mice which had already delivered. The results were compared to those from healthy BALB/c mice. Chromatin, tubulin and actin structures in oocytes were detected by Hoechst 33258, anti alpha-tubulin antibody and rhodamine-labeled phalloidin, respectively. Maturation rate of the oocytes obtained by the two groups of mice were similar - 47,4% versus 47,1%. However, the quality of the cytoskeleton and the chromatin differed dramatically. The mice which never give birth had normal spindles in 22% of oocytes in metaphase I and 16% in metaphase II. Actin caps were normal in more than 65% of the oocytes in this group of mice. Lupus mice which already gave birth showed worse results. In these group only 9% of immature and 7,5% of the mature oocytes had normal spindles. Disorganized and destroyed spindles in both metaphase I and metaphase II were more for these mice. The quality of chromosomes for both mice groups were similar, but those mice which had already delivered showed higher percent degenerated chromosomes. After in vitro maturation, oocyte quality deterioration was observed for all tested parameters. The mice from the strain MRL/lpr with congenital systemic lupus can conceive and give birth only once in their live. Our results show this is probably related to meiotic abnormalities after first pregnancy, leading to a sharp deterioration in cytoskeletal and chromatin quality.

**Contract 65/2018 Investigation of oogenesis-specific chromatin reorganization: chromatid cohesion and condensation, in relation to DNA methylation in *in vivo* and *in vitro* maturing mouse oocytes**

**Research team:** Assoc. Prof. Ralitsa Stefanova Zhivkova, PhD

- Prof. Stefka Delimitreva, PhD
- Assoc. Prof. Maya Markova, PhD
- Assist. Prof. Valentina Hadzhinesheva, PhD
- Assist. Prof. Venera Nikolova, PhD
- Assist. Prof. Irina Chakarova, PhD
- Assoc. Prof. Milena Mourdjeva-Andonova, PhD – BAS

**Organization unit:** MU – Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Biology, 2 Zdrave Str, Sofia 1431

**RESULTS:** The aim of this study was to trace epigenetic reorganization of chromatin and its relation to chromatin package in maturing mouse oocytes. For this purpose, oocytes at different meiotic maturation stages were obtained, their DNA was stained with the fluorochrome DAPI to evaluate the state of chromatin, and indirect immunofluorescence using specific antibodies was applied to localize 5-methylcytosine, *de novo* methyltransferases DNMT3a and DNMT3b, and cohesins. The reaction for 5-methylcytosine was associated with heterochromatin in immature prophase oocytes, then diminished markedly with the transition to metaphase. The methyltransferases DNMT3a and DNMT3b early in the meiotic maturation formed a cluster in the region of nuclear envelope with penetration to chromatin, then spread along the entire nuclear periphery (DNMT3a also in the cytoplasm), retained this localization during metaphase I and reassociated with the chromosomes in metaphase II. Cohesin reaction was initially

associated with chromatin but gradually diminished with the advancement of oocyte maturation and was relocated to the meiotic spindle periphery at the transition to metaphase. No differences were observed between *in vivo* and *in vitro* maturing oocytes. The heterochromatin-restricted reaction for 5-methylcytosine in prophase oocytes and its further reduction at transition to metaphase suggests that oocyte genome is demethylated during meiotic maturation in order to abolish epigenetic repression and create totipotency. This demethylation is confirmed also by the relocation of methyltransferases from the chromatin to the nuclear periphery and the cytoplasm and their retention in this region after nuclear breakdown, probably by binding to unidentified perinuclear structure. The secondary association of methyltransferases with chromosomes in mature oocytes suggests preparation to modify chromatin in case of eventual fertilization. The similar results after *in vivo* and *in vitro* maturation show that epigenetic reorganization of chromatin accompanies the various stages of oogenesis in a regular and reproducible way regardless of the particular circumstances.

**Scientific publications and presentations:**

- Hadzhinesheva VP, Chakarova IV, Delimitreva SM, et al. Centriolar satellites associate with condensed chromatin in early mouse oocytes and undergo redistribution during transition to dictyate. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2018; 32(6):1622-6

**Contract 66/2018 Study the effect of the selective melatoninergic drug agomelatine on inflammatory and morphological changes in brain structures in a model of Alzheimer diseases in male rats**

**Research team:** Prof. Dr Nikolai Elenkov Lazarov

- Assoc. Prof. Dimitrinka Atanasova-Dimitrova, PhD, BAS
- Prof. Jana Tchekalarova, PhD, BAS
- Assist. Prof. Angel Dandov, MD, PhD
- Assist. Prof. Todor Kirov
- Student Maria Vassileva Dinkova
- Sabina Yordanova Mitova

**Organization unit:** Department of Anatomy, Histology and Embryology, 1 G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The purpose of the funded project was to investigate the efficacy of the atypical antidepressant of new generation, melatonin analogue agomelatine on behavioral and morphological changes in certain brain structures in a model of Alzheimer's disease (ADs). Studies on experimental animals and humans indicate that a number of neurodegenerative diseases, including ADs, are characterized by the development of inflammatory processes and morphological changes in certain brain structures as part of their pathophysiology. Our previous results, which found that agomelatine exhibited a potent neuroprotective, anti-inflammatory and antidepressant effect on comorbid behavioral abnormalities in a model of temporal epilepsy in rats, gave us reason to investigate a working hypothesis according to which this drug has a beneficial effect on emotional status and cognition, on the one hand, and morphological disturbances, on the other hand, in a sporadic AD model induced by icv streptozotocin (STZ-ICV) in Wistar rats. In order to achieve the goal, the following methods were applied: implantation of cannulas into the two lateral ventricles and twice infused STZ (model of AD), pharmacological approach associated with chronic treatment with agomelatine 40 mg/kg,

behavioral tests for depression (sucrose preference test and FST), anxiety (EPM) and spatial memory (RAM), morphological and histological methods. Repeated treatment with agomelatine has a beneficial effect on emotional status, hippocampus-dependent spatial memory in STZ-induced AD model in Wistar rats. In contrast to other models where we have found powerful neuroprotective and anti-inflammatory effects in limbic structures, agomelatine has a limited and insignificant effect on morphological disturbances in brain structures observed in an STZ-induced AD model. In conclusion, agomelatine influences behavioral abnormalities, which effect was not mediated by neuroprotection in limbic structures. Future studies are needed to identify the specific mechanisms involved in the effects of agomelatine in STZ-induced model of sporadic ADs.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Dandov A, Atanasova M, Tchekalarova J, et al. Influence of agomelatine in the streptozotocin-induced model of rat in Alzheimer's disease. VIIth National Conference with international participation "Morphological Days", Sofia, Bulgaria, June 8 – 10, 2018.
- Atanasova M, Ilieva K, Tchekalarova J, et al. Preclinical evidence for therapeutic potential of antidepressant agomelatine in Alzheimer's disease and epilepsy. Satellite Alzheimer Symposium in partnership with University of Pittsburgh, Varna, Bulgaria, October 19-20, 2017.

#### **Contract 67/2018 Investigation of the effect of Mesembrine alkaloids on behavioral and endocrine changes in acute and chronic restrain stress in rats**

**Research team:** Prof. Alexander Gueorguiev Stoynev, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Radka Hadjiolova-Tafradjiiska, MD, PhD
- Assist. Prof. Safer Sabit
- Assoc. Prof. Daniela Pechlivanova, PhD
- Prof. Strahil Berkov, PhD, BAS
- Assoc. Prof. Jana Tchekalarova, PhD, BAS

**Organization unit:** Dept. of Pathophysiology, G Sofiiski 1 Str, Sofia 1431

**RESULTS:** The plants containing Mesembrine type alkaloids are used as supplements in maintaining a sense of well-being, and for the treatment of anxiety, stress and major depression disorder. We studied the effects of enriched mesembrenone fraction (MZM) from *Narcissus cv. "Hawera"* on the exploratory and anxiety behavior, nociception, fasting glucose level, and weight of spleen and adrenal gland in adult male Wistar rats exposed acutely and chronically to restrain stress (RS). We used open field test to evaluate the total exploratory activity in novel environment, elevated plus maze for anxiety-like behavior, paw pressure test for nociception. Using Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) we established that mesembrenone represented 64.1 % of the total alkaloid fraction extracted by leaf of *Narcissus cv. "Hawera"*. Acute RS increased the anxiety-like behavior and decreased the rearing but did not change significantly the total ambulation in open field test in rats. RS increased slightly but significantly the fasting glucose level. Single pretreatment with MZM at a dose of 20 mg/kg, significantly reduced anxiety-like behavior expressed as increased distance traveled and re-entrances in the aversive central area of the open field as compared to both the control and RS groups. Chronic RS increased ambulation and decreased anxiety-like behavior and MZM pre-treatment abolished

stress-induced hyperactivity but potentiate anxiolytic behavior in stressed rats. MZM pretreatment diminished the blood glucose level in stressed rats. Present results showed that MZM fraction significantly decrease anxiety-like behavior, and normalized plasma glucose level in rats subjected to acute RS.

**Scientific publications and presentations:**

- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Anxiolytic effects of the mesembrenone in rats. International Congress of Medical Sciences, May 9<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, 2019, Sofia, Bulgaria.
- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Effects of mesembrenone rich alkaloid fraction from *Narcissus cv. "Hawera"* on the Anxiety and depression-like behavior in stressed rats. European College of Neuropsychopharmacology, 07 - 10 Sep, 2019, Copenhagen, Denmark.

**Contract 68/2018    The role of inflammation, oxidative and hemodynamic stress for the development of pulmonary hypertension in copd patients**

**Research team:** Assoc. prof. Valentin Stoychev Lozanov PhD

- Assist. Prof. Vesela Lozanova, PhD
- Assoc. Prof. Rosen Petkov, MD, PhD”
- Assist. Prof. Radostina Cherneva, MD, PhD”
- Assist. Prof. Zheyneva Cherneva, MD, PhD – Medical Institute of Ministry of Internal Affairs

**Organization unit:** Faculty of Medicine, Department of Medical chemistry and biochemistry

**RESULTS:** The study was conducted in 104 clinically stable patients (64 men, 40 women, mean age 62.9 ± 7.5) diagnosed with COPD. All patients underwent basic clinical studies - radiography, spirometry, electrocardiogram, echocardiography and laboratory tests to determine levels of 8-iso prostaglandin F2 $\alpha$  and prostaglandin E2 in urine and resistin in plasma. The main findings of the study can be summarized as follows: Right ventricular diastolic dysfunction contributes to exacerbations, progression and reduced physical capacity of patients with COPD, which requires its early diagnosis and treatment. Our results show that patients with severe COPD have a high incidence of stress-induced right ventricular diastolic dysfunction (78%). Structural changes of the right heart (RAVI, RWT) correlate with stress-induced right ventricular diastolic dysfunction and decreased physical capacity. Since none of the parameters of cardiopulmonary testing correlate with echocardiographic parameters during exercise, early stress-echocardiography is recommended for early diagnosis of right ventricular diastolic dysfunction.

**Scientific publications and presentations:**

- Cherneva Z, Gospodinova M, Denchev S, et al. Stress echocardiography for left ventricular diastolic dysfunction detection in patients with non-severe chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Croat Med J* 2019;60(5):449-457.
- Cherneva R, Cherneva Z. The Role of Stress Echocardiography in the Early Detection of Diastolic Dysfunction in Non-Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Arq Bras Cardiol* 2021,116(2):259-265.
- Cherneva Z, Gospodinova M, Cherneva R , et al. Prognostic value of hyperglycaemia and inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Acute Cardiovascular Care Congress*, 3-5, March, 2018, Milan, Italy

- Cherneva Z, Cherneva R, Valev D, et al. Cardio-pulmonary exercise test indicators of stress left ventricle diastolic dysfunction in non-severe COPD patients. European Respiratory Society Congress, Paris, 15-19 Sept, 2018, P4048.
- Cherneva R, Cherneva Z, Valev D, et al. Right heart structural changes, exercise capacity and stress induced right ventricle diastolic dysfunction in non-severe COPD patients without pulmonary arterial hypertension at rest. European Respiratory Society Congress, Paris, 15-19, Sept, 2018
- Cherneva Z, Gospodinova M, Denchev S, et al. The role of combined stress echocardiography and cardiopulmonary exercise stress in non-severe COPD patients. EuroEcho Congress, 5-7, December, 2018, Milan, Italy.
- Cherneva Z, Gospodinova M, Denchev S, et al. Right atrium volume index and stress induced right ventricle diastolic dysfunction in non-severe COPD patients. EuroEcho Congress 5-7, December, 2018, Milan, Italy.

**Contract 69/2018 Study of the combined administration of escitalopram and a ketogenic diet on indicators of depression and neuroinflammation in experimental models of stress and depression**

**Research team:** Assist. Prof. Evgeni Yuriev Haritov, MD, PhD

- Assoc. Prof. Vesela Raykova, MD, PhD
- Assist. Prof. Natasha Ivanova- BAS

**Organization unit:** Department of Pharmacology and Toxicology, Zdrave 2 str., 1431, Sofia

**RESULTS:** Despite advances in the treatment of depressive disorders, pharmacoresistance has been detected in 30-40% of patients. Studies in recent years have shown that neuroinflammation plays an important role in the pathogenesis of depression. There is a need to look for therapeutic alternatives. Unlike studies in neurology, the effects of the ketogenic diet (KD) on the pathogenesis of depression have not been investigated. The aim of this project is to evaluate the antidepressant and immunomodulatory effects of the antidepressant escitalopram in single or combined administration with a KD in a lipopolysaccharide (LPS)-induced model of depression in Wistar rats. After the single and combined administration of escitalopram and the KD, the experimental animals were, first subjected to several behavioral tests for depression (FST-forced swim test, SPT- sucrose preference test and NSFT- novelty suppressed feeding test), followed by ELISA of brain homogenate to determine the levels of IL-1 $\beta$ . The results of the study showed that in the experimental groups with combined administration of escitalopram and KD, the most pronounced antidepressant effect in behavioral tests (FST, SPT and NSFT) was observed, compared to their single administration. Particular attention is drawn to the ELISA data for statistically significant (\*\*p <0.01) reduction of proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  levels in the hippocampus of experimental animals under the influence of the combined administration of KD and escitalopram as compared to their single administration. The presented results suggest that the KD and antidepressants from SSRI<sup>s</sup> group work synergistically to suppress depressive symptoms, and this is likely to be their joint reducing effects on the levels of CNS-proinflammatory cytokines. The data presented here, relate the psychotropic effects of the KD with its unproved neuromodulatory effects. The aim of future studies is to clarify the relationship between the neurometabolic effects of the KD and its effects on neuroinflammation in depression.



### **Scientific publications and presentations:**

- Haritov E, Kirkov V, Kirkova M et al. Metabolic and neuroprotective mechanisms of ketogenic diet. Neurology and psychiatry. 2019;1:36-52.
- Haritov E, Nacov K., Stanchev K. et al. Additive antidepressant and immunomodulatory effects of the combined administration of escitalopram and ketogenic diet in the LPS-induced neonatal model of depression in rats. Neurology and psychiatry. 2019; 2
- Haritov E, Nacov K, Garalova M et al. Low-carbohydrate diet and affective disorders. Bulgarian Journal of Psychiatry. 2019; 2

### **Contract 70/2018 Regulation of appetite and metabolism in severe obese subjects after bariatric surgery**

**Research team:** Assoc. prof. Teodora Svetoslavova Handjieva-Darlenska, MD, PhD

- Konstantin Grozdev, MD, PhD
- Desimira Mironova, MD
- Kalina Kamenova

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of medicine, Department of pharmacology and toxicology

**RESULTS:** Obesity is a chronic, metabolic disease. Bariatric surgery is currently the gold standard treatment for those with BMI  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> and  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> with associated co-morbidities. The aim of our pilot study was to evaluate the changes in body weight, body tissues and in hormones, regulating appetite and metabolism in morbidly obese patients one month after bariatric surgery. A total of 20 patients (13 men and 9 women) underwent different type of bariatric procedure (Roux-Y-bypass, n=13; sleeve resection, n=2; mini-bypass, n=5) with laparoscopic technique. The following parameters were examined before and one month after bariatric surgery: body weight (kg), fat mass (kg), fat free mass (kg), plasma/ serum levels of leptin, adiponectin, ghrelin, glucagon like peptide-1, peptide YY 3-36. The anthropometric parameters were measured with bio-impedance Tanita BC 420MA. Plasma/ serum levels of hormones were measured with ELISA method (BioVendor, Check republic). The results demonstrated an average body weight reduction of 15 kg and fat mass reduction of 9 kg. No change was detected in fat free tissue. Plasma leptin levels were increased, whereas the blood levels of adiponectin, GLP-1, PYY 3-36 were decreased. No change in plasma ghrelin levels was demonstrated. To conclude, bariatric surgery leads to significant body weight loss at the first month after the operation. This period seems to be very early for detection of changes in appetite and metabolism regulation. It is most likely that the reduction of body weight is due to decreased caloric intake than to changes in satiety/ hunger. Future studies should focus in long-term follow up of the mentioned parameters in the regulation of appetite.

### **Contract 71/2018 Study on the role of genes associated with familial cancer syndromes on the development of multiple primary tumors**

**Research team:** Chief Assist. Prof. Atanaska Velichkova Mitkova, PhD

- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, DSci

- Darina Kachakova-Yordanova, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Silva Giragosyan, PhD student
- Veronika Petkova, PhD student
- Corr. Member of BAS Prof. Chavdar Slavov, MD, DSci
- Assist Prof. Simeon Rangelov, MD, PhD
- Marchela Koleva, MD, PhD
- Miroslava Tzekova-Chernopolska, MD
- Asist. Prof. Ivan Terziev, MD
- Adriana Andreeva, MD

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Molecular Medicine Center, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Over the past decade an increase in the incidence and severity of multiple primary neoplasias has been observed. The main causes for development of multiple primary tumors (MPT) are genetic factors, hormonal factors, lifestyle, environmental factors, infections with oncogenic viruses, etc. The aim of the current study was to clarify the role of genes associated with familial cancer syndromes for the development of MPT. The study included 12 MPT patients, of which 6 women with metachronous/synchronous breast and ovarian tumors; and 6 men who developed primary tumors with different localization: bladder and bile ducts; rectum and pancreas; prostate and colon; prostate and sigma; sigma and stomach; palate, larynx/hypopharynx, and tongue base, respectively. Nine (75%) of patients had a family history of cancer and 50% (6/12) early onset (<50 years). Mutational screening was performed by NGS of a panel of 94 tumor-associated genes related to familial cancers, on a MiSeq platform (Illumina). A total of 82 variants were found after filtering of the raw NGS data, of which 18.3% (15/82) were evaluated as clinically significant according to the data bases and/or the bioinformatic analysis. In the group of selected variants, 53.3% (8/15) had uncertain clinical significance (VUS); 33.3% (5/15) were pathogenic and 13.3% (2/15) likely pathogenic. The largest number of pathogenic variants were detected in *BRCA1* (20%, 3/15), followed by *BRCA2* (6.7%, 1/15) and *CDHI* (6.7%, 1/15), respectively. The two likely pathogenic mutations were found in *MLH1* and *VUS* in the tumor suppressor genes *PMS1*, *GPC3*, *DIS3L2*, *PRF1*, *STK11*, *DICER1*, *RET*, and *MSH6*. Although all detected VUS were assessed as pathogenic with prediction programs, further research is needed to prove their functional effect as well as segregation analyzes with the disease in the respective families. Overall, the genetic cause of MPT was found in 58.3% (7/12) of the patients.

**Scientific publications and presentations:**

- Mitkova A, Dodova R, Koleva M et al. Study on the role of genes associated with familial cancer syndromes on the development of multiple primary tumors in Bulgarian patients.  
ESMO Congress 2019, Translating science into better cancer patient care, Barcelona, Spain - 27 Sep - 01 Oct 2019

**Contract 72/2018 Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in breast cancer patients**

**Research team:** Prof Svetlana Lubomirova Hristova, MD, PhD

- Acad. Prof. Vanio Ivanov Mitev, MD, PhD
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Assist. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Silva Giragodiyana
- Assoc. Prof. Teophil Sedloev, MD, PhD
- Assoc. Prof. Svilen Maslyankov, MD, PhD
- Slavyana Usheva, PhD student
- Mariela Vasileva, MD
- Assist. Prof. Alexandrina Vlahova, MD
- Assist. Prof. Tihomir Dikov, MD
- Prof. Ivanka Dimova, MD, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of General and clinical pathology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Epigenetic mechanisms are essential for the normal development and maintenance of tissue-specific expression models in mammals. Methylation in the promoter regions of the genes changes the level of gene expression. Among the frequently methylated genes in breast cancer are RB1, BRCA1, MLH1, MGMT, CDH1 and others. For this reason, the purpose of this project was to determine the degree of promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in 50 tumor samples from breast cancer patients. All samples were analysed by MS-MLPA using ME002-C1 Tumour suppressor mix 2 for methylation in the promoter regions of the genes *TP73*, *MSH6*, *VHL*, *RARB*, *CASR*, *IL2*, *APC*, *ESR1*, *CDK6*, *CFTR*, *CDKN2A*, *PAX5*, *PTCH1*, *CREM*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX6*, *WT1*, *CD44*, *GSTP1*, *ATM*, *CADM1*, *PAH*, *CHFR*, *BRCA2*, *RB1*, *MLH3*, *THBS3*, *TSC2*, *PYCARD*, *CDH13*, *TP53*, *PMP22*, *BRCA1*, *STK11* and *KLK3*. The results were interpreted using GeneMapper and Coffalyser Net software. Promoter hypermethylation was found in 26% (13/50) of the studied breast tumors samples. It was observed in 10 genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RARB*, *ESR1*, *MGMT*, *CD44*, *GSTP1*, *CADM1* and *PYCARD*. Methylation of these genes has been associated with breast cancer, and can be suggested as a diagnostic and predictive marker. The methylation of these tumor suppressor genes explains the genetic cause and the defects in the cell repair system related to tumorigenesis in some patients who do not have BRCA mutations. The results of the current project have expanded the genetic studies related to changes in major genes associated with the predisposition to breast cancer in the Bulgarian population. The introduction of methyl-specific assay for promoter hypermethylation has increased the potential for genetic analysis to improve the diagnosis, prevention and treatment of the disease.

**Scientific publications and presentations:**

- Dodova R, Mitkova A, Pencheva D et al. Genetic Studies in Hereditary Breast Cancer, Report of the IX Scientific Conference on “Oncology News - Part III. Diagnosis and Treatment of Recurrent and Metastatic Tumors, May 24 - 26, 2019 Sunny Beach, Bulgaria

**Contract 73/2018 Genetic factors and clinical characteristics of vascular complications in Bulgarian patients with type 2 diabetes**

**Research team:** Prof. Radka Petrova Kaneva, PhD

- Darina Kachakova-Jordanova, PhD
- Assist. Olga Beltcheva, PhD
- Reni Tzveova PhD - Ministry of the Environment and Water
- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, DSci
- Radka Argirova, MD, DSci - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Assist Lachezar Lozanov, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Prof. Milena Staneva, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Desislava Gorcheva, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Boyka Kostova-Syalova, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Radoslav Borisov, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Stanislava Ilieva, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Ivayla Zheleva-Kiuchukova, MD -Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Vesela Koleva-Topova, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital
- Tzvetomir Tzvetanov, MD - Acibadem CityClinic Tokuda Hospital

**Organization unit:** Faculty of Medicine, Department of Medical Chemistry and Biochemistry

**RESULTS:** In a pilot study of 80 patients with T2D and 20 healthy controls, 4 polymorphic markers in 3 genes, CDKAL1, PPARG, and KCNQ1, were examined that have previously shown association with diabetes or some of its complications. A thorough study of major micro- and macrovascular complications in patients with T2D and related laboratory parameters was performed. The sample is gender balanced (45 males and 35 females), with an average age of 67 years and an average disease duration of 14 years. Neuropathy (88.75%) was found to be the most common complication, followed by nephropathy (47.50%) and retinopathy (32.50%). Obesity (81.25%) and arterial hypertension (96.25%) are also associated with dyslipidemia (70.00%) and high cholesterol (63.75%), as well as an increased incidence of cardiovascular disease: CHD (37.50%), myocardial infarction (28.75%); stroke (25%); coronary heart disease (18.75%); diabetic macroangiopathy (16.25%), etc. Due to the small sample size no statistically significant association of the studied markers with diabetes in Bulgarian patients was found. Only the markers in the CDKAL1 gene showed a trend for differences between patient groups and controls. The correlation analysis showed the relationship between the rs7756992 polymorphisms in CDKAL1, rs1801282 in PPARG and lipid metabolism due to the correlation with cholesterol and ApoB levels, while the genotypes of rs231362 in KCNQ1 correlate with the laboratory tests of urea and albumin levels. Regression analysis suggests the role of genotype polymorphisms in the CDKAL1 and KCNQ1 genes in obesity; CDKAL1 in nephropathy and coronary heart disease; PPARG P12A in diabetic microangiopathy. Research in an extended cohort of patients and controls is needed to achieve statistically significant results and refine the role of the genes studied for micro and macrovascular complications in T2D.

**Scientific publications and presentations:**

- Lozanov LB. Association Between the Diabetogenic Genotype and the Main Vascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus, *Endocrinologia*, 2018;2:79-85.

**Contract 74/2018** Analytical characterization of medicinal products used in treatment of diseases of gastroenterological tract - proton pump inhibitors in anti-infection combinations

**Research team:** Assoc. Prof. Vanya Nikolova Maslarska, PhD, Dept. of Chemistry

- Assoc. Prof. Lily Peikova, PhD
- Assoc. Prof. Maya Georgieva, PhD
- Assist. Prof. Stanislav Bozhanov, PhD
- Assist. Prof. Stefka Ivanova, PhD
- Mishela Stoimenova - student
- Ketrin Stoimenova - student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

**RESULTS:** In this study analytical tests for identification, purity and assay of the following model drug mixtures containing Metronidazole and Amoxicillin, Tinidazole and Amoxicillin, Amoxicillin, Metronidazole and Omeprazole, Amoxicillin, Metronidazole and Esomeprazole, as well as Amoxicillin, Metronidazole and Lansoprazole were developed based on the results obtained from the analyses. The methods were optimized using validation procedures according the requirements of European Pharmacopoeia 7.0 and ICH criteria. Tests include High Pressure Liquid Chromatography with specific columns (RP analytical column 250x4.6 mm) and are distinguished for their precision, accuracy, high sensitivity and selectivity. HPLC methods elaborated are very useful and applicable for routine analytical practice as well as for the quality control of new registered generic products. HPLC determination provides possibilities for compliance with the contemporary requirements to the control of quality and the knowledge which enforces solutions like preparing of drug profiles for the already widely applied dosage combinations containing beta-lactam antibiotics in combination with nitroimidazole derivatives and proton pump inhibitors.

**Scientific publications and presentations:**

- Diploma Thesis „HPLC method for quantification of drug mixtures Amoxicillin with Tinidazole and Amoxicillin with Metronidazole“, Ketrin Stoimenova - student at Faculty of Pharmacy, Faculty №10539, Student Session –01.12.2018
- Diploma Thesis „Development of HPLC method for the determination of Amoxicillin, Metronidazole, Omeprazole - Individually and in combination“ Mishela Stoimenova - student at Faculty of Pharmacy, Faculty №10538, Student Session – 01.12.2018

**Contract 75/2018 Phenolic compounds from the methanol extract of *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson. – structural characterization and investigations for antioxidant anti- $\alpha$ -amylase, anti- $\alpha$ -glucosidase and antilipase activities.**

**Research team:** Assoc. Prof. Paraskev Todorov Nedialkov, PhD

- Assist. Prof. Zlatina Kokanova-Nedialkova, PhD -
- Yana Ilieva, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

**RESULTS:** Seven phenolic compounds namely coumaroylquinic acid 1, myricetin-3-O glycoside 2, myricetin-3-O-galactoside 3, hypercerastoside A 4, methyl ester of chlorogenic acid 5, hypercerastoside B 6 and hypercerastoside C 7 were isolated from the aerial parts of *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson. Three of them, respectively compounds 4, 6 and 7 were new natural products. The structures of the compounds were determined by means of spectroscopic methods (1D, 2D NMR, UV, IR, HRMS-ESI). The highest DPPH activity possessed compounds 2 (84.32%), 3 (82.70%) and 5 (84.57%), compared to the radical-scavenging activity of Vit C (59.44%) and Trolox (88.33%). All compounds displayed ABTS

activity. The highest activity possessed the glycosides of myricetin respectively compounds 2 (97.23%) and 3 (96.04%). Their radical-scavenging activity were higher than that of Vit C (66.21%) and Trolox (94.16%). The results from the *in vitro* investigations showed that compounds 1 (IC<sub>50</sub> = 17.5 μM), 3 (IC<sub>50</sub> = 20.63 μM) and 6 (IC<sub>50</sub> = 37.13 μM) possessed similar activity to acarbose (Glucobay) a known anti-diabetic drug used to treat diabetes mellitus type 2. Five of the seven isolated compounds, respectively substances 1-3, 5 and 6, exhibited prolipase activity. The highest activity was expressed by the myricetin glycosides, compounds 2 and 3, which stimulated the activity of the enzyme lipase extensively five times when were applied at a concentration of 20 μM. It has been found that substances with antilipase activity could find application in the treatment of cachexia. The isolated compounds 1-7 did not alter enzymatic activity of α-amylase neither inhibited lipid peroxidation. The research of the methanolic extracts of *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson confirmed the scientific hypothesis that the title plant contains phenolic compounds with radical-scavenging and anti-α-glucosidase activity.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Nedialkov PT, Ilieva YE, Kokanova-Nedialkova Z. Two New Phenolic Glycosides from aerial parts from *Hypericum cerastioides*. 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov PT, Ilieva YE. Phenolic compounds with radical-scavenging, anti-α-glucosidase and prolipase activities from the aerial parts of *Hypericum cerastoides* (Spach) N. Robson. 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019

#### **Contract 76/2018      Saponin-mediated enhancement of etoposide cytotoxicity on lymphoma cell line**

**Research team:** Assoc. Prof. Reneta Slavova Gevrenova, PhD

- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Assoc. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Corr. Member of BAS Hristo Najdenski, PhD, DSci - BAS
- Assist. Prof. Maya Zaharieva, PhD - BAS
- Ludmila Dimitrova, PhD student - BAS
- Snezana Laskova, student
- Despoina Balodima, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav str. 1000 Sofia

**RESULTS:** Highly glycosylated saponins Glucuronide Oleanane-type Triterpenoid Carboxylic Acid 3,28-Bidesmosides (GOTCAB) are accumulated in *Gypsophila* L. roots. In the study we aimed at investigating the possible synergistic effects of a set of GOTCABs isolated from *Gypsophila trichotoma* roots and cytostatic etoposide towards the resistant Hodgkin lymphoma cell line HD-MY-Z. Their intrinsic cytotoxicity was tested according to ISO 10993-5/2009. The combination effects with etoposide were evaluated using the mathematical software CompuSyn Inc. The induction of apoptosis and generation of ROS were measured by Cell Death ELISA and ROS kit, respectively. Liquid chromatography-mass spectrometry allowed the identification or tentative assignment of 34 core structures in the root extract. They possess gypsogenin, gypsogenic, quillaic and oleanolic acids as saponins. 15 GOTCAB core structures forming

between 2 and 4 isomers are reported in *G. trichotoma* for the first time, whereas 12 saponins are undescribed in the literature. Tested gypsogenin-based saponins possessed C-28 ester-bonded chain substituted with acetyl, *cis/trans* methoxycinnamoyl, both acetyl and sulphate groups or arginin. No cytotoxic effect was observed up to 20 µg/mL. Etoposide alone exerted IC<sub>50</sub> 149.2 µM. In the presence of saponins B2 and D2 (20 µg/mL), a strong synergism (Fa=0.8, CI=0.2) was observed at etoposide concentrations significantly lower than 149 µM. The combination induced apoptosis witnessed by the significant elevation of the cell-death associated mono- and oligonucleosomes released in the cytoplasm. Moreover, the combination induced the generation of reactive oxygen substances (ROS) implicated in the mediation of apoptosis. Results emphasize the arabinose in the C-3 chain and acetylation pattern of the carbohydrate chain at C-28 of the aglycone as an important structural feature for cytotoxicity enhancing activity. The tumor chemosensitizing effect of GOTCABs could be promising strategy in the use of chemotherapeutics together with plant compounds. Triterpenoid saponins are a valuable tool to improve the efficacy and tolerance of cytostatics.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Gevrenova R, Zaharieva M, Kroumov A, et al. Gypsophila saponins enhance the cytotoxicity of etoposide in Hodgkin lymphoma cells. 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Bansko, Bulgaria, May 29-01 Jun 2019.

#### **Contract 77/2018      Synthesis, structure characterization, antimycobacterial activity and toxicity of new indole derivatives. Investigation of their stability by HPLC method**

**Research team:** Assoc. Prof. Violina Trifonova Stoyanova, PhD

- Assoc. Prof Rumiana Simeonova PhD
- Prof. Georgi Momekov PhD
- Prof. Nikolay Vassilev PhD, BAS
- Assist. Prof Violeta Ruseva, PhD, BAS
- Assoc. Prof Vania Maslarska, PhD
- Assist. Prof Stanislav Bozhanov, PhD
- Assist. Stefka Ivanova, PhD
- Nadezda Yanakieva, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, 2 Dunav Str, Sofia 1000

**RESULTS:** The synthesis and in vitro assessment of the antimycobacterial activity of a series of new indole- and indazole-based aroylhydrazones evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv were reported. The most active compounds **3a** (MIC 0.44 µM) and **3e** (MIC 0.39 µM) demonstrated excellent antimycobacterial activity, very low toxicity against the human embryonic kidney cell line HEK-293T and high selectivity index values. Importantly, the oral administration of compound **3e** at the highest dose of 2000 mg/kg b.w. resulted in no mortalities or evidence of adverse effects, implying that **3e** is nontoxic. The other derivatives with an indole and indazole scaffold also exhibited high antimycobacterial activity similar to isoniazid and ethambutol. Molecular docking performed in the enoyl-ACP-reductase (InhA) aiming at elucidation of the biological activity mechanisms of the investigated compounds shows good docking scores and promising results concerning the interactions with the InhA receptor. Three selected hydrazide-hydrazone derivatives with potent antimycobacterial activities were evaluated

for their stability with the precise and accurate HPLC analytical method in aqueous media of different pH (2.0, 7.0, 9.0 and 12.0). The study describes the development and validation of a simple and reliable HPLC-UV procedure for the determination of the hydrazide-hydrazone derivatives. The most active compound exhibited the highest degree of hydrolysis at pH7 of approximately 48% at 40°C. The 1,2,3-thiadiazole containing hydrazone with excellent antimycobacterial activity, low cytotoxicity, and without toxic effects when administered by oral or intraperitoneal routes to experimental animals was chosen to determine its effects on the liver and kidney functions in female mice. The investigated compound did not affect the urine and serum hematological and biochemical parameters as INH, compared to those of the control mice. The results revealed that 1,2,3-thiadiazole derivative **3e** is suitable for further exploration against tuberculosis.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Angelova, VT, Pencheva T, Vassilev N, et al. New indole and indazole derivatives as potential antimycobacterial agents. *Medicinal Chemistry Research*, 2019, 28(4), 485–497.
- Angelova VT, Simeonova R. Effects of a new 1,2,3-thiadiazole containing hydrazone antimycobacterial agent on serum and liver biochemical parameters in female mice. *Drug Chem Toxicol.* 2019 Sep 9;1-7.
- Yanakieva N, Angelova VT, Pencheva T et al. Synthesis of novel hydrazide-hydrazone derivatives with indole and indazole scaffold as antimycobacterial agents. Presented at: Slovenski kemijski dnevi 2018, 19–21 september, Portorož, Slovenija

#### **Contract 78/2018 In vitro study on the stability and the antioxidant properties of newly synthesized Ga(III) and Pr(III) complexes of bioactive uracils**

**Research team:** Prof. Irena Petkova Kostova, PhD, DSci

- Prof. Trayko Traykov, PhD
- Assist. Prof. Maria Traykova, PhD
- Venceslava Atanasovap PhD student
- Lozan Todorovp PhD student
- Katerina Costanzo, student
- Viktoria-Maria Mladenova, student

**Organization unit:** Faculty of Pharmacy, Dept. of Chemistry, 2 Dunav Str. 1000 Sofia

**RESULTS:** New metal complexes of orotic acid (HOA) and 5-aminoorotic acid (HAOA) were synthesized by reaction of the respective inorganic salts and the ligands. The structures of the complexes were determined by means of elemental analysis, UV, 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. NMR and UV spectra of the ligands and the complexes confirmed the complex formation. The comparative spectral analysis of newly obtained compounds allowed prediction of coordination behavior of the selected ligands, as well as the type of ligand-metal bonds in metal(III) complexes. Comparative evaluation of the antioxidant effects of the ligands, nitrates and the newly synthesized metal(III) complexes was performed. It has been proven that synthesized complexes are stable compounds that exhibit antioxidant properties. The antioxidant



activity of the ligands and complexes are due both to their properties to eliminate free radicals and to inhibit the enzymatic conversion reaction of xanthenes in uric acid with participation of Xanthine Oxidase. The studied compounds react with albumin without dissociation, which allows their transfer into the bloodstream without its components to be exposed to the prooxidant action of the free metal ions. The revealed antioxidant properties of the complexes of 5-aminoorotic acid, their stability in the biological environment and their interaction with serum albumin in the presence of cytotoxicity against cancerous cell lines, are a prerequisite for testing them as anti-cancer agents.

**Scientific publications and presentations:**

- Todorov L, Valcheva-Traykova M, Kostova I. Impact of 5-Aminoorotic Acid and Its Complex with Gallium(III) on the Luminol Dependent Chemiluminescence in Presence of Sodium Hypochlorite. *Am Inst Phys Conf Proc.* 2019;2075(1):170004.
- Todorov L, Kostova I, Traykova M. Lanthanum, Gallium and Their Impact on Oxidative Stress. *Curr Med Chem.* 2019;26(22):4280-95
- Todorov L, Valcheva-Traykova M, Atanasova V, et al. Effect of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex on The Antioxidant Activity of Rat Blood Serum. *Bulg Chem Commun.* 2019;51:200-3.
- Todorov L, Valcheva-Traykova M, Kostova I. Effect of 5-Aminoorotic Acid and Its Complex with Gallium(III) on The Antioxidant Activity of Rat Blood Serum. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, Varna, 7–10 Sept 2018
- Costanzo CRG, Atanasova V, Kostova I. Effects of Pr(III) Complex with 5-Aminoorotic Acid on The Xanthin Oxidase Activity and Free Radicals Accumulation in Rat Blood Serum. 11th Chemistry Conference, Plovdiv, 12-13 Oct 2018
- Atanasova V, Costanzo CRG, Valcheva-Traykova M, et al. Effect of Bovine Serum Albumin on the UV Spectra of 5-Aminoorotic Acid and Its Complex with Pr(III) in K, Na- Phosphate Buffer of pH 7.45. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, Varna, 7–10 Sept 2018

**Contract 79/2018** *In vitro* evaluation of possible neuroprotective activity in a model of 6-hydrodopamine-induced oxidative stress on isolated synaptosomes and on brain blood vessels contractility of alcesefoliside and mauritianine, isolated from the arial *Astragalus monspessulanus* spp. *monspessulanus*

**Research team:** Assoc. prof. Magdalena Spasova Kondeva-Burdina, PhD

- Prof. Iliana Manova, PhD
- Assoc. prof. Petranka Zdraveva, PhD
- Assist. prof. Boris Kadinov, PhD, BAS
- Assist. Prof. Alexander Shkondrov, PhD
- Neli Zdravkova, student
- Edjem Dodumova, student
- Zornitza Pavlova, student
- Stanislav Pramatarov, student
- Rosen Ralchovski, student

**Organization unit:** Department “Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology”, Dunav Str. 2, Sofia 1000

**RESULTS:** Oxidative injury is one of the fundamental mechanisms underlying a number of human disorders, like neurological etc. The brain tissue is especially vulnerable to ROS-mediated injury for the following reasons: high oxygen consumption; neuronal membranes are rich in polyunsaturated fatty acids, which are particularly vulnerable to free radical attack; the brain antioxidant defence system has the lowest capacity. On these grounds, there is an ever growing interest on the antioxidants, preferably from natural sources to be used both to prevent the development of such disorders or to support their conventional treatment. Evaluation of the effects of alcesefoliside and mauritianine, isolated from aerial part of *Astragalus monspessulanus* spp. *monspessulanus*, in a model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress on isolated rat brain synaptosomes and on small blood vessels contractility. Synaptosomes were obtained from rat brain by differential centrifugation, using Percoll gradient. The main measured parameters, which characterized the synaptosomal functional-metabolic status, are: synaptosomal viability (MTT-test) and level of reduced glutathione (GSH). The contractility of the obtained arterial segments from *a.basilaris*, with length 1.8-2 mm, were tested on two-channel myograph (model 410A, JP Trading, Denmark). On isolated synaptosomes, in a model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress, the two flavonoids, revealed statistically significant neuroprotective and antioxidant effects, by preserving synaptosomal viability and GSH level. On brain vessels, administered alone, alcesefoliside decreased the vascular tone, while mauritianine – increased it. The study show that the neuroprotective activity of alcesefoliside and mauritianine against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress might be due to their antioxidant potential. The effect of the flavonoids was commensurable with the effect of silybin, which neuroprotective activity has been explained with its free-radical scavenging potential. Our results suggest a similar neuroprotective mechanism for alcesefoliside and mauritianine. Additional investigations are needed to reveal the possible mechanism of two flavonoids on the contractility of *a. basilaris*.

**Contract 80/2018 Study the impact of modified media on growth index and flavonoid production in *in vitro* cultures of endangered taxon *Gypsophila trichotoma* Wend.**

**Research team:** Assoc. Prof. Petranka Krumova Zdraveva, PhD

- Prof. Iliana Ionkova, PhD, DSci
- Prof. Iliana Manova, PhD
- Assist. Prof. Aleksandar Shkondrov, PhD
- Pavlinka Popova

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav St., 1000 Sofia

**RESULTS:** For the first time, *in vitro* cultures of endangered for the Bulgarian Flora taxon *Gypsophila trichotoma* were established on nutrition media containing mineral supplements. An HPLC method was used to examine the saponarin content of each culture obtained. In this study, we found that the growth index was affected by both sodium chloride and magnesium and calcium ions. The highest yield of biomass was obtained by doubling the amount of CaCl<sub>2</sub>. Significant differences in flavonoid content were observed in the established conventional cultures. The results obtained from this study show that the problem is more complex and probably each of these ingredients contributes to the production of flavonoids in the cells. Although the suspension cultures grown on G48 medium without Mg<sup>2+</sup> accumulated nearly twice as little saponarin compared to MS-cultivated shoots, we suggest them as a promising source of

this rare flavonoid. These findings will serve as a basis for further optimization of *in vitro* culture conditions, incl. the composition of the culture medium in order to obtain highly productive, with respect to pharmaceutically significant flavonoid, cell lines.

**Contract 81/2018    Phytochemical screening with high resolution for rare biologically active compounds in species of genus *Astragalus* L. (Fabaceae)**

**Research team:** prof. Iliana Nikolaeva Manova, PhD

- Assoc. Prof. Petranka Zdraveva, PhD
- Assist. Prof. Aleksandar Shkondrov, PhD
- Yasmina Harlioiva, student
- Nikolai Kanchev, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy

**RESULTS:** A method for the screening of total plant extracts through UPLC-HRESIMS has been developed for the presence of rare compounds: flavoalkaloids, acylated flavonoids, saponins and flavonoids. By applying the method in samples obtained from *Astragalus* species harvested from different localities in Bulgaria, the following were proved: a kaempferol flavoalkaloid in *A. onobrychis* var. *chlorocarpus*, *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus* and *A. glycyphyllos*; a quercetin flavoalkaloid in the above-ground parts of *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus*; acylated with hydroxymethylglutaric acid flavonol glycosides – a quercetin derivative in *A. hamosus* and a kaempferol derivative in *A. hamosus* and *A. depressus*. The rare triglycoside camelliaside A was detected in the aerial parts of *A. onobrychis* var. *chlorocarpus*, *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus* and *A. glycyphyllos*. In addition, the presence of rutin in *A. onobrychis* var. *chlorocarpus*, *A. monspessulanus* ssp. *monspessulanus*, *A. glycyphyllos*, *A. cicer* and *A. ponticus* was revealed. A phytochemical study of herbs from *A. glycyphyllos* was performed. A new compound was isolated from the n-butanol extract by chromatographic techniques. The structure of the substance was determined by acid hydrolysis, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, COSY, NOESY, HSQC, HMBC and HR-MS as 17(*R*),20(*R*)-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -trihydroxycycloranyl-23-carboxylic acid 16-lactone 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside. The isolated saponin is a novel natural compound.

**Contract 82/2018    Pharmacological study of *Nigella sativa* oil on experimentally induced colitis in mice**

**Research team:** Assoc. Prof. Romyana Lyubomirova Simeonova, PhD

- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD
- Assoc. Prof. Niko Benbassat, PhD
- Assoc. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Petar Arnaudov, student
- Yanica Russenova, student
- Violina Toteva, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

**RESULTS:** Ulcerative colitis is a chronic inflammatory bowel disease for the treatment of which corticosteroids and immunomodulatory drugs with serious side effects are used. There is an increasing need for new treatments of this disorder with fewer side effects. The aim of the present study was to evaluate the composition of *Nigella sativa* oil (NSO) and to investigate its anti-inflammatory and antioxidant effects on experimentally induced colitis in mice. High-resolution gas chromatography-mass spectrometry (GC-HRMS) was used for the analysis of the oil. Palmitinic, linoleic, and oleic acids were detected. Colitis was induced by a 5-day oral DSS administration. The levels of MDA, GSH, CAT and SOD activity, as well as the activity of MPO, a marker of inflammation, were measured spectrophotometrically. The effects of NSO were compared with the effects of hydroxytyrosol, a known antioxidant and ulcer protective agent. Induction of colitis results in inflammation and oxidative stress discerned by a reduction in body weight by 33%, presence of blood in the stools, reduced colon weight and length by 47% and 34% respectively, as well as by changes in the markers of oxidative stress and inflammation. Compared to the control animals, a significantly increased MDA level by 42%, increased activity of MPO by 400% and SOD by 30%, as well as a decreased amount of endogenous cell protector and antioxidant GSH by 33 % and the activity of the antioxidant enzyme CAT by 29% were detected in colitis-induced mice. Treatment of mice with NSO results in maintaining body weight, GSH level, and the activity of antioxidant enzymes close to the control values. Treatment of colitis-induced mice with NSO resulted in a statistically significant decrease of MPO activity by 56% and the amount of MDA by 27%. The effects of NSO were comparable to the antioxidant and ulceroprotective effects of hydroxytyrosol.

**Scientific publications and presentations:**

- Simeonova R, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V, et al., Protective Effects Of *Nigella Sativa* Oil On Dextran Sulphate Sodium (Dss) Induced Colitis In Mice. 4th International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2019, May 29 – 01 June 2019, Albena, Bulgaria)

**Contract 83/2018      Development of RP- HPLC method for separation of geometrical isomers of newly synthesized pyrrole and xanthine compounds**

**Research team:** Assoc. prof. Lily Plamenova Peikova, PhD

- Assoc. prof. Maya Georgieva, PhD
- Prof. Alexander Zlatkov, PhD
- Assist. Stanislava Vladimirova, PhD
- Diana Tzankova, PhD student
- Maria Hristova, student
- Elina Petrova, student

**Organization unit:** Dept. of Pharmaceutical chemistry, 2 Dunav str., 1000 Sofia

**RESULTS:** The main purpose of this investigation is development and validation of RP-HPLC method for separation and identification of possible geometrical isomers in the structure of new pyrrole and xanthine based compounds. In order to achieve this goal the synthesized in our laboratory compound 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-purine-7(6H)-yl)-N'-(3-fluorobenzylidene)-propanehydrazide was subjected to analysis. In addition for the tested structure was evaluated the chemical stability and the stability under close to physiological conditions with a developed, validated and applied RP-HPLC method for identification of the

hydrolysis products. The used approach revealed that the tested structure is stable at temperature of 37°C and neutral pH and susceptible to hydrolysis at the same temperature and in strong alkali and strong acidic media, where the products of the hydrolysis are the initial 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purine-7-yl)propanehydrazide и 3-fluorobenzaldehyde. The applied chiral RP-HPLC approach allowed the successful separation of the two optical isomers of the tested 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-purine-7(6H)-yl)-N'-(3-fluorobenzylidene)propanehydrazide. It was determined that the developed and validated chiral RP-HPLC method is suitable for identification of stereo isomers in the structure of heterocyclic compounds containing pyrrole and xanthine fragment along with a hydrazone functional group.

**Scientific publications and presentations:**

- Peikova L, Tzankova D, Dineva A, et. al. Development of chiral RP-HPLC method for identification of stereoisomers of 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-purine-7(6H)-yl)-N'-(3-fluorobenzylidene)propanehydrazide. Pharmacia. 2019; 66(1): 1-5.

**Contract 84/2018 Feasibility study on application of 3D printing by extrusion in pharmaceutical practice**

**Research team:** Prof. Milen Ventsislavov Dimitrov, PhD, MPH-HMP

- Radoslav Angelov, Sopharmacy
- Sofia Ilieva, MPharm, Sopharma AD

**Organization unit:** Dept. of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

**RESULTS:** Literature data for 3D printing of pharmaceutical formulations has been collected and analyzed. Based on the analysis, it was found that currently the most commonly used polymers for application in 3D printing for pharmaceutical purposes are polylactic acid and polyvinyl alcohol. Diabetes mellitus is a socially significant disease involving a large contingent of people, about 600,000,000 people in the world, and about 600,000 in Bulgaria. Glipizide is a drug used in modern pharmacotherapy for treatment of type 2 diabetes, and about 90% of these patients suffer from non-insulin dependent diabetes. Models of conventional tablet, caplet and capsule have been developed using Google Sketchup 17.0. The models were exported to a .stl file (machine readable file) and imported into Simplify 3D software for subsequent 3D printing. The filaments for 3D printing have been prepared by the soaking and hot extrusion method. The major factors influencing the 3D printing process has been studied, such as: In model systems prepared from filaments of PVA was a significant increase in the rate and extent of release, as compared to those based on PLA; In model systems based on PVA, the release proceeds at a relatively lower rate than those based on PLA, but to a greater extent, making them a suitable candidate for further study for the potential preparation of extended-release tablets and desired pharmacokinetic release profile. By increasing the time of soaking the commercial filaments based on PVA into solution of the drug substance is increased and its amount into the matrix. On the other hand, the use of this method does not allow the loading of larger amounts of a drug substance, which is a major drawback of it, and makes the use of the hot extrusion method promising for preparation of 3D printing filaments for oral, extended release drug delivery systems.

**Scientific publications and presentations:**

- Ilieva S, Dimitrov M. Advantages and challenges of 3D printing through extrusion. First International Paediatric Scientific Practical Conference „Together for children of Bulgaria“, Varna, Bulgaria, 14-16.03.2019
- Ilieva S, Iliev M, Dimitrov M. Impact of molecular weight of polyvinyl alcohol on the quality of filaments for three-dimensional (3D) printing. Eight International Conference „Modern Trends in Science “- FMNS-2019, Blagoevgrad, Bulgaria, 26-30.06.2019
- Iliev M, Dimitrov M, Dimitrov T. Preparation and optimization of polymer compositions, with the addition of fillers for extrusion of filaments, potentially applicable in 3D printing of custom drug forms for medicine and pharmacy. 9<sup>th</sup> International Conference on application of Information and communication Technology and statistics in economy and education (ICAICTSEE-2019), Sofia, Bulgaria, October 24-26<sup>th</sup> , 2019

**Contract 85/2018    Biosynthesis of tropolone alkaloids in in vitro cultures of *Gloriosa superba* L. (Colchicaceae)**

**Research team:** prof. DSci. Iliana Ilieva Ionkova

- Doz. Petranka Zdraveva, Ph.D
- Pavlinka Popova
- Vilma Posheva

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacognosy

**RESULTS:** The application of *Gloriosa superba* in traditional medicine is closely related to the major secondary metabolites for the species - tropolone alkaloids. In the course of this study a comparative analysis of the major alkaloids present in the in vitro cultures of *G. superba* and native tubers was carried out. For this purpose, the resulting in vitro extracts of the initiated in vitro crops: overhead parts, tubers, roots, callus and suspension cultures and native tubers were subjected to a non-target fractionation on an MCI gel. The chemical profile of the resulting fractions was determined by UPLC-HRESI-MS. By comparing the results obtained with a database (Metlin) and literature sources, 16 metabolites were identified. Among them are characterized aglycons derived from colchicine: demecolcin; 2,3-dide-methylcolchicine; 2-demethylcolchicine; 3-demethylcolchicine; colchicine; gloriosine; 2-demethylcolchicillin; 3-methylcolchicine acid; cornigerine; colchinol; N-acetyl-methyl ether; alkaloid A-283; 2-demethylcolchicein and colchiceine. Monoglycosylated derivatives: colchicoside and dongduongoside A have also been identified. These are only identified in cultures with a higher degree of cell differentiation - in vitro aerial parts, as well as in vitro and native tubers. The major metabolite for colchicine is also identified in differentiated in vitro roots by *G. superba*. The study shows the importance of in vitro cultures from *G. superba* as a potential alternative source for the production of colchicine analogs with a valuable chemical structure.

**Scientific publications and presentations:**

- Ionkova I, Popova P, Zarev J, et al. Biosynthesis of tropolone-type alkaloids in in vitro cultures of *Gloriosa superba* L. (Colchicaceae), Natural Product Communications, 2019;9(1-2)

**Contract 87/2018      Significance of salivary parameters – high sensitive C-reactive protein, creatine kinase MB-mass, troponin I for the diagnosis of acute myocardial infarction in patients with chronic periodontitis**

**Research team:** Assoc. Prof. Theodora Nikolaeva Bolyarova-Konova, DDM, PhD

- Prof. Dr. Diana Trendafilova-Lazarova, MD, PhD
- Prof. Dr. Margaritka Boncheva, MD, PhD
- Dr. Manuela Sandova, MD
- Ralitsa Skrobanska, PhD student
- Krusto Ivanov, student
- Krum Bodlyov, student
- Maryam Moghanlo, student
- Natali Toneva, student

**Organization unit:** Department of Periodontology; 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia.

**RESULTS:** The aim was to investigate the change in the concentrations of highly sensitive C-reactive protein (hsCRP), creatine kinase-myocardial band (CK-MB-mass), hs troponin I (hsTnI) in serum and saliva in patients with acute myocardial infarction (AMI) and chronic periodontitis regarding their identification as biomarkers for AMI in saliva. 48 patients were involved in the study (34 male, 14 female), of mean age  $60.43 \pm 13.606$  and admitted for treatment at "St. Catherine" hospital. All patients were undergone cardiac and periodontal examinations; saliva collection; immunological determination of hsCRP; CK-MB-mass; hsTnI in serum and saliva; blood tests. They were divided into two groups: Group I – 28 patients with acute myocardial infarction (AMI); Group II – 20 patients without coronary heart disease (CHD). When comparing serum and salivary levels of hsCRP, CK-MB mass, hsTnI in patients from both groups, no significant correlations were established. The studied biochemical parameters were significantly increased in serum in AMI patients in comparison with patients without CHD, but for saliva concentrations there was only tendency for increasing in AMI patients. Due to the fact that the concentrations of hsCRP, CK-MB mass, hsTnI in saliva are not affected by factors of age, sex, smoking and periodontitis parameters in patients in both groups, we consider them highly specific for AMI. In patients with AMI, a significant correlation was found between the periodontal pocket depth and the level of triglycerides in blood; inverse correlation between bleeding on probing and high-density lipoprotein. In patients without CHD a significant correlation was found between clinical attachment level and triglycerides level. The dependence of dyslipidemia components on the severity of periodontitis has been confirmed. The current study provides guidance for the use of saliva for faster diagnosis in ambulatory practice, which could be to the benefit of general practitioners for establishing AMI diagnosis.

**Scientific publications and presentations:**

- Bolyarova-Konova T, Boncheva M, Sandova M, et al. Comparative Investigation of Biomarkers for Acute Myocardial Infarction in Biological Fluids Serum and Saliva. General medicine 2020;(1)
- Bolyarova T. Significance of biomarkers in saliva for diagnosis of acute myocardial infarction. General medicine, 2018; XX(3):64-70.

**Contract 88/2018      Changes of root canal dentin at high intensive laser treatment (in vitro study)**

**Research team:** Prof. Tsonko Todorov Uzunov, DMD, PhD

- Assoc Prof. Elka Radeva, PhD
- Raya Grozdanova-Uzunova, PhD
- Evgeniya Popova, DMD
- Dimitar Kosturkov, DMD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim is to investigate the penetration of laser light, temperature and ultrastructural changes that occur in the root canal dentine at high intensive laser treatment 810 nm with two types of light guides – fiber optics and fiber optics modified with organic components. The study is performed on extracted human teeth (n=48) with curving of 10° to 25°, which is determined by three digital methods. The investigated new digital method (Screen Protractor) for determining of root canal curvature on extracted teeth showed very precise results. After standardized preparation of the root canals the teeth are divided into two groups: 1 group – optic fiber, 1 W - 18 teeth; 2 group - fiber optics modified with organic components, 1 W – 18 teeth. Control group – 12 teeth, prepared only with ProTaper Gold, without laser treatment. One of the surfaces on 12 teeth has been reduced so the measurement of light distribution can be done. A diode laser - Denlase 810 nm and maximal power 7W has been used. The chosen protocol “Pulpotomy” characterizes with average power used 2W and impulse regimen of 1 ms radiation and pause. The light going out of the laser optic fiber spreads mainly in the canal. The maximal measured intensity is 2-3 mm away from the tip and decreases slowly and in curved teeth even faster. A contactless measurement of the root surface temperature before and after laser treatment is done with infrared camera Flir T 330 with exactness of 0.01°C. According to the recorded measurements in 90% of the cases the temperature rise on the outer root surface is up to 8° C. After the laser treatment of the root canal a partial melting of the dentine wall and tight blockage of the dentine tubules are observed on the scanning electron microscopy. The melted material doesn't form uniform layer and contains obvious signs of recrystallization – granulated character, angular formations and grouping in granulated aggregates. The apical part of the root canal has entirely melted dentine surface with tight blockage of the dentine tubules.

**Scientific publications and presentations:**

- Kosturkov D, Radeva E, Uzunov Ts. Digital in vitro study of curved root canals. 19<sup>th</sup> Scientific Congress of BDA, 6-8 June 2019, Burgas-Pomorie

**Contract 89/2018      Influence of Intracanal Medicaments on Endodontic Biofilm (in vitro study)**

**Research team:** Assoc. Prof. Elka Nikolaeva Radeva, PhD

- Assist. Prof. Desislava -Tosheva
- Assist. Prof. Elena Shopova, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Dental medicine, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of this in-vitro study is to investigate the impact of intra-canal medications on microorganisms isolated from teeth with persistent endodontic infection. Five reference microorganisms strains E.faecalis ATCC 29212, S.mutans ATCC 25175, C. albicans ATCC



90028, *F. nucleatum* ATCC 25586, *P. gingivalis* ATCC 33277 were used in the present study. Four intracanal medicaments ( $\text{Ca(OH)}_2$ +Chlorhexidine,  $\text{Ca(OH)}_2$ +nanoparticles,  $\text{Ca(OH)}_2$  and  $\text{Ca(OH)}_2$ +Iodoform), were selected and their antimicrobial effects were tested on the microorganisms separately as well as on a mixed bacterial suspension. Microbiological methods were applied: agar-diffusion method and culture method of investigation of the antibacterial activity of the used drugs, counting of colony forming units of microorganisms in aerobic and anaerobic environment; and Scanning electron microscopy to visualize the bacterial growth of *in vitro* endodontic biofilm and the extent of removal by using sonic irrigation. The adhesion and growth potential of the strains studied on the root dentin surface have been proven. After treatment of the endodontic biofilm from a mixed bacterial culture, control of bacterial growth with aerobic and anaerobic cultures as well as CEM was performed. Bacterial growth and bacterial biofilm have been proven despite the use of medication. Aerobic cultures showed growth of *E. faecalis*, *S. mutans*, *C. albicans* at  $10^3$ - $10^4$  ml. Anaerobic cultures showed growth in the amount of  $10^5$  anaerobic species of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* and aerobic *S. mutans*, *E. faecalis*.  $10^3$  ml of growth of *C. albicans* was recorded. The strongest impact on the five microbial strains treated showed  $\text{Ca(OH)}_2$  + Chlorhexidine - with the strongest effect on *C. albicans*, followed by *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, and finally *F. nucleatum*. Secondly, the impact of  $\text{Ca(OH)}_2$  + nanoparticles - *C. albicans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *S. mutans* and lastly *E. faecalis*.  $\text{Ca(OH)}_2$  has the most significant effect on *C. albicans* and *P. gingivalis*.  $\text{Ca(OH)}_2$  + Iodoform has the most significant effect on *C. albicans*.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Radeva E, Shopova E, Tsanova D, et al. Antimicrobial effect of intracanal drugs in endodontic infection (*in vitro* study). *Problems of Dental Medicine*, 2019
- Radeva E, E. Shopova, D. Tsanova. Antimicrobial activity of Calcium Hydroxide alone and in combination with Silver Nanoparticles. 19<sup>th</sup> Scientific Congress of BgDA, 6-8 June, Burgas-Pomorie,

#### **Contract 93/2018 Biomimetic remineralization in experimental model of enamel caries**

**Research team:** Prof. Radosveta Ivanova Vassileva, DDM, PhD

- Assist. Prof. Alexander Bonchev

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine

**RESULTS:** The aim of the present study is to evaluate the remineralization potential of hybrid gel nanoparticles with *in situ* formed calcium phosphates in artificial caries lesions. A scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and laser fluorescence were used to investigate the demineralization and remineralization of enamel lesions. Based on the results we obtained from the research, it was found that remineralization with fluoride gel resulted in the formation of a thick mineral layer on the central part of the enamel prisms, whereas the use of artificial saliva found that there was no remineralization but only a loss of the outline borders of the prisms. The results confirm the remineralization ability of the fluorides but we did not establish oriented and ordered crystallization. The use of the PDMAEMA / Carbomer / Calcium Phosphate system provides encouraging results as a potential biomimetic remineralizing agent. From SEM it is seen the tendency of formation of nanometric crystallites, which repeats the arrangement of nanoapatite crystals in the enamel prism. The data obtained from infrared spectroscopy it is possible formation of octacalcium phosphate on the surface and it is an

intermediate phase, a precursor in the formation of hydroxylapatite. The use of the PSB / calcium phosphate system leads to the formation of an accelerated, mineralized layer with a grainy texture on the enamel surface. In the limitations of this in vitro study we found that newly synthesized products have the potential to remineralize tooth enamel, but we do not observe oriented crystallization. The specific mechanisms that lead to remineralization have not been established. Well-designed RCTs are vital to clarify whether these new-age remineralizing approaches provide any additional benefit over traditional remineralization.

**Scientific publications and presentations:**

- Bonchev A, Simeonov M, Vassileva R. Review: Biomimetic Approach for Remineralization of Human Enamel. Int J Sci Res. 2018;7(10):1416-20.
- Bonchev A, Simeonov M, Vassileva R. Non-fluoride agents for enamel remineralization. Int J Sci Res. 2019; 8(4):1765-8.
- Bonchev A, Vasileva R, Simeonov M. Change of enamel microhardness after demineralization and remineralization with hybrid gel microparticles (in vitro study). 19<sup>th</sup> Scientific congress, Pomorie, 6-8 June, 2019.

**Contract 109/2018 Identification of genetic mutations causing retinal degeneration in Bulgarian patients using next-generation sequencing of target genes**

**Research team:** Prof. Sylvia Zdravkova Cherninkova, MD, PhD, DSci

- Prof. Ivailo Tournev, MD, PhD, DSci
- Kunka Nikolova Kamenarova, PhD
- Kalina Mihova
- Darina Kachakova-Yordanova, PhD
- Ivan Popov, PhD
- Radosveta Bozhilova - PhD student
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Neurology, 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Retinal dystrophies (RDs) are a group of conditions that have a range of clinical manifestations which are estimated to affect as many as 1 in 4,000 individuals. Cases may be syndromic or non-syndromic, familial with autosomal-recessive (ar), autosomal-dominant (ad) and X-linked modes of inheritance described, or sporadic. Due to the high genetic heterogeneity underlying these disorders, prioritisation in examining the >250 genes known to be associated with the inherited RDs (IRDs) is challenging. Advances in genomic analysis technologies, including next-generation sequencing (NGS), allow the prospect of genome-wide approaches to be feasible for the first time in a diagnostic setting. Among the Bulgarian population, the frequency rates of IRDs and their causative genes are underreported. Our purpose was to identify causative mutations and characterize the phenotype associated with the genotype in five unrelated Bulgarian families affected by different non-syndromic IRDs and to increase the knowledge about these dystrophies in our population. For the purpose of this study we chose five pedigrees from Bulgarian, Turkish and Gypsy origin. In this cohort were included 2 pedigrees with Stargardt disease (STGD), 2 pedigrees with non-syndromic retinitis pigmentosa (arRP) and one family with macular aplasia (arMA). Clinical exomes of probands from the five pedigrees were sequenced and prioritization of possibly pathogenic changes was performed after

applying filtering criteria. Segregation analysis was performed by dideoxy sequencing. Genetic analysis identified two known mutations in *ABCA4* (a homozygous frameshift deletion c.5917delG, p.Val1973Terfs, leading to a premature stop codon, was identified in the two pedigrees with STGD, and a heterozygous missense mutation *ABCA4*-c.4771C>T, p.Gly1591Arg) segregating with autosomal-dominant macular dystrophy in the other studied family); compound heterozygous mutations in *RPE65* (c.1338+1G>A, p.? and c.272G>A, p.Arg91Gln, were found in the proband with arRP); homozygous missense mutation in *PDE6C* (c.2141T>A, p.Ile714Asn, identified in the arMA patient).

### **Contract 115/2018 Investigation of Analysis of propmotor hypermethylation of tumor suppressor genes of ovarian carcinoma**

**Research team:** Assoc. Prof. Roumen Georgiev Dimitrov, MD, PhD

- Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD
- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Chief. Assis Atanaska Mitkova, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Silva Giraosian, PhD student
- Assis. Alan Nachev, MD
- Assoc. Prof. Vesela Todorova, MD, PhD
- Assis. Sashka Rajcheva, MD
- Assoc. Prof. Ivanka Dimova, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Obstetrics and Gynecology, Zdrave 2 Str, Sofia 1431

**RESULTS:** Epigenetic mechanisms are essential for the normal development and maintenance of tissue-specific expression models in mammals. Methylation in the promoter regions of the genes changes the level of gene expression. Among the genes that are methylated in ovarian cancer are *RB1*, *BRCA1*, *MLH1*, *MGMD*, *CDH1* and others. For this reason, the purpose of this project was to determine the degree of hypermethylation in tumor promoter regions of suppressor genes in 50 tumor samples from ovarian cancer. All samples were analysed by MS-MLPA using ME002-C1 Tumour suppressor mix 2 for methylation in the promoter regions of the genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RB1*, *MGMT*, *THBS1*, *CADM1*, *STK11*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARB*, *CD44* and *RB1*. The results were interpreted using GeneMapper and Coffalyser Net. In our study group of tumours the highest rate of methylation was found in the serous carcinomas (40%, 8/20), followed by mucinous ones (30%, 6/20). Promoter methylation was observed in 8 genes: *BRCA1*, *CDH13*, *RARB*, *ESR1*, *PAX6*, *WT1*, *GSTP1* and *MGMT*. The highest frequency of methylation was found in *CDH13* gene in 26% (13/50) of the tumours, followed by the *BRCA1* gene, in 10% of the tumours (5/50) and *ESR1* gene, in 8% of the tumours (4/50). Methylation of these genes has been associated with ovarian cancer, and can be suggested as a diagnostic and predictive marker. The study of the methylation of these genes explains the genetic cause and the defects in the cell repair system related to tumorigenesis in some patients who do not have BRCA mutations. The results of the current project have expanded genetic studies related to changes in major genes associated with the predisposition to ovarian cancer in the Bulgarian population. The introduction of methyl-specific assay for

promoter hypermethylation has increased the potential for genetic analysis to improve the diagnosis, prevention and treatment of the disease.

**Scientific publications and presentations:**

- Dodova R, Mitkova A, Pencheva D et. al. Genetic Studies in Hereditary Breast and Ovarian Cancer, Report of the IX Scientific Conference on “Oncology News - Part III. Diagnosis and Treatment of Recurrent and Metastatic Tumors, May 24 - 26, 2019 Sunny Beach, Bulgaria

**Contract 55/2019 Comparative study of the effects of cyproheptadine, asenapine, propranolol and diazepam on serotonin toxicity in rats****Research team:** Assoc. Prof. Rumen Nikolov, MD, PhD

- Assist. Prof. Georgi Bogdanov, PhD
- Assist. Prof. Milen Hristov, MD, PhD
- Assist. Prof. Kalina Koleva, MD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology

**RESULTS:** Serotonin syndrome is a life-threatening condition associated with increased serotonergic activity at central and peripheral serotonergic synapses. It may be observed with an overdose of serotonergic drugs or with the combined administration of two or more substances that increase serotonin levels (5-hydroxytryptamine, 5-HT). The aim of our research investigation is to comparative study the efficacy of cyproheptadine, asenapine, propranolol, and diazepam on a model of serotonin toxicity in rats induced by the combined administration of fluoxetine (a selective serotonin reuptake inhibitor) and tranylcypromine (non-selective MAO inhibitor). In the experiments performed, specific symptoms characteristic of the development of serotonin syndrome in rats were observed, some of which were low body posture, the phenomenon of Straub, tremor, head shaking, piloerection and hyperthermia. All test substances (cyproheptadine, propranolol, asenapine and diazepam) prevented signs of serotonin syndrome in experimental animals. A difference was observed with respect to the hyperthermic response associated with serotonin syndrome. Cyproheptadine and propranolol suppress the development of a hyperthermic reaction. Diazepam reduces the hyperthermic response, with the greatest reduction in hyperthermia reported 60 and 90 min after the injection of serotonergic substances. Asenapine suppresses the development of a hyperthermic reaction and even causes hypothermia. In the present study, rats with serotonin syndrome had symptoms similar to those in humans in the same condition. The similarity in the expression of the syndrome in rats and humans may serve as a basis for further elucidating the mechanism of development and course of serotonin syndrome in humans.

**Scientific publications and presentations:**

- Koleva K., Nikolov, R. Behavioral, somatic and autonomic signs in an experimental model of serotonin syndrome. *Meditzinski pregled*. 2020; 56 (3)
- Vlahova M., Tzonev A., Koleva K, Hristov M., Bogdanov G., Nikolov R. Serotonin syndrome in rats. International Congress of Medical Sciences, 24-27 September 2020, Sofia
- Koleva K, Hristov M., Bogdanov G., Nikolov R. Effect of asenapine in rat serotonin syndrome. The 36 Balkan Medical week, 24-26 September 2020, Bucharest, Romania

**Contract 56/2019 Involvement of endothelial factors in the regulation of blood pressure in hypertension**

**Research team:** Yury Penkov Nyagolov

- Assist. Prof. Miroslava Varadinova, MD, PhD
- Petya Pavlova Markova, PhD
- Lasar Georgiev Mitrov - student

**Organization unit:** Dept. of Physiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the present study was to investigate the role of the interaction between endothelin B (ETB) receptors and the NO system in the regulation of blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive SHR rats. The experiments were carried out on male 12-14 week old, non-anesthetized normotensive Wistar rats and spontaneously hypertensive SHR rats, divided into 4 experimental groups, respectively: control groups - normotensive Wistar rats, (W, n = 8) and spontaneously hypertensive rats (SHR, n = 8); experimental groups with selectively blocked endothelin B receptors by intravenous infusion of BQ788 at a dose of 1 mg.kg-1.h: W + BQ788, (n = 8) and SHR + BQ788, (n = 8). Fast fluctuations in blood pressure and heart rate, spontaneous baroreflex sensitivity, and sympathetic-vagal balance were examined by spectral analysis of the blood pressure wave. The activity of endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) isoforms of nitric oxide synthase (NOS) was studied in tissue homogenates of the heart and aorta. We found decreased spectral power of humorally mediated, low-frequency oscillations, and of sympathetically mediated, mid-frequency oscillations of cardiovascular variables in spontaneously hypertensive rats. Our results showed altered sympathetic-vagal balance, as well as differences in the activity of the studied isoforms eNOS and nNOS in SHR tissues homogenate. We believe that nitric oxide synthase activity in SHR has a modulating effect on fast fluctuations in blood pressure and heart rate in SHR. We found that endothelins, through ETB receptors, are involved in generating rapid fluctuations in blood pressure in the SHR. The results obtained in our study give us reason to assume that the effects of endothelins through ETB receptors are mediated by the neuronal nitric oxide synthase present in the vascular system.

**Contract 58/2019    Molecular-genetic characteristics of the disorder Tuberous sclerosis complex (TSC) in Bulgaria**

**Research team:** Assist. Prof. Bilyana Georgieva Georgieva, PhD

- Prof. Albena Todorova-Georgieva, PhD, Dsc
- Assist. Prof. Ani Miteva
- Tihomir Todorov, PhD

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Aim of the current work was to reveal the molecular-genetic characteristics of the autosomal dominant systematic disorder Tuberous Sclerosis Complex (TSC1 MIM#191100 and TSC2 MIM#191092) in Bulgaria. We summarized data of 42 patients/families with probable clinical diagnosis TSC- 24 tested in the current project and 18 previously tested. For *TSC1* and *TSC2* analysis we used PCR, direct sequencing and MLPA. In 38 families (90.5%) we confirmed the probable clinical diagnosis- 15 with TSC1 (35.7%) and 23 (54.8%) with TSC2. In 4 families (9.5%) a mutation was not found. In the 15 TSC1 families we found 15 different *TSC1* gene mutations, 4 (27%) of which are unpublished. Mutation “hotspot“ are exons 15 (contains 33% of the mutations) and 9, 17, 18, where 40% of the mutations were found. In the 23 TSC2 families we found 23 different *TSC2* gene mutations, 11 (48%) of which are unpublished. Mutation

“hotspot“ are exons 13 and 34, where fall 22% of the mutations. In the TSC2 patients more often were found subcortical tubers, generalized tonic-clonic epilepsy, subependymal giant cell astrocytoma, facial angiofibromas, ungual fibromas, cardiac rhabdomyomas and renal angiomyolipomas, while in the TSC1 patients more often were found cortical tubers, cortical dysplasia and subependymal nodules. In patients with frameshift and nonsense *TSC1* and *TSC2* gene mutations more often were found hypomelanotic macules, cortical and subcortical tubers, cortical dysplasia, epilepsy and seizures of different types including generalized tonic-clonic epilepsy. Renal angiomyolipomas and cysts were found mainly in patients with large deletions. Shagreen patches and intellectual disability were found in equal degree in patients with frameshift, nonsense and missense mutations. Our diagnostic algorithm gives opportunity for proper molecular-genetic diagnostics, adequate genetic counseling, prophylaxis and treatment of the disorder in the affected families.

**Scientific publications and presentations:**

- Georgieva B, Koleva M, Todorov T et al. Molecular-genetic characteristics and genotype-phenotype correlations in Bulgarian patients with tuberous sclerosis complex. Acta medica Bulgarica 2020;48(2).

**Contract 59/2019 Investigation of germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes, as risk factors for PCa development and association with aggressive clinical behavior**

**Research team:** Prof. Albena Todorova, PhD

- Anita Kavrakova, PhD
- Bilyana Georgieva, PhD
- Ani Miteva, PhD
- Yanka Kostdinova Dangulova

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Sofia 1431, Zdrave 2 Str., Sofia, 1431

**RESULTS:** The aim was to investigate the role of germline mutations in *BRCA1/2* genes as potential risk factors for PCa development, as well as their association with more aggressive clinical behavior. We report data on the molecular germline profile of *BRCA1* and *BRCA2* genes and the length of AR (CAG)<sub>n</sub> in 10 Bulgarian PCa patients. DNA extraction, PCR, fragment analysis and direct sequencing were the applied analytical methods. Germline genetic variants in the *BRCA1/2* genes were not found. In addition, AR (CAG)<sub>n</sub> = 22 profile was detected in 30% of the PCa patients studied, which was associated with inborn predisposition to PCa. We found 3' VDR Poly A “long alleles” (18-24 / 25) in the same patients, which is also associated with an increased risk of PCa development and even with more aggressive clinical features. Significant AR and VDR alleles in the profile of the patients tested coincide with the presence of unfavorable clinico-pathological characteristics. Re-analysis of *BRCA1/2* genes in the same and larger sample collection of PCa patients by NGS technology may lead to the detection of mutant variants, including those with a mosaic nature. For more accurate estimation of the germline genetic profile of PCa patients, it is necessary to expand the target panel of genes. AR (CAG)<sub>n</sub> and VDR Poly-A 3' UTR microsatellite markers play an independent role, as genetic risk factors for the onset and clinical development of PCa. Complex analysis of a panel of molecular markers involved in the onset and development of PCa and a detailed clinico-pathological information will contribute to better diagnostics and treatment of affected patients.

**Contract 61/2019    Pharmacological study of the effects of nociceptin analogue in an experimental model of neuroinflammation**

**Research team:** Assoc. Prof. Miroslava Georgieva Varadinova, MD, PhD

- Petya Markova, PhD
- Lazar Gergiev Mitrov, student

**Organization unit:** Department of Pharmacology and Toxicology, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** An experimental model of neuroinflammation was applied to male rats in two variants - a single or repeated for 5 consecutive days application of LPS (1 mg/kg, i.p.). The effects of a single and repeated administration of the newly synthesized nociceptin analogue on body weight and appetite, learning and memory parameters (latency and number of shuttle-box test errors), proinflammatory cytokine values (serum and hippocampal levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ ) and the concentration of neurotrophic factors BDNF, GDNF, VEGF in serum and hippocampus in experimental animals were studied. Following LPS administration, the animals in the model groups showed decreased thirst and appetite, as well as a corresponding decrease in body weight compared to the control group. Rats treated with the nociceptin analogue showed increased appetite and significantly higher average body weight compared to control animals. In the shuttle-box test at the beginning of the training sessions, the rats with experimental neuroinflammation demonstrated impaired training and memory parameters compared to the control rats. The single administration of a newly synthesized nociceptin analogue significantly reduced the number of errors made in the shuttle-box sessions. The proinflammatory parameters studied in the animals treated with the nociceptin analogue were comparable to the controls. Administration of the nociceptin analogue to LPS model animals significantly decreased the serum and hippocampal levels of some of the cytokines tested. The single administration of the newly synthesized nociceptin analogue decreased the proinflammatory cytokine levels more markedly than its repeated administration. Decreased serum BDNF and GDNF levels were recorded in LPS model animals. The single administration of the nociceptin analogue significantly increased the levels of neurotrophic factors in serum and hippocampus of the control animals. In addition, the values of the investigated neurotrophic factors in the LPS model rats receiving the nociceptin analogue were comparable to those of the control animals. In conclusion, the present results indicate that the newly synthesized nociceptin analogue has beneficial effects on the levels of proinflammatory and neurotrophic factors studied in inflammatory models and may contribute to the treatment of neurological and neuropsychiatric conditions, associated with neuroinflammation.

**Scientific publications and presentations:**

- Stefanova J, Markova P, Kamenova K, et al. Effects of a nociceptin analogue on proinflammatory parameters in a LPS-induced model of inflammation. Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 24-27 Sept, 2020.
- Stefanova J, Kamenova K, Markova P, et al. Treatment with a nociceptin analogue after a LPS challenge in rats: neurotrophic aspects. Int Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 24-27 Sept, 2020.



**Contract 62/2019      Role of arylhydrocarbon receptors on the neurobiological activity of novel indole derivatives with the arylhydrazone moiety**

**Research team:** Assoc. Prof. Pavina Angelova Gateva, MD, PhD

- Prof. Slavina Surcheva, MD, PhD
- Prof. Jana Tcheckalarova, PhD, BAS
- Assoc. Prof. Radka Tafradjiiska, MD, PhD
- Assoc. Prof. Lubomir Traikov, PhD
- Assoc. Prof. Violina Stoyanova, PhD
- assist. Zafer Ahmed Sabit
- Kalina Kamenova, PhD
- Boris Petrov, student

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology and Toxicology, 2 Zdrave str., Sofia 1431

**RESULTS:** The aim of the project was to synthesize and screen new indole derivatives with aroylhydrazone moiety having neurobiological activity, and to study the role of arylhydrocarbon receptors (AhR) for their activity. In this regard: 1. We screened, based on literature and bioinformation sources, indole derivatives with an aroylhydrazone moiety. 2. We selected substances for a more detailed study under this project, namely: melatonin and two newly synthesized melatonin derivatives with an aroylhydrazone moiety. The fourth substance selected by us, alfa-naftoflavone, is not an indole derivative, but it was selected in view of its well-known antagonistic effects on AhR, in order to confirm or reject our main hypothesis for the possible involvement of AhR in mechanisms of action. 3. We performed a rot-rod test (screening for neurological or muscle toxicity). 4. We conducted a corneal kindling test (anti-epileptic activity test). 5. We conducted a screening for analgesic activity. 6. We determined the levels of AhR and kynurenine in brain homogenates. The test substances (melatonin, ANF, 3e and 3f) showed a lack of neurological and muscular toxicity with the rotarode test. For substances 3e and 3f, we found antiepileptic activity comparable to that of melatonin when administered the kindling test and some analgesic activity, albeit weaker, than that of melatonin in equivalent doses. Although melatonin and substance 3f showed dose-dependent increases in AhR and kynurenine levels in brain homogenates, our results do not support our initial hypothesis for AhR involvement in the analgesic or anti-epileptic mechanisms of test substances. Further studies are needed to elucidate the effects of AhR and kynurenine in the neuropharmacological activity of the indole derivatives, with or without the arylhydrazone moiety.

**Scientific publications and presentations:**

- Andreeva-Gateva P, Bakalov D, Sabit Z, et al. Aryl hydrocarbon receptors as potential therapeutic targets. *Pharmacia* 2020;67(4):311-5.
- Andreeva-Gateva P, Tcheckalarova J, Kamenova K, et al. Aryl hydrocarbon receptors in indole derivative treated mice; neuropharmacological perspectives. *Acta Medica Bulgarica* 2021;48(1)

**Contract 63/2019      Microbiological and molecular genetic studies on biofilm formation by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia***

**Research team:** Prof. Tanya Vasileva Strateva, MD, PhD

- Corr. Member of BAS Prof. Ivan Mitov, MD, DSci
- Assist. Prof. Ivo Sirakov, VMD, PhD

- Angelina Trifonova, PhD – MMA

**Organization unit:** Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the present study was to examine the main phenotypic and genotypic characteristics of the biofilm formation by nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* isolates (n=168) through both assessment of attached growth on polystyrene surface and detection/sequencing of the biofilm-associated genes (BAG), as well as to evaluate the correlation between biofilm production and the corresponding gene patterns. In 40 selected isolates from the collection, biofilm growth was estimated on 96-well plates by the crystal violet method. BAG, *spgM* (encoding a bifunctional enzyme with phosphoglucomutase and phosphomanomutase activity), *rmlA* (glucose-1-phosphate thymidyltransferase) and *rpfF* (DSF synthase), were detected by polymerase chain reaction. Eight strains of *S. maltophilia* were subjected to whole genome sequencing (WGS) using the HiSeq 2500 platform (Illumina). The reads were filtered, trimmed and assembled using various tools integrated into the Galaxy online platform. The overall incidence of BAG was high as follows: *spgM* – 98.21%, *rmlA* – 85.11%, and *rpfF* – 70.23%. No significant correlation was found between their presence and the origin of the isolates (clinical and in contact with abiotic surface). The most prevalent gene profile was *spgM*<sup>+</sup>/*rmlA*<sup>+</sup>/*rpfF*<sup>+</sup> (58.33%), while detecting its significant predominance in isolates from lower respiratory tract infections compared to those from infections with other localization (p<0.001). All the strains examined were characterized as strong biofilm producers (Optical density at λ=570 nm (OD<sub>570</sub>) range 0.788–2.064 and OD>4xOD<sub>C</sub> (negative control from uninoculated medium)) with exception of a single strain that showed a weak biofilm-forming phenotype (OD<sub>570</sub> value of 0.177 and OD<sub>C</sub><OD≤2xOD<sub>C</sub>). No direct correlation was found between the amount of biofilm and the genotype observed. WGS showed that the presence of the *spgM*, *rmlA* and *rpfF* genes (without inactivating mutations in them) is a potential indicator of strong biofilm production. Also, the nucleotide sequence of *rmlA* accumulated a disproportionately large number of sequence variants relative to the other two genes studied. This suggested that its product has a function that is not critical to the biofilm formation process. In conclusion, the widespread dissemination of BAG among clinical isolates of *S. maltophilia* is consistent with the important role of biofilm formation in the pathogenesis of infections. The results obtained that some strains, lacking one of the BAG (either *rmlA* or *rpfF*), were still capable of strong biofilm formation put forward the complex nature of this adaptive phenotype, especially in chronic bronchopulmonary infections caused by *S. maltophilia*.

**Scientific publications and presentations:**

- Trifonova A, Savov E, Strateva T. Increasing resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole among clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and therapeutic possibilities in infections. *Modern Medicine*. 2019;63 (2):3-10.
- Strateva T, Trifonova A, Sirakov I, et al. Molecular-genetic studies on biofilm-associated genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Medical Review*. 2020; 56 (2): 36-42.
- Strateva T, Trifonova A, Borisova D, et al. Biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates – phenotypic and genotypic characteristics. *Medical Review*. 2020;56 (3):43-50.
- Strateva T, Trifonova A, Savov E, et al. Characterization of an extensively drug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolate with strong biofilm formation ability from Bulgaria. *Infect Dis*. 2020; 52 (11): 841-5.
- Strateva T, Trifonova A, Savov E, et al. Clinical-laboratory aspects of infection caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. Jubilee National Conference for GPs and Pediatricians

115 years First Children's Clinic, UMHAT "Alexandrovska". ONLINE. 10-12 September 2020.

- Strateva T, Trifonova A, Peykov S, et al. Susceptibility to antimicrobial drugs of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: Resistance mechanisms to trimethoprim-sulfamethoxazole and therapeutic approach. XVIII National Congress of Clinical Microbiology and Infections. Sofia, Park Hotel "Moskva". 30.09. – 02.10.2020.

### **Contract 64/2019 Evaluation of *Helicobacter pylori* susceptibility to fluoroquinolones**

**Research team:** Prof. Lyudmila Boyanova Georgieva, MD, DSci

- Galina Gergova, MD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of medicine, Department of Medical Microbiology

**RESULTS:** Increase in *Helicobacter pylori* resistance to fluoroquinolones has been reported in many countries. The aim of the study was to compare, for the first time to our knowledge, levofloxacin and delafloxacin activities against *H. pylori* and anaerobic bacteria, including numerous levofloxacin- and multidrug resistant strains. For *H. pylori*, minimal inhibitory concentrations (MICs) of six antibiotics against 71 consecutive clinical strains were determined. Delafloxacin MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 0.016 and 0.125 µg/mL versus 0.125 and ≥32 µg/mL, respectively, for levofloxacin. Against the 19 levofloxacin resistant strains, delafloxacin MICs<sub>50</sub> and MICs<sub>90</sub> were 0.094 and 0.38 µg/mL, respectively. Delafloxacin MICs against the 21 strains with double or multidrug resistance were ≤0.75 µg/mL. The low MICs, the activity against levofloxacin resistant and multidrug resistant *H. pylori* strains and the increased activity of the agent in acidic conditions make delafloxacin a drug with a good potential for optimizing fluoroquinolone-based eradication regimens. We also assessed delafloxacin and levofloxacin activities against 96 anaerobic and some microaerophilic isolates. Delafloxacin MICs were strikingly lower than those of levofloxacin. Delafloxacin MIC<sub>90</sub> against clostridia, other Gram-positive rods, anaerobic/microaerophilic cocci and Gram-negative rods were 0.75, 0.032, 0.38 and 0.5 µg/mL, respectively. The highest (≥4 µg/mL) MICs of the newer fluoroquinolone were found in only 4.2% of isolates versus 46.9% by levofloxacin. The present results and the potency in acidic conditions showed delafloxacin advantages over levofloxacin in terms of usefulness for treatment of mixed anaerobic-aerobic infections and activity against *Clostridioides (Clostridium) difficile*.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Boyanova L, Markovska R, Medeiros J, et al. Delafloxacin against *Helicobacter pylori*, a potential option for improving the eradication success? 2020;96(4):114980.
- Boyanova L, Yordanov D, Ouzounova-Raykova V, et al. Activity of delafloxacin versus that of levofloxacin against anaerobic and microaerophilic isolates. Anaerobe. 2020;62:102150.

### **Contract 66/2019 Assessment of the genetic risk of cardiovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus by new-generation sequencing**

**Research team:** Prof. Ivanka Dimova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Pavlina Gateva, MD, PhD

- Assist. Olga Beltcheva, PhD
- Ivelina Mihaleva, MD – PhD student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Department of Medical genetics

**RESULTS:** There is a strong association between type 2 diabetes mellitus (DM) and cardiovascular disease (CVD). CVDs are a leading cause of morbidity and mortality among the diabetic population. Our objective was to study the allelic and genotypic frequencies of genetic variants that have shown a strong association with cardiovascular disease in diabetic patients with and without cardiovascular complications to assess the additional contribution of genetic variation in determining risk of such complications. We have used CVD StripAssay kit (Vienna Lab) based on polymerase chain reaction (PCR) and reverse hybridization. The following mutations were studied: FV G1691A (Leiden), FV H1299R (R2), Prothrombin G20210A, Factor XIII V34L,  $\beta$ -Fibrinogen -455 G-A, PAI-1 4G/5G, GPIIIa L33P (HPA-1), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, ACE I/D, Apo B R3500Q, Apo E2/E3/E4. We analyzed for these mutations 36 diabetic patients, divided in 2 groups: 1) 20 diabetic patients with CVD and 2) 16 diabetic patients without CVD. Overall, we found higher than population frequency for the following alleles/genotypes – 5.5% for FV Leiden allele, 9.7% for FVR2 allele, 38.9% for  $\beta$ -Fibrinogen genotype -455G/A, 58.9% for PAI-1 4G allele, 36.1% for ACE D/D genotype. Statistically higher frequency was established for  $\beta$ -Fibrinogen -455 G/A in the patients with CVD compared to non-CVD (55% vs 18.7%). We detected high frequency of  $\beta$ -Fibrinogen -455 G/A genotype in diabetic patients, especially in these with CVD. Based on its pro-inflammatory role, this could offer an opportunity for benefit from anti-inflammatory treatment, along with its connection to possible thrombotic events.

**Scientific publications and presentations:**

- Andreeva-Gateva PA, Mihaleva ID, Dimova II. Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular risk; what the pharmacotherapy can change through the epigenetics. Postgrad Med. 2020 Mar;132(2):109-125.

**Contract 67/2019 Contribution of hyperpolarization-activated cation channel to retinal function: electroretinographic study**

**Research team:** Assoc. Prof. Elka Borislavova Yordanova-Popova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Petia Kuppenova-Sherbanova, MD, PhD
- Veselina Mihaylova, student

**Organization unit:** Dept. of physiology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The role of retinal hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in generation of electroretinographic (ERG) responses to stimulus onset (b-wave) and offset (d-wave) are largely unknown. In this study we investigated the effects of pharmacological blockade of HCN channels with ZD7288 or ivabradine on the ERG b-wave (ON response) and d-wave (OFF response) in dark adapted frog eyecup preparations. Initially, the dose-response relationship of blocker effects on the b- and d-waves was investigated by using light stimuli with constant intensity. Afterwards, the effects of 75  $\mu$ M ZD7288 or 30  $\mu$ M ivabradine on the stimulus - response function of the ERG b- and d-waves were explored over a wide intensity range (10 log units). Application of blockers (ivabradine - 3, 30 and 60  $\mu$ M; ZD7288 - 5, 50, 75 and 100  $\mu$ M) caused a dose-dependent increase of the d-wave amplitude, while the effect of the b-wave amplitude was much smaller. When the intensity-response function of the b- and d-

waves was investigated during the HCN channel blockade, it was found that the absolute and relative sensitivity of both the ON and OFF responses remained unchanged. The HCN blockade caused, however, an enhancement of the d-wave amplitude at all suprathreshold stimulus intensities, while the b-wave amplitude was slightly enhanced only in the range of higher intensities. As a result of the greater blocker effects on the OFF response amplitude, the b/d amplitude ratio was significantly decreased over the whole intensity range. The blockers caused a prolongation of the b-wave half-width duration, but a shortening of the d-wave half-width duration at higher intensities. Our results clearly demonstrate that the blockade of retinal HCN channels changes the balance between the ON and OFF responses in the distal frog retina. This ON/OFF imbalance may be one of the causes for visual disturbances reported in ivabradine treated patients.

**Scientific publications and presentations:**

- Popova E, Kупenova P. Effects of ivabradine on the ON and OFF responses of frog electroretinogram. *Comp Rend l'Acad Bulg Sci* 2021.
- Popova E, Kупenova P. Effects of HCN channel blockade on the intensity-response function of electroretinographic ON and OFF responses in dark adapted frogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2020;80(2):192-204.

**Contract 68/2019 Interacton between the endogenous cannabinoid and the adrenergic mediator systems in the pathogenesis of cold stress**

**Research team:** Assist. Prof. Hristina Hristova Nocheva-Dimitrova, MD, PhD

- Prof. Alexandar Stojnev, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Roman Tashev, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Dimitar Bakalov, MD
- Ekaterini Dubovina, student
- Ana Papanayotu, student
- Teodor Angelov, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pathophysiology

**RESULTS:** Stress-induced decrease of pain perception, known as stress-induced analgesia (SIA) is considered an inborn adaptive response - a peculiar kind of defense against imminent treats. Early studies showed that several opioid-dependent and non-opioid mechanisms take part in SIA development. The aim of the project was evaluation of the effect on SIA by the administration of CB1-receptors agonist/antagonist along with  $\alpha_2$ -adrenergic receptors` agonist/antagonist in rats before their exposure to 1 hour of cold stress (1h CS). The experiments were conducted with 96 male Wistar rats, injected with the substances in different combinations before their exposure to 1h CS. Pain perception was estimated by mechanical and thermal nociceptive methods. Each one of the two agonists (Anandamide and Clonidine) as well as the two antagonists (AM 251 and Yohimbine) were at first administered alone. The effect of both agonists administered together before 1h CS-exposure was evaluated. In order to ascertain the role of each one of the two systems, the antagonists of both cannabinoid and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors were used. From the results obtained we can conclude that the effect of each one agonist (of cannabinoid and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors) administered alone differs than the effect of their administration together - such a finding presumes an interaction between the cannabinoid and the adrenergic systems. Our experiments suggest that the cannabinoid system exerts a

modulation effect on SIA pathogenesis – administration of CB1 agonist alone initially increases SIA and decreases it later; antagonizing cannabinoid receptors with administration of adrenergic receptors agonist in the same time increases SIA with values higher than the ones after Clonidine alone administration. On the contrary, the adrenergic system increases SIA - antagonizing adrenergic receptors with administration of cannabinoid receptors agonist at the same time decreases SIA with values lower than the ones after Anandamide alone administration.

**Contract 69/2019 Social interactions, learning and spatial memory in adolescent rats under chronic social stress: effects of mesembrine alkaloids**

**Research team:** Prof. Alexander Gueorguiev Stoynev, DSci.

- Assoc. Prof. Radka Tafradjiiska-Hadjiolova, PhD
- Assoc. Prof. Daniela Pechlivanova, PhD
- Assist. Prof. Zafer Sabit
- Assist. Prof. Dimitar Bakalov

**Organization unit:** Department of Pathophysiology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The objective of this project was to characterize the impact of chronic social stress on the basic parameters of the exploratory behavior and memory in adolescent male Wistar rats as well as the effects of the mezembrine alkaloids fraction obtained by extraction from leaves of *Narcissus cv. Hawera* on these parameters. Social defeat stress (SS) was induced via chronic (20 days) exposure to Resident-Intruder Paradigm of adolescent male Wistar rats. Controls, SS and SS+MZM (20 mg/kg/day, 20 days) groups were subjected to behavioral tests: Open field (OFT), Elevated plus maze (EPM) for anxiety-like behavior and motor activity; Novel Object Recognition Test (NORT) for working memory, Paw pressure (PPT) for nociception and biochemical assessments of carbonylated proteins in blood plasma and hippocampus and ELISA for plasma concentration of testosterone. Exposure to chronic SS decreased overall motor activity and provoked anxiety-like behavior in the adolescent rats both in OFT and EPM expressed by a drastic decrease in total motor activity, a reduced number of re-entry into the aversive central area and an increased stay in the protected corner zones OFT, as well as a reduced time spent in the open arms of the EPM. Chronic SS impairs normal working memory in NORT and elevated carbonylated proteins in blood plasma and hippocampus. Chronic treatment with MZM abolished anxiety-like behavior, diminished object exploration and ameliorated recognition memory in the stressed rats. The treatment with alkaloid fraction diminished the pain threshold, normalized the level of carbonylated proteins in the hippocampus, but not in the blood plasma. Neither SS nor MZM changed the levels of testosterone in blood plasma of adolescent rats. Presented data support our hypothesis for the potential ameliorative effects of MSM on SS-induced aberrations in anxiety behavior and memory acquisition in adolescent rats.

**Scientific publications and presentations:**

- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Ameliorative effects of alkaloid fraction from *Narcissus cv. Hawera* on the deleterious impact of chronic social defeat stress in adolescent rats. FENS 11-15 July 2020
- Bakalov D, Pechlivanova D, Sabit Z, et al. Prevention of social stress-induced memory decline in adolescent rats by alkaloids from *Narcissus cv. Hawera*. ICMS 2020, 24-27 September

**Contract 70/2019      Analysis of somatic mutations in primary tumors with different localization in patients with multiple primary neoplasia**

**Research team:** Assist. Prof. Atanaska Velichkova Mitkova, PhD

- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, PhD, DSci
- Daniela Pencheva, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Silva Giragosyan, PhD student
- Veronika Petkova, PhD student
- Corr. Member of BAS Prof. Chavdar Slavov, MD, PhD, DSci
- Assist Prof. Simeon Rangelov, MD, PhD
- Marchela Koleva, MD, PhD
- Miroslava Tzekova-Chernopolska, MD
- Asist. Prof. Ivan Terziev, MD
- Assoc. Prof. Teophyl Sedloev, MD, PhD
- Slaviana Usheva, PhD student
- Adriana Andreeva, MD

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Genetic factors, hormonal factors, lifestyle, environmental factors, virus infections with oncogenic viruses, etc. play a major role in the development of multiple primary tumors (MPT). The aim of the present study was to analyze somatic mutations in primary tumors with different localization in patients with multiple primary neoplasias. The present study included a total of 5 patients with MPT, three men and two women who developed primary tumors with different localization: MPT16-penis/kidney; MPT23-liver/lung; MPT34-prostate/bladder; MPT24-GIST/ovary; MPT43-endometrium/breast/bladder. Somatic mutation analysis was performed using Ion Torrent AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 gene panel, on the Ion Torrent PGM platform (Thermo Fisher Scientific). The detected variants with pathogenic/ likely pathogenic effect and VUS represented 28% (23/82) of all detected variants. Somatic variants in the following genes were found in the primary tumors of the studied patients: MPT16-1 - pathogenic variant in *VHL*, MPT16-2 - 5 VUS in *ALK* (2) *VHL* (1), *PIK3CA* (1) and *ERBB4* (1), respectively, a germline mutation in *CHEK2*; MPT23-1 - no variants with clinical effect were found; MPT23-2 - 1 pathogenic and 1 likely pathogenic variant in *TP53*, 1 pathogenic variant in *CTNNA1*, germline VUS in *JAK3*; MPT24-1 - 2 VUS in *RET*, MPT24-2 - no variants with clinical effect, germline VUS in *TP53*; MPT34-1 - no variants with clinical effect were found, MPT34-2 - 1 pathogenic variant in *FGFR3*, 1 VUS in *PIK3CA*, germline VUS in *TP53*; MPT43-1: one pathogenic variant in *RBI*, two likely pathogenic variants in *CDKN2A* and *SMARCB1*, two VUS in *JAK3*; MPT43-2 - 1 VUS in *KDR*, MPT43-3 - pathogenic variant in *PIK3CA*, germline VUS in *MET*. Different somatic variants were found in each of the primary tumors of the studied MPT patients, which could affect different signal-transduction pathways. Molecular profiling of patients with MPT through NGS opens up new possibilities for personalized treatment.

**Contract 71/2019 Investigation of susceptibility to new antimicrobial agent among polyresistant isolates *Klebsiella pneumoniae* and the mechanisms of resistance to colistin**

**Research team:** Prof. Romyana Donkova Markovska-Davidkova

- Petya Stankova, PhD
- Kalina Mihova
- Ylia Marteva-Proevska
- Corr. Member of BAS Prof. Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Medical Microbiology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** A total of 68 imipenem non-susceptible clinically significant isolates of the Enterobacterales, obtained from two hospitals in Sofia and from one in Varna and Pleven, were previously studied from a uroculture. In addition, 98 faecal isolates ESBL / carbapenemase producers were tested. 63 of the 68 isolates were carbapenemase products and three fecal samples. They were 55 *Klebsiella pneumoniae* (incl fecal isolates), 2 *Citrobacter freundii* complex, 1 *Enterobacter cloacae* complex, 3 *Proteus mirabilis*, 2 *Providentia stuartii*, 3 *Serratia marcescens*. They produced NDM-1 (57%, 36 isolates), KPC-2 (24%, 15 isolates) and VIM-1 (9.5%, 6 isolates). Three isolates have different combinations of carbapenemases. Twenty-five isolates produce CMY enzymes, mainly CMY-4 (20 of them). BlaCTX-M-15 was detected in 67% (42/63) of the isolates, with blaCTX-M-3 being detected in 7.9% (5/64) of the isolates, mainly *K. pneumoniae*. In the studied 52 isolates of *K. pneumoniae* we found 8 clones, the first having 15 representatives belonging to ST11 MLST type and producing mainly NDM-1, CMY-4 and CTX-M-15. In faecal carriers, we found three ST15 *K. pneumoniae* isolates produced KPC-2 and CTX-M-15. The clinical isolates were very highly resistant - 100% resistant to amoxicillin / clavulanic acid, piperacillin / tazobactam, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, cefotaxime, ceftoxitin, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin. Very low sensitivity to fosfomycin - 19% (for the oral form), tigecycline - 3%, tobramycin - 1.5%, co-trimoxazole - 8% was observed. It is possible to use aminoglycosides for treatment, but in combination, susceptibility to gentamicin was 36.5%, amikacin - 27%. Susceptibility to colistin is excellent 82%. Of the new antimicrobials delafloxacin had no good activity (0%), much better was eravacycline - (78% sensitive) and plasomycin (89%). Ceftazidime / avibactam is active in 40% of isolates and meropenem / vaborbactam in 23.8%. The three faecal isolates were susceptible to all new antimicrobials except delafloxacin. Isolate did not show the presence of mcr genes encoding plasmid colistin resistance. The results showed need for strict measures to prevent the spread of these problematic microorganisms and to continue monitoring.

**Contract 73/2019 Genetic factors affecting the normal function of the complement system and associated with renal pathology**

**Research team:** Olga Jivanova Beltcheva, PhD

- Kunka Kamenarova, PhD
- Assoc. Prof. Maria Gaydarova, MD, PhD
- Assist. Prof. Dimitar Roussinov, MD, PhD
- Kalina Mihova
- Assist. Prof. Galia Zlatanova-Rashkova, MD
- Daniela Pencheva, PhD
- Assoc. Prof. Polina Miteva, MD, PhD



- Kremena Dimitrova, MD
- Greta Mihneva-Kirilova, MD

**Organization unit:** Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry,

**RESULTS:** The aim of the present study was to elucidate the nature of genetic mutations associated with increased risk of renal disorders resulting from dysfunction of the complement, specifically atypical haemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy. We applied next-generation sequencing of the clinical exome for identification of point mutations and small deletions/insertions in 9 paediatric patients, followed by Sanger sequencing for findings confirmation and segregation analysis, as well as MLPA for detection of larger genetic aberrations. The pathogenicity of novel variants identified in the course of the study was evaluated using bioinformatics methods and tools. The analysis of the results from the genetic testing revealed several pathogenic variants and alleles associated with increased risk for various pathologies. The disease causing mutation was identified in two cases: a *TREX1* variant, associated with predisposition to systemic lupus erythematosus and with the autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S); a mutation in *COL4A5*, the gene coding for a type IV collagen chain; a genetic variant in *C3* gene, whose protein product is the complement factor with the same name. The collagen gene variant was novel, absent from both the literature and the genetic databases, but in agreement with the ACMG criteria was judged to be pathogenic based on the bioinformatics evaluation and the segregation within the family. The co-inheritance of pathogenic variants in two genes, so called oligogenic effect, may explain the unusual presentation of the disease in the patient – early and severe X-linked Alport syndrome in a female child. In two addition patients the genetic testing revealed risk factors associated with renal pathology, which was an indication for performing additional clinical evaluations and optimisation of therapy. The clinical exome sequencing in a group of patients with suspected complement pathology revealed once again the wide genetic variability of these disorders.

**Scientific publications and presentations:**

- Beltcheva O, Kamenarova K, Mihova K, et al. Next-generation sequencing for elucidation of the molecular basis of glomerular diseases. Xth National conference for rare diseases and orphan drugs .Plovdiv, 13-15 September 2019.
- Beltcheva O, Kamenarova K, Mihova K, et al. Application of NGS sequencing for improved diagnosis in the pediatric nephrology setting European Society of Human Genetics Conference, European Human Genetics Virtual Conference, ESHG 2020.2, June 6-9, 2020

**Contract 74/2019      Microbiological, molecular biological and epidemiological studies on *Lactococcus garvieae* - a new pathogen, cause of local and systemic infections**

**Research team:** Corr. Member Ivan Gergov Mitov, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Ivo Sirakov, VMD, PhD
- Prof. Tanya Strateva, MD, PhD
- Assist. Prof. Daniel Yordanov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Petya Orozova, PhD

**Organization unit:** Department “Medical microbiology”, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** The project objectives are related to the approbation of classical and molecular-biological methods for diagnosis and differentiation of *L. garvieae* from closely related bacterial

species, epidemiological typing of *L. garvieae* strains, antibiotic susceptibility testing of strains isolated between 2002-2019, their genotyping and proving the prevalence of genetic determinants of resistance and virulence factors. In order to achieve the set goals we used classical and molecular genetic methods. Isolation and identification methods for detection of *L. garvieae* have been successfully tested, including MALDI-TOF technology, which currently is difficult to obtain. However, in routine diagnosis, *L. garvieae* may be misidentified due to its similarity to bacteria of the *Enterococcus* genus. Therefore, in addition to the classical biochemical methods for identification, we used Zlotkin PCR protocol optimized by us and a serological slide agglutination method for optimal diagnosis of this pathogen in aquatic animals and humans. The antibiotic susceptibility of isolated *L. garvieae* was determined, showing preserved sensitivity to Ampicillin, Erythromycin, Tetracycline, Levofloxacin, Chloramphenicol, Vancomycin, Linezolid and resistance to Oxolinic acid, Nalidixic acid, Ampicillin; Oxacillin, Colistin and Tiamulin, as five of the isolates showed resistance to Novobiocin. Serological tests show the strains belonging with the exception of one to the European capsule serotype KG-, the capsule variants of which are significantly more virulent than the non-capsular ones, defined as KG + serotype. PCR studies showed preserved virulence of the isolates. With the exception of three strains, the presence of the main capsule gene as factor - has been proven in the remaining 22. A protocol for the epidemiological typing of isolates has been established. RAPD has proven the spread of two major clusters in the country and clonal differences with strains isolated from Greece and Serbia. With the help of the method the movement of a virulent strain from a fishpond to a retail has been established. Epidemiological typing by sequencing selected isolates by 16s rRNA gene confirmed the isolates belonging to *L. garvieae*.

**Contract 75/2019 UHPLC-HRMS profiling of *Chenopodium bonus-henricus* L. roots for saponins, flavonoids and ecdysteroids and testing the main compounds for anti- $\alpha$ -glucosidase, anti- $\alpha$ -amylase and antilipase activities**

**Research team:** Assoc. Prof. Paraskev Todorov Nedialkov, PhD

- Assist. Prof. Zlatina Kokanova-Nedialkova, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy

**RESULTS:** UHPLC-HRMS based profiling of the roots of *Chenopodium bonus-henricus* L. tentatively identified 45 compounds, respectively 31 saponins of six sapogenins (oleanoic acid, 2 $\beta$ -hydroxyoleanoic acid, 2 $\beta$ -hydroxygypsogenin, medicagenic acid, bayogenin and phytolacagenin) together with 12 flavonoid glycosides of 6-methoxykaempferol, isorhamnetin, spinacetin and 2 ecdysteroids (20-hydroxyecdysone and polygodine B). Six saponins and three flavonoids were tested for anti- $\alpha$ -glucosidase, anti- $\alpha$ -amylase and antilipase activities: 3-O- $\beta$ -glucuronopyranosyl-medicagenic acid-28- $\beta$ -xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -arabinopyranosyl ester (Chbhs-01), Bonushenricoside A (Chbhs-03), 3-O- $\beta$ -glucuronopyranosyl-bayogenin-28-O- $\beta$ -glucopyranosyl ester (Chbhs-04), 3-O-L- $\alpha$ -arabinopyranosyl-bayogenin-28-O- $\beta$ -glucopyranosyl ester (Chbhs-05), 3-O- $\beta$ -glucuronopyranosyl-2 $\beta$ -hydroxygypsogenin-28-O- $\beta$ -glucopyranosyl ester (Chbhs-06), Bonushenricoside B (Chbhs-07), 6-methoxykaempferol-3-O- $[\beta$ -apiofuranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside (Chbhf-01), spinacetin 3-O- $[\beta$ -apiofuranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside (Chbhf-02) and spinacetin 3-O-gentiobioside (Chbhf-03).

Anti- $\alpha$ -glucosidase and lipase activity of the tested compounds were established by using LC-MS.

Five of the tested compounds exhibited anti- $\alpha$ -glucosidase activity. The flavonoid Chbhf-03 ( $IC_{50}=260 \mu M$ ) possessed the highest anti- $\alpha$ -glucosidase activity comparable to that of acarbose ( $IC_{50} = 206 \mu M$ ), a known anti-diabetic drug used to treat diabetes mellitus type 2. All saponins and flavonoids exhibited prolipase activity. The highest activity was expressed by saponins Chbhs-06, Chbhs-07, Chbhs-01 and flavonoid Chbhf-03 which stimulated the activity of the enzyme lipase respectively by 62.10%, 46.08%, 36.56% and 38.40% at a concentration of 200  $\mu M$ . The tested saponins and flavonoids did not alter enzymatic activity of  $\alpha$ -amylase. This study thoroughly investigated the chemical composition of the roots from *C. bonus-henricus* L. for the content of saponins, flavonoids and ecdysteroids using UHPLC-HRMS and confirmed that the title plant contains compounds with prolipase and anti- $\alpha$ -glucosidase activity.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Kokanova-Nedialkova Z, Kondeva-Burdina M, Nedialkov PT. Neuroprotective, anti- $\alpha$ -glucosidase and prolipase active flavonoids from Good King Henry (*Chenopodium bonus-henricus* L.). *Nat Prod Res.* 2020 Jun 27:1-5.
- Kokanova-Nedialkova Z, Kondeva-Burdina M, Nedialkov PT. Saponins from the roots of *Chenopodium bonus-henricus* L. With neuroprotective and anti- $\alpha$ -glucosidase activities. *Pharmacia* 2021;68(2):387-392.

#### **Contract 76/2019 Development of an effective method for isolation of mauritianin and in vitro evaluation of its protective potential**

**Research team:** prof. Iliana Nikolaeva Manova, PhD

- Assoc. Prof. Petranka Zdraveva, PhD
- Assoc. Prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD
- Assist. Prof. Aleksandar Shkondrov, PhD
- Dimitar Dimitrov, student

**Organization unit:** Dept. of Pharmacognosy, Dunav 2 Str., Sofia 1000

**RESULTS:** Mauritianin is a relatively rare flavonoid, but several studies revealed its pharmacological potential. In this study overground parts of ten *Astragalus* species were investigated for mauritianin content to find a reliable source of the compound. The quantity of the flavonoid in each extract was determined by a novel high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method. For the first time mauritianin is reported in *A. cicer*, *A. onobrychis*, *A. glycyphyllos*, *A. glycyphylloides*, *A. corniculatus* and *A. ponticus*. Only in *A. depressus* the compound was not found. Significant differences in mauritianin content (from 4 to 1642 ng/mg dry weight) of the samples were observed. Noteworthy, *A. onobrychis* var. *chlorocarpus* and *A. cicer* could be considered as a potential source of the compound, substituting the rare *A. monspessulanus* subsp. *monspessulanus*. In *in vivo* model of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats mauritianin showed statistically significant antioxidant and hepatoprotective effect, similar to silymarin.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Shkondrov A, Krasteva I, Kozuharova E, et al. Bulgarian species of genus *Astragalus* as potential sources of mauritianin. *Pharmacia* 2020;67:229-232.

- Shkondrov A, Krasteva I, Kondeva-Burdina M. Plant sources of mauritianin and evaluation of its protective potential. Seventh Congress of Pharmacy with International Participation. Borovetz, Bulgaria. 21-24.11.2019

**Contract 77/2019 Experimental and numerical study of supersaturating nano-sized drug delivery systems based on poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene oxide) double hydrophilic copolymers for enhanced membrane transport of poorly soluble drugs**

**Research team:** Assist. Prof. Victoria Iskrova Michailova, PhD

- Prof. Denitza Momekova, PhD
- Assist. Prof. Iva Valkova, PhD
- Mag. Pharm. Vesela Ganeva
- Assist. Prof. Viliana Gugleva - MU-Varna
- Rositsa Michailova, PhD student
- Assoc. Prof. Assen Nedev, PhD - Bulgarian Academy of Sciences, Institute of Mechanics

**Organization unit:** Dept of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, 2 Dunav Str., 1000 Sofia.

**RESULTS:** The aim of this project is to conduct experimental and numerical study of supersaturating nano-sized drug delivery systems based on poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethylene oxide) (PNIPAM-g-PEO) double hydrophilic copolymers for enhanced membrane transport of poorly soluble drugs. Indomethacine (IMC), a practically water insoluble compound, was used as a model drug. It was found that supersaturated micellar structures are able to form in the complex aqueous-ethanol system stabilized by the active interactions among the molecules of IMC, ethanol and PNIPAM. Using isothermal titration calorimetry (ITC), it was proved that the character and strength of these interactions were determined by the mutual synergistic effect of IMC and ethanol, the latter promoting the drug accommodation between the chains of PNIPAM. This was verified by the data from the thermo-rheological study conducted under the dynamic conditions of non-destructive oscillatory test. On the basis of the direct relationship between the elastic deformation at the phase transition and the amount of bound ethanol, the relative solvation state of PNIPAM was quantified at different temperatures and solvent compositions (5-30% v/v ethanol). It was found that the presence of IMC significantly weakened PNIPAM-ethanol-water interfacial interactions facilitating preferential absorption of ethanol in the polymer system. With these systems, highly efficient drug incorporation into the formed micellar structures was also established. Irrespective of the loading method applied or alcohol quantity added, the drug loading content and supersaturation effectiveness were highest for systems prepared with a drug-to-copolymer feed weight ratio of 1.5:1.0 (DLC ~ 130 -140% (w/w<sub>p</sub>)). These conditions produced small spherical particles (<50 nm) with a core-shell morphology and explicitly amorphous properties, which also determined the general kinetic pattern of drug release. Using numerical modelling, it was found that the *in vitro* drug release kinetics is accelerated and controlled by the dissolution of the poorly soluble amorphous drug. The process velocity is determined by pH, the percentage of ethanol content and the temperature. The results obtained define the PNIPAM-g-PEO self-associated micellar nanoparticles as promising highly efficient nano-sized drug delivery systems for achieving an enhanced membrane transport via the supersaturation mechanism.

### **Scientific publications and presentations:**

- Valkova I, Michailova V. Calorimetric study on solvent mediated interactions of indomethacine with poly(N-isopropylacrylamide)-graft-poly(ethylene oxide) copolymer. 7<sup>th</sup> Congress of Pharmacy with International Participation. Rila Hotel, Borovets, November 21-24, 2019, pp. 42-43.

### **Contract 78/2019 Virtual Screening and Hit Selection of Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors**

**Research team:** assist. prof. Mariyana Dimitrova Atanasova, Phd

- Prof. Irini Doytchinova, PhD, DSci
- Assos. prof. Ivan Dimitrov, PhD
- assist. prof. Iva Valkova, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Chemistry Department

**RESULTS:** The aim of the study is to discover new structures with natural origin and affinity to acetylcholinesterase. Structure-based methods molecular docking and molecular dynamics are used in the study. Results and conclusions: In the present study, 12 ZINC databases of natural compounds (almost 150 000 compounds) were screened virtually for affinity to AChE by molecular docking with GOLD v.5.2.2 at the following settings: ChemPLP scoring function, rigid protein and flexible ligand. Next, the compounds were screened for blood brain barrier (BBB) permeability, drug-likeness, lead-likeness, GI absorption and PAINS by SwissADME tool. The complexes with ChemPLP score above 70 were inspected visually according to the ligand size and position within the binding pocket. 32 ligands from 23 structural groups were selected and molecular dynamic simulations were performed on 10 of them in order to evaluate the stability of the complexes with 20 AChE. The current results for three systems reveal that compounds formed stable complexes with the enzyme.

### **Contract 79/2019 Essential oils from invasive, alien plant species – endless cheap resource for pharmaceutical practice**

**Research team:** Assoc. Prof. Ekaterina Krasteva Kozuharova. PhD, DrSc

- Prof. Iliana Ionkova PhD, DrSci
- Assoc. Prof. Niko Benbassat PhD
- Christina Stoicheva, student
- Margarita Georgieva, student

**Organization unit:** Department of Pharmacognoy, Dunav 2, Sofia 1000

**RESULTS:** The aim of the project is to extract and study essential oils, lipophilic and volatile components from invasive, alien plant species for pharmaceutical application or to improve the quality of life. To evaluate the resources of *Ailanthus altissima*, *Amorpha fruticosa*, *Erigeron canadensis*, and *Xanthium strumarium*, we followed the "Medicinal Plant Resources Assessment Methodology" developed by Schroeter et al. (1986), which was formally accepted in Bulgaria for assessment of medicinal plant resources and is recommended by the MOEW. Essential oil was obtained by steam distillation and plant material from all study sites was extracted with hexane to obtain a concrete. Diluted essential oil samples (1: 1000) were analyzed with a GC / MS

system. The resources of the four studied plant species are abundant. The mosaic nature of their populations implies the use of manual labor for harvesting. This will help reduce their numbers and conserve biodiversity. However as the production of essential oil becomes more expensive this way, the large producers prefer cultivation and machine harvesting. This is extremely risky when dealing with invasive species. If such approach is undertaken, extreme care and rigorous regime of agro-technical measures are required. It is crucial to prevent the displacement of the fruit. Otherwise, the environmental problem and the hazard for the biodiversity will be deepened. *Ailanthus altissima* and *Amorpha fruticosa* are promising for future development for practical application as a source of bio-pesticides. Also, *A. fruticosa* is a prospective object for further product development that can help treat chronic wounds.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Kozuharova E, Benbassat N, Berkov S, et al. *Ailanthus altissima* and *Amorpha fruticosa* - invasive arboreal alien plants as cheap sources of valuable essential oils. *Pharmacia* 2020;67(2):71-81.
- Kozuharova E, Benbassat N, Ionkova I. The invasive alien species *Amorpha fruticosa* in Bulgaria and its potential as economically prospective source of valuable essential oil. *Pharmacia* 2020;67(2):357-62.
- Kozuharova E, Benbassat N, Ionkova I. Invasive alien species - cheap sources of valuable essential oils. 7th Congress of Pharmacy. Borovetz, Bulgaria. 21-24 November 2019, 74.
- Kozuharova E, Benbassat N, Ionkova I, The invasive alien species *Amorpha fruticosa* - a cheap source of valuable essential oils. 7th Congress of Pharmacy. Borovetz, Bulgaria. 21-24 November 2019, 153.
- Stoicheva K, Kozuharova E, Yonkova I, et al. Essential oil of the invasive plant species *Xanthium strumarium* L. - composition and pharmacological effect. Student Scientific Session, Faculty of Pharmacy, MU-Sofia, Sofia, November 2019. p. 33..

#### **Contract 80/2019      Development of approaches to stimulate polyphenol production in in vitro cell systems of *Astragalus glycyphyllos* L.**

**Research team:** Prof Iliana Ilieva Ionkova, DSci

- Assoc. Prof. Petranka Zdraveva PhD
- Assist Yancho Zarev
- Pavlinka Popova
- Vilma Posheva

**Organization unit:** Depart. Pharmacognosy, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

**RESULTS:** Establishment of shoots, calli and suspension in vitro cultures from *Astragalus glycyphyllos*, determination of biomass and analysis of total flavonoids, rutin and camelliaside A were performed. To increase flavonoid production various combinations of plant hormones and light/dark regimen were investigated. The possibility of stimulating the production of flavonoids, using exogenously added quercetin at increasing concentrations has been evaluated. Rutin and camelliaside A were proved in highest amount in shoot cultures. Calli, cultivated on modified G48 medium, with double amount of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, achieved higher total flavonoid content (2.37 and 2.03 mg/g DW). Suspensions cultures, cultivated on modified G48 medium with 10, 20 and 30 mg/mL quercetin achieved higher total flavonoid content (0.09, 0.10 and 0.13 mg/mg DW). Biotransformation of quercetin to isoquercitrin was achieved. The highest concentration of

isoquercitrin (56.73 ng/mg DW) was observed on suspensions cultures cultivated on modified G48 medium, with 20 mg/mL quercetin.

**Scientific publications and presentations:**

- Popova P, Zarev Y, Shkondrov A, et al. Induction of flavonoid biosynthesis by in vitro cultivation of *Astragalus glycyphyllos* L. *Pharmacia* 2020;67:95-99
- Popova P, Zarev Y, Shkondrov A, et al. Quantification of flavonoidas in in vitro cultures of *Astragalus glycyphyllos* L. 7 congress of pharmacy with international participation, November 21-24 2019, Borovets

**Contract 81/2019 Investigation of metamizole metabolites (4-methylaminoantipyrine; 4-aminoantipyrine; 4-formyl-aminoantipyrine; 4-acetylaminoantipyrine) for in vitro antitumor / antiproliferative activity in experimental model SYSTEMS**

**Research team:** Assist. Prof. Lyubomir Trifonov Marinov, PhD

- Assist. Prof. Ivanka Kostadinova, PhD
- Assist. Prof. Ani Georgieva, PhD - BAS
- Martin Malchev - PhD student

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology, pharmacotherapy and toxicology, Dunav 2 Str., Sofia 1000

**RESULTS:** Metamizole belongs to the NSAID group and has antipyretic activity and analgesia. It is a prodrug that is metabolized to two active metabolites 4-Methylaminoantipyrine and 4-Aminoantipyrine and two inactive 4-Formyl-aminoantipyrine and 4-acetylaminoantipyrine. To identify the antitumor activity spectrum of Metamizole metabolites on permanent human (breast adenocarcinoma (MCF-7), colon adenocarcinoma (HT-29) and cervical carcinoma (HeLa)) tumor cell lines, a MTT proliferative test was performed and light microscopic studies including an inverted microscope, intravital double fluorochromation with acridine orange and ethidium bromide, and staining with DAPI to assess nuclear morphology. Two stock solutions were prepared - in sterile distilled water (50 µl) and in DMSO (50 µl). Of these stock solutions, working solutions were prepared in sterile standard nutrient at concentrations of 400, 200, 100 and 50 µg / ml for the solution with sterile distilled water and 800, 400, 200 and 100 µg / ml for DMSO. For 4-aminoantipyrine, only a solution of sterile distilled water was used. The MTT assay showed that the aqueous solutions of the metabolites tested did not decrease the proliferation of the cell lines at 24 h and 48 h. after application. Metabolites dissolved in DMSO reduce the proliferation of tumor cell lines to a different extent, as measured by the MTT assay at 24 h and 48 h after administration. The observed effect was more pronounced at 48 hours in all metabolites. The reported decrease is statistically significant at most metabolite concentrations tested, but the decrease does not fall below 50%, which prevents the ability to determine IC50 metabolite concentrations in these tumor cells. Cytomorphological changes in cell lines (HT-29; MCF-7; HeLa) treated with Metamizole metabolites (dissolved in DMSO), detected by fluorescence assays, indicate cell and nucleus damage, characteristic of tumor cell death. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of Metamizole metabolites dissolved in DMSO have been demonstrated in vitro.

**Contract 82/2019 Immunohistochemical investigation of corpus callosum demyelination in a model of multiple sclerosis in mice treated with 4-aminopyridine derivatives**

**Research team:** Assist. Prof. Ivanka Ivanova Kostadinova, PhD

- Prof. Nikolai Danchev, MD, PhD
- Prof. Boycho Landzhov, MD, PhD
- Assist. Prof. Lyubomir Marinov, PhD
- Prof. Lyubomir Vezekov, DSci

**Organization unit:** dept. of Pharmacology, pharmacotherapy & Toxicology, Dunav 2 Str., Sofia 1000

**RESULTS:** Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease in which the myelin sheath of the neurons in the brain and spinal cord is damaged. The aim of this study was to assess the effect of newly synthesized derivatives of 4-aminopyridine (4-AP) on cuprizone-induced model of demyelination in mice. One of the important physicochemical characteristics of drugs is their logP partition coefficient, which characterizes their distribution between the aqueous and lipid phases in the body. It can be determined both experimentally and through computer programs. The model of demyelination was carried out by the administration of the copper chelator cuprizone to mice. Six of the groups received cuprizone with drinking water for 6 weeks to induce demyelination. Besides cuprizone, 4-AP derivatives and 4-AP were administered orally by gavage to the groups in order to assess their protective effect on the demyelination. For this purpose, we used immunohistochemistry. We used Molinspiration cheminformatics software to calculate molecular descriptors. The cuprizone treatment induced an almost total loss of mature oligodendrocytes (OLs) which is established in immunohistochemical assay. The number of mature OLs in the groups treated with compounds 4b, 4c and 4-AP is closer to those in the control group. From the data obtained, we can conclude that the highest value of miLogP of the 4-AP derivatives has compound 4b (4.49), followed by 4d (4.34), 4c (4.12) and 4a (3.81). The results of our studies showed that the newly synthesized compounds 4b and 4c reverse the effect of cuprizone and this effect is more prominent in the group treated with compound 4c. For peptide derivatives of 4-AP, all compounds meet the criteria of Lipinski's rule, making them suitable for the effective treatment of diseases of the CNS.

**Contract 83/2019 Design, druglikeness evaluation and synthesis of novel hydroxy-substituted hydrazones with potential cytotoxic activity**

**Research team:** Assoc. Prof. Boryana Ivanova Nikolova-Mladenova, PhD

- Prof. Georgi Momekov, PhD, DSci
- Teodora Atanasova
- Gabriela Mitev - student

**Organization unit:** Dept. of Chemistry, 2 Dunav str., 1000 Sofia

**RESULTS:** A series of 14 mono-, di-, tri- and tetra-hydroxy-substituted hydrazones was designed and their molecular properties, important for drug pharmacokinetics in the human body were in silico evaluated in order to find the most promising compounds. Lipophilicity and water solubility were analyzed by several alternative predictive models. Virtual screening showed that hydroxy-substituted hydrazones have small molecules, a small number of H-donors (2-5) and H-acceptors (3-6), balanced lipophilicity and a value of TPSA less than 140 Å<sup>2</sup> suggesting good permeability of the compounds through the cellular plasma membrane. The drug likeness was



estimated with validated rules used as high-performance filters in pharmaceutical industry. All hydroxy-hydrazones have appropriate pharmacokinetic properties for drug candidates as formulated by Lipinski's Rule of Five and other methodologies for evaluation of drug similarity. The hydrazones having two or three hydroxy-groups in the aldehyde nucleus, with one of the OH-groups in ortho-position were found to be the most promising for synthesis. 8 new hydroxy-substituted hydrazones were synthesized by condensation in ethanol of 2,3-dihydroxy-, 2,4-dihydroxy-, 2,5-dihydroxy- and 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde with benzhydrazide and 4-hydroxybenzhydrazide. The structures of the new compounds were confirmed by elemental and thermogravimetric analysis, HR ESI-MS mass, IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. The investigated hydroxy-substituted hydrazones were tested for in vitro cytotoxicity on human tumor cell lines using the MTT assay. The bioassay demonstrated that the introduction of a second hydroxy group into the aldehyde nucleus results in compounds with pronounced cytotoxic activity and IC<sub>50</sub> values less than 10 μM. The position of the second hydroxy group alters the activity of the dihydroxy-substituted hydrazones. Hydrazone 4, in which the two hydroxy groups are located next to each other in the 2nd and 3rd positions in the aldehyde nucleus, is the most active and may be considered as a suitable candidate for further studies.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Nikolova-Mladenova B. Molecular properties and bioactivity score of hydroxy-substituted hydrazones, Proceedings of the 56th meeting of the Serbian chemical society, Nis, Serbia, June 7-8, 2019
- Nikolova-Mladenova B. Molecular properties and bioactivity score of hydroxy-substituted hydrazones, 56th meeting of the Serbian chemical society, Nis, Serbia, June 7-8, 2019
- Nikolova-Mladenova B, Ivanov D. Estimation of molecular properties of dihydroxybenzaldehyde based hydrazones, 7th Congress of Pharmacy with international participation, Rila Hotel, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Nikolova-Mladenova B, Momekov G. Synthesis and cytotoxic activity of dihydroxy-substituted hydrazones, 7th Congress of Pharmacy with international participation, Rila Hotel, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Georgieva N, Nikolova-Mladenova B. Comparative study of dihydroxybenzaldehydes derived hydrazones, Student scientific meeting of pharmacy 2019, Faculty of Pharmacy, MU-Sofia, Sofia, Bulgaria, November 30, 2019.

#### **Contract 84/2019      Synthesis, investigation and research of cytotoxic and xanthin oxidase activity of new metal complexes with N,O,S containing organic ligands**

**Research team:** Prof. Adriana Georgieva Bakalova, PhD.

- Assoc. Prof. Emilyia Cherneva, PhD
- Prof. Georgi Momekov, PhD, DSci
- Assist. Prof. Mariyana Atanasova, PhD
- Rositsa Mihaylova, PhD student -
- Antonia Yaneva - student

**Organization unit:** Dept. of Chemistry, 2 Dunav str., 1000 Sofia

**RESULTS:** Three new organic compounds: 3'-Methyl tetrahydro-4*H*-thiopyranspiro-5'-hydantoin, two new derivatives of diethyl ester of H<sub>2</sub>Sq: benzimidazole ester amide (compound

1), 5-nitro-2-amino ester amide of H<sub>2</sub>Sq and four new complexes with the following chemical formulas: *cis*-[PtL<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (complex 1), *cis*-[PtL<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>] (complex 2), *cis*-[PtL<sub>2</sub>I<sub>2</sub>] (complex 3) and *cis*-[PtL(NH<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>] (complex 4) were synthesized. The compounds were characterized by elemental analyses, vibration and NMR spectrometry. The NMR spectra proved that the coordination mode of the ligand with the metal ion was realized by S-atom of the tetrahydrothiopyran fragment. Theoretical investigations show that (1), (3) and (4) complexes have square geometry, while complex (2) has slightly distorted octahedral geometry. The ligand and complexes (1-4) were tested for cytotoxic activity *in vitro* on panel of human tumor cell lines using MTT [5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] dye reduction assay. Complexes (2) and (3) proved to have similar antitumor efficacy with those of prototype drug cisplatin in colon adenocarcinoma model HT-29. *In vitro* inhibitory activity against XO in bovine milk was determined spectrophotometrically by uric acid formation. Complex (2) inhibits XO and can be considered as a new antitumor agent with potent XO inhibitory activity. Molecular docking was used to determine the possible binding of ligand and complexes (1-4) in the XO enzyme. Only complex (2) shows activity against bovine XO. This can be explained by the predicted position of the molecule at the binding site of the enzyme that reaches the molybdenum center and can inhibit it. Bond lengths, angles, etc. of compounds 1 and 2 were calculated and bonds lengths are similar or very close to those found for other esters of H<sub>2</sub>Sq. The geometries of the molecules have been optimized. Both compounds were tested for cytotoxicity *in vitro* on two human tumor cell lines. The results show that the compounds are biologically active at micromolar concentrations.

#### Scientific publications and presentations:

- Cherneva E, Atanasova M, Buyukliev R, et al. 3'-Methyl-4-thio-1*H*-tetrahydropyranspiro-5'-hydantoin Platinum Complex as Novel Potent Anticancer Agent and Xanthine Oxidase Inhibitor, Arch Pharm. 2020;353(7).
- Bakalova A, Buyukliev R, Atanasova M, et al. Design, Synthesis, Molecular Docking, Theoretical and Cytotoxic Investigation of New Pt(II) Complexes with 3'-methyl-tetrahydro-4*H*-thiopyranspiro-5'-hydantoin, Medicinal Chemistry Research, 2020
- Tirolski G, Bakalova A, Cherneva E, Synthesis, spectral, theoretical and pharmacological investigation of ester amides of squaric acid, XVI Scientific poster session for young scientists, PhD students and full-time students, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria, May 23, 2019
- Bakalova A, Buyukliev R, Michailova R, et al. Design, synthesis, theoretical and cytotoxic investigation of new Pt(II) complexes with 3-methyl-8-thia-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione, 7th Congress of Pharmacy with International Participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Cherneva E, Tomović K, Šmelcerović T, et al. 3-Methylthiocyclohexanehydantoine Pt(IV) and Pd(IV) complexes as novel potent xanthine oxidase inhibitor, 7th Congress of Pharmacy with International Participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019
- Cherneva E, Šmelcerović T, Tomović K, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of thiocyclohexanespiro-5'-hydantoine and 3-aminothiocyclohexanespiro-5'-hydantoine and their Pt(II) complexes, 7th Congress of Pharmacy with International Participation, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria, November 21-24, 2019

**Contract 85/2019    In silico and in vitro investigation of xanthine derivatives as inhibitors of MAOB enzyme**

**Research team:** Assist. Prof. Iva Vangelova Valkova, PhD

- Prof. Itini Doytchinova-Tzekova, DSci
- Assist prof. Mariana Atanasova, PhD
- Assist prof. Javor Mitkov, PhD
- Stanislav Sotirov, student

**Organization unit:** MU - Sofia. Faculty of Pharmacy. department of Chemistry

**RESULTS:** The aim of the project is to quantify the relationship structure-MAOB inhibitory activity of a series of caffeine-8- $\alpha$ -methyl thioglycolic acid derivatives. Additionally molecular docking is performed in order to identify the key ligand-receptor interactions. Permeability of the derivatives, via the gastrointestinal and blood-brain barriers, was determined to screen only those with promising pharmacokinetic profiles. In silico computational approaches have been used to develop linear models of structure-MAOB inhibitory activity by applying Hansch and Fudjita Ban methods. Molecular docking was performed to determine the preferred mutual orientation of the two structures and their most suitable conformations to form a complex. The results of the various in silico assays agree well and outline the guidelines for the design of new compounds with MAOB inhibitory activity. It has been clarified and confirmed in docking experiments that the presence of the S or O atom at the 8th position in the xanthine nucleus is important for the manifestation of the activity. Inclusion of a second oxygen atom in the side chain. leads to an increase in the polarity of the molecules, which is advantageous in view of the occurring dipole interactions at the binding site. Increasing the polarity of the molecules by extending the chain at C8 would allow for more interactions in the entrance cavity. The presence of a phenyl moiety as a substitute at the opposite end of the chain is important for the interaction with Ile197, which regulates the capacity of the binding pocket. The number and type of substituents in the benzene ring should also be refined in order to strike a balance between polarity and lipophilicity. The results of the in vitro permeability test showed that passive diffusion is a possible mechanism of transport in the gastrointestinal tract for only half of the compounds tested. With respect to blood brain permeability, all compounds showed values for  $pPe \geq 6$ , indicating an absence thereof. Based on these considerations, 10 new compounds were designed, containing sulfur as a bonding atom to the xanthine ring, six atomic semicarbazide or thiosemicarbazide chain and various terminal substituents.

**Scientific publications and presentations:**

- Valkova IV. Mitkov JI. Georgieva M et al. In silico analysis of monoamine oxidase B inhibitory activity of 8-substituted xanthine derivatives. Macedonian Pharmaceutical Bulletin vol. 66 (Suppl 1) 2020.

**Contract 89/2019    X-ray micro-computed tomography investigation of the adaptation of composite inlays to hard dental tissues fabricated by three different methods**

**Research team:** Prof. Radosveta Ivanova Vassileva, DMD, PhD

- Assoc. Prof. Janet Nikolova, DMD, PhD
- Assist. Prof. Viktoria Petrova-Pashova, DMD

**Organization unit:** Department of Conservative Dentistry, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the present study was to determine the marginal and internal adaptation of composite inlays to the internal surface of cavities fabricated by three different methods and examined by X-ray micro-computed tomography. Thirty MOD composite inlays were made on 30 extracted human premolars: n = 10 by standard laboratory technique, n = 10 by laboratory scanner and CAD/CAM technology, and n = 10 by intraoral scanner and CAD/CAM technology. After cementation of the constructions, a micro-computed tomographic examination was performed on all three groups. In terms of marginal adaptation and absolute marginal discrepancy, laboratory and CAD/CAM inlays made by using an intraoral scanner showed statistically significant better results compared to CAD/CAM inlays made by using a standard impression and a laboratory scanner. Regarding the internal adaptation, the constructions made by the layered composite material turned out to be the most accurate. The direct digitalization methods used for the fabrication of the specimens in group 3 presented better results in the accuracy of the restorations than the indirect digitalization – group 2. No significant difference was found in the values for the marginal gap and the absolute marginal discrepancy when comparing laboratory inlays with inlays fabricated with intraoral impression and CAD/CAM. From a clinical point of view, the three groups of indirect restorations demonstrated acceptable results and could be used in the clinical practice of the dental practitioner.

**Scientific publications and presentations:**

- Petrova V, Vassileva R, Kirilova J. Micro-CT evaluation of the adaptation of composite inlays. *Sylwan* 2020;164(4): 224-235.
- Petrova V, Vassileva R, Kirilova J. Influence of the impression techniques on the accuracy of dental restorations. *Medinform* 2020;7(1):1184-1189.

**Contract 90/2019 Investigation of the effect of irrigation solutions on root dentin microhardness and roughness**

**Research team:** Asoc. Prof. Emilia Goshova Karova, DMD, PhD

- Assist. Prof. Irina Tsenova-Ilieva, DMD

**Organization unit:** Dept. of Conservative Dentistry, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the current study was to investigate the effect of different irrigation protocols with or without ultrasonic agitation on root dentin roughness and microhardness. Changes in dentin roughness caused by various endodontic irrigants were observed on 40 upper incisors, whereas for the microhardness assessment we utilized 20 upper incisors. We used a negative control group for each of the experiments. After the initial preparation of the roots, the specimens were cut longitudinally into a total number of 120 root halves. All samples were polished and horizontally embedded into acrylic resin moulds, leaving the dentinal surface exposed. Atomic force microscopy was utilized for the evaluation of the dentin surface roughness in the nanometric scale. Some of the most representable samples were further processed by scanning electron microscopy. Dentin microhardness was evaluated by using Vicker's hardness tester. The comparison between the different irrigation regimens used for chemical disinfection of the root canal space demonstrated the ability of all tested irrigants to increase the roughness and significantly reduce the microhardness of root canal dentin. All the endodontic solutions increased the dentin roughness to a different extent depending on their concentration, time and mode of agitation. The application of all ultrasonically activated solutions led to significantly rougher dentinal surfaces. The experimental irrigation protocols

significantly reduced root dentin microhardness without statistical significance between them. Atomic force microscopy and Vicker's hardness method proved to be reproducible and reliable methodologies for the evaluation of the effect of various chemical agents on the biomechanical properties of root dentin such as its roughness and microhardness.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Tsenova-Ilieva I, Karova E. Application of atomic force microscopy in dental investigations. *Int J Sci Res.* 2020;9(3):1319-1326.
- Tsenova-Ilieva I, Karova E. Effect of endodontic irrigants on root dentin microhardness: a systematic review. *Int J Sci Res.* 2020;9(4):491-496.
- Tsenova-Ilieva I, Karova E. The effect of different irrigants with or without ultrasonic activation on root dentin microhardness. *J of IMAB.* 2021;27(2)
- Tsenova-Ilieva I, Karova E. Effects of endodontic procedures on the integrity of root canal dentin. 4<sup>th</sup> International Biomedical Congress – Sofia, Sofia, Bulgaria, 15 – 17 Nov 2019

#### **Contract 94/2019 Relationship between periodontal diseases and rheumatoid arthritis. Genetic polymorphism study of FcγRIIIA and examination of anti-citrullinated protein antibodies in saliva.**

**Research team:** Assoc. Prof. Theodora Nikolaeva Bolyarova-Konova, DDM, PhD

- Prof. Zlatimir Kolarov, MD, DSci
- Prof. Alexey Savov, MD, PhD
- Assist. Prof. Petya Yankova
- Assist. Prof. Lubomir Stefanov, DDM, PhD student
- Spasimir Pizarovski, student

**Organization unit:** Department of Periodontology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS: Aim:** To investigate the relationship between periodontitis (P) and rheumatoid arthritis (RA), based on the FcγRIIIA gene polymorphism determination in both diseases. Determination of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in saliva. 105 patients of average age 50.6 years (SD ± 13.07) have been involved in the study, divided into four groups: Group I – with P and osteoarthritis – 26; Group II – with P and RA – 28; Group III – with periodontal health and RA – 26; Group IV – with periodontal health, without RA – 25. Methods for RA and P diagnosis of were applied to all patients; serum concentration of rheumatoid factor (RF-IgM) and ACPA, and salivary concentration of ACPA was determined by ELISA. Oral mucosa epithelial cells were used for FcγRIIIa – genotyping, by nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR). We found that the heterozygous genotype – FcγRIIIa-158VF, male sex and the age, increased by one year amplified the risk of developing P, respectively (OR = 7.2 (1.4 – 37.3), (OR = 3.5 (1.1 – 11.3), (OR = 1.9 (1.3 – 27). The FcγRIIIa-158 genetic analysis did not reveal a common risk factor for P and PA. Patients with P had significantly higher salivary ACPA levels than healthy subjects; showed a significant correlation between salivary ACPA concentration and inflamed periodontal surface area; pocket depth; bleeding on probing. Patients with RA had significantly higher saliva ACPA levels than healthy subjects, showed a significant correlation between salivary ACPA levels and serum ACPA levels, serum RF levels and disease activity – DAS-28 (CRP). The established association between P measurements and salivary ACPA concentration confirms the effect of periodontal inflammation on this indicator and

justifies the treatment of P as a way of preventing and controlling RA. Salivary ACPA concentration may be considered an easily accessible indicator of RA, but further studies are needed to verify it.

**Scientific publications and presentations:**

- Bolyarova-Konova T, Stefanov L, Kolarov Z, et al. ACPA in Saliva and their Association with Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. Rheumatology. 2020; XXVIII(1)
- Stefanov L, Bolyarova-Konova T. Genetic aspects of the relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis. Bulgarian Medical Journal. 2020; XIV(1).
- Stefanov, L. Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis. Clinical, immunological, microbiological and genetic research. PhD thesis. Sofia, 2020.

**Contract 99/2019 Study of the role of IgG subclasses in the post-vaccine immune response to polysaccharide and protein antigens in the Bulgarian population**

**Research team:** Prof. Elisaveta Yordanova Naumova, MD, PhD, DSci

- Prof. Anastassia Mihaylova, PhD
- Assoc. Prof Snezhina Kandilarova, MD, PhD
- Assoc. Prof Petya Yankova MD
- Assoc. Prof Spaska Lesichkova, MD
- Nevena Gesheva, MD
- Valentina Atanasova- PhD

**Organization unit:** Department of clinical immunology, 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of this project is to study the T-independent post-vaccine immune response to polysaccharides (*S. pneumoniae* and *H.influenzae*) and the T-dependent response to protein antigens (diphtheria and tetanic toxoid) in age-stratified groups from the Bulgarian population and to compare with changes in IgG subclasses, immunization status, and clinical symptoms. The study included 210 individuals, divided into five age groups: 0-3 years, 4-5 years, 6-11 years, 12-16 years, 17-50 years, based on the vaccines received according the Immunisation Program Schedule of the Republic of Bulgaria. The results show age-related dynamics of the levels of immunoglobulin G and its four subclasses. The protective response to protein antigens decreases with age. The level of seroprotection is better for tetanus than for diphtheria toxoid at any age. In the younger age groups the protective titers to encapsulated pneumococcal polysaccharide antigens of IgG and IgG2 subtype are lower. In adults, the response to pneumococcal antigens is increased, possibly related to the natural immune response to serotypes in the environment. In conclusion, the present study provides a comprehensive assessment of the post-5 vaccine response to protein and polysaccharide antigens and its correlation with IgG subclasses and the clinical status of individuals. The results of this first on the Bulgarian population study provide substantial information on the level of protection against these antigens and allow to define individuals suspected of having an immune deficiency. In addition, the information received can serve for a personalized vaccine program for certain risk groups of the population.

**Scientific publications and presentations:**

- Naumova E. Primary immune deficiency- achievements and challenges. The Xth Jubilee Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs, 13-15.09.2019, Plovdiv

**Contract 104/2019 Study of the polymorphisms rs2279115 and rs956572 in the *Bcl2* gene as a factor for the development of dermatomyositis in adult patients**

**Research team:** Assoc Prof. Lyubomir Assenov Dourmishev, MD, PhD

- Prof. Radka Kaneva, PhD
- Maria Hristova, MD, PhD
- Radosveta Bozhilova, PhD student
- Joana Pozharashka, PhD student

**Organization unit:** Department of Dermatology and Venereology, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Altogether, 47 patients with dermatomyositis (16 males and 31 females) and 100 healthy controls (26 males and 74 females) were analyzed by real-time PCR. The genotype and allele distribution showed an association of the genotype rs956572 GG ( $p=0.04$ , OR 2, 95% CI 1-4.1) and the allele G ( $p=0.02$ , OR 1.8, 95% CI 1-3) with the development of dermatomyositis. When a superdominant model of analysis was applied, a higher frequency of the genotype rs2279115AC was observed among the control group ( $p=0.04$ , OR 0.5, 0.2-1). The conducted haplotype analysis demonstrated a higher frequency of the haplotype GA among the patients with dermatomyositis ( $p=0.07$ ). The obtained results revealed that the polymorphisms of the *Bcl2* gene influence the development of dermatomyositis in bulgarian patients.

**Contract 116/2019 Genetic screening for UMOD mutations in autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease**

**Research team:** Assoc. Prof. Maria Simeonova Gaydarova, MD, PhD

- Assist. Prof. Olga Beltcheva, PhD
- Kunka Kamenarova, PhD
- Assist. Prof. Stephka Tsocheva, MD
- Assist. Prof. Vasil Vasilev, MD

**Organization unit:** Dept. of Paediatrics, I Geshov 11 bul, Sofia 1606

**RESULTS:** The aim of the current project was to help for better understanding of the genetic etiology of tubulointerstitial kidney disease – a group of heterogenous renal disorders, with significant social impact, associated with acute and/or chronic tubular or interstitial inflammation. Next generation sequencing of 4 813 genes panel (TSO; MiSeq, Illumina, platform) was used for identification of potentially pathogenic genetic variants in four Bulgarian patients, three man and a woman. The analysis of the genetic data demonstrated the significant variability in the molecular pathology of the tubulointerstitial kidney disease. We identified genetic variants, with known or suspected pathogenic effect, in 4 genes– *SERPINA6*, *COL4A5*, *B3GLCT* and *PAX2*, coding respectively for corticosteroid-binding globulin (transcortin), the  $\alpha 5$  chain of type IV collagen, the glycosylation enzyme  $\beta$  1,3-glucosyltransferase and Paired Box Gene 2 transcription factor. Three of those were single-nucleotide polymorphisms resulting in changes in the amino acid sequence of the respective polypeptide chains and one was a deletion of an entire exon, possibly leading to synthesis of altered protein or the lack, thereof. The amino acid substitutions in *SERPINA6* and *COL4A5* have been described in the literature and are known to cause decreased corticosteroid binding activity of transcortin and X-linked Alport

syndrome, respectively. Additional studies will need to be carried out by our team in order to understand the effect of the newly described deletion in *B3GLCT* and the SNP in *PAX2* for the pathogenesis of the disease. The present study presented the first attempt to throw some light on the etiology of tubulointerstitial kidney disease in Bulgaria. We believe that our results will be of value for the treatment of the affected individuals and the genetic counselling of their families, and will contribute towards better understanding of the molecular mechanisms involved in the maintenance of the normal kidney function.

**Contract 148/2019 Molecular genetic analysis for mutation in the TERT, BRAF and NRAS genes in patients with papillary thyroid carcinoma**

**Research team:** Prof. Radka Petrova Kaneva, PhD - Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

- Assoc. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Romyana Dodova, PhD
- Assoc. Prof. Kalin Vidinov, MD, PhD
- Prof. Radina Ivanova – Boyanova, MD, PhD
- Inna Dimitrova, MD, PhD Student

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str. 1431, Sofia

**RESULTS:** Thyroid carcinoma is the most common type of endocrine cancer. Some somatic mutations in genes (such as *BRAF*, *NRAS* and *TERT*) involved in key signaling pathways and genome stability have been recently identified to play an important role in its development. However, very little research has been done on their frequency and clinical relevance in Bulgarian patients with papillary thyroid cancer (PTC). This study is focused on investigating somatic mutation frequency in Bulgarian patients with PTC and their association with clinicopathological features. The study included 58 PTC samples from Bulgarian patients analyzed for mutations in *BRAF* (V600E), *NRAS* (Q61K), the single nucleotide polymorphism (SNP) rs2853669 and *TERT* (C228T and C250T) genes by Sanger sequencing. The results were interpreted using Benchling and SeqScape software, and statistical analysis performed with SPSS. In the studied PTC group *BRAF* (V600E), *NRAS* (Q61K) and *TERT* (C228T) mutations were found with frequency of 29.31 %, 2% and 2%, respectively. Co-occurrence of both mutations, *BRAF* (V600E) and *TERT* (C228T) was found in 1 patient. The mutation C250T (*TERT*) was not detected. The SNP rs2853669 was found in 23 patients (51.1%). Correlation analysis with the clinical characteristics of the patients revealed statistically significant association with larger size of the tumour for *BRAF*(V600E) and smaller tumour size for rs2853669. In the current pilot study, we found that *BRAF* (V600E) and rs2853669 in *TERT* are common in PCT patients. Due to the potentially modifying role of rs2853669 on the activating mutations of *TERT*<sub>p</sub> and the combined effect of the *BRAF* and *TERT*<sub>p</sub> mutations on tumor aggressiveness, their effect should be assessed simultaneously in different tumours. More extensive molecular genetic analysis of *TERT*, *BRAF* or *RAS* mutations in larger sample is needed to further elucidate the clinically important diagnostic and prognostic biomarkers for thyroid cancer.

**Scientific publications and presentations:**



- Vidinov K, Dodova R, Mitev P, et al. Clinicopathological significance of BRAF (V600E), NRAS (Q61K) and TERT (C228T, C250T and SNP rs2853669) mutations in Bulgarian papillary thyroid carcinoma patients. *Endocrine Pathology* 2021;48(1).
- Dodova R, Mitev P, Mitkova A, et al. Analysis of BRAF, NRAS, TERT mutations in Bulgarian papillary thyroid carcinoma patients, EACR-OECI Joint Conference: Molecular Pathology Approach to Cancer: Lisbon, Portugal, 18-20 May, 2020

**Contract 52/2018 Correlation dependence between iron homeostasis parameters and IMT in sleep apnea patients****Research team:** Prof. Ognyan Borisov Georgiev, MD, PhD

- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Assist. Prof. Vencislava Pencheva-Genova, MD, PhD
- Assist. Prof. Radoslava Grozdanova, PhD - NCIPD
- Acad. of BAS Prof. Latchezar Traykov, MD, DSci
- Prof. Iulia Petrova, MD, DSci
- Prof. Kamen Tzatchev, MD, DSci
- Assoc. Prof. Savina Hadjidekova, MD, PhD
- Assist. Prof. Marieta Karadjova, MD, PhD
- Silviya Voleva - NCIPD
- Prof. Maria Nikolova, MD, PhD - NCIPD
- Assist. Prof. Georgi Angov, MD, PhD
- Assist. Iren Petrova-Ivanova, MD
- Todor Kunchev, PhD student

**Organization unit:** Department of Propedeutics of Internal Diseases, 1 G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** We quantified serum hepcidin levels in 35 patients with sleep apnea. We tried to find a connection to brain-vascular disorders. Established results were compared to number, age and gender matched healthy controls with no sleep apnea and atherosclerotic changes, proved by the same laboratory and functional analyses. Statistically increased serum hepcidin levels is found in sleep apnea patients ( $101.9 \pm 10.1 \mu\text{g/l}$ ) compared to healthy volunteers ( $18.5 \pm 2.5 \mu\text{g/l}$ );  $P < 0.001$ . Serum homocysteine is statistically increased in sleep apnea patients ( $29.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/l}$ ) in comparison to control group ( $1.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$ );  $P < 0.001$ . Serum vitamin B12 levels is decreased in patients with sleep apnea ( $71.7 \pm 9.9 \text{pmol/l}$ ) compared to controls ( $449.7 \pm 21.4 \text{pmol/l}$ );  $P < 0.001$ . Statistically increased atherosclerotic changes of parameters (IMT and ABI) is found in sleep apnea patients ( $1.22 \pm 0.19$  and  $1.71 \pm 0.14$ ) compared to healthy volunteers ( $0.34 \pm 0.07$  and  $1.11 \pm 0.06$ );  $P < 0.005$ . Evaluation of correlation between serum hepcidin levels and homocysteine shows  $r=0.849$ , with  $P<0.001$ . The level of decreased vitamin B12 serum concentrations in sleep apnea patients correlates negatively to hepcidin, as  $r=-0.844$ , with  $P<0.001$ . Quantified serum CRP concentrations in our patients additionally show the presence of systematic inflammation in obstructive sleep apnea patients ( $14.7 \pm 1.3 \text{mg/l}$ ). The connection between hepcidin levels and presence of plaques and ABI confirms peptide role in atherosclerosis development. The hormone plays important role cardio-vascular, brain-vascular and metabolic diseases progress. During our study we found positive correlation between serum hepcidin and ABI and IMT in sleep apnea patients, as  $r=0.913$  (for both parameters), with  $P<0.001$ . Increased homocysteine levels as long as decreased vitamin B12 concentrations correlate to cardio-vascular factors like hyper-cholesterolemia, arterial hypertension, diabetes mellitus, chronic cardiac insufficiency, and to IMT of blood vessels. Quantification of serum

hepcidin plays role as marker for early diagnostics of iron metabolism disorders, an important trace element that is involved in pathogenesis of atherosclerotic changes of stream vessels in sleep apnea patients.

**Scientific publications and presentations:**

- Manolov V, Georgiev O, Pencheva-Genova V, et al. Sleeping apnea changes IMT and FMT causing atherosclerosis. Int Conference on Biomarkers and Clinical Research. 30-31.01.2019, Abu Dhabi, UAE
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Evaluation of serum hepcidin concentrations in patients with obstructive sleep apnea. 11<sup>th</sup> International Conference on Vascular dementia. 15-16.02.2019, Amsterdam, Netherland
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. IMT, FMT, homocysteine and serum hepcidin in obstructive sleep apnea. BrainTech 2019. 04-05.03.2019, Tel Aviv, Israel
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Homocysteine, IMT and FMT correlates to iron homeostasis changes in obstructive sleep apnea patients. 5<sup>th</sup> International Conference on Neurology and Neurological Disorders. 04-05.03.2019, Amsterdam, Netherland
- Manolov V, Georgiev O, Pencheva-Genova V, et al. Serum hepcidin correlates to atherosclerotic a. carotis changes in obstructive sleep apnea patients. 3<sup>rd</sup> Annual Neuroscience in Intensive Care International Symposium. 08-09.03.2019, Washington DC, USA
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Serum hepcidin concentrations and atherosclerotic changes in patients with obstructive sleep apnea. 3rd World Nephrology Congress. 20-21.03.2019, Amsterdam, Netherlands
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Serum hepcidin correlates to IMT and FMT changes in obstructive sleep apnea. Haematology Summit-2019. 09-10.04.2019, Kuala Lumpur, Malaysia
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Atherosclerotic changes in patients with obstructive sleep apnea. 4<sup>th</sup> Edition of International Conference on Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 15-16.04.2019, Paris, France
- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Atherosclerotic changes of a. carotis and serum hepcidin in patients with obstructive sleep apnea. 2<sup>nd</sup> International Conference on Dementia & Dementia Care. 15-16.04.2019, Toronto, Canada

**Contract 63/2018 Status of trace elements and vitamin D in pregnant women with gestational diabetes mellitus**

**Research team:** Prof. Dobrin Avramov Svinarov, MD, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Bisera Atanasova, PhD
- Assoc. Prof. Marianka Petrova-Yanachkova, MD, PhD
- Irena Ivanova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Violeta Dimitrova, MD, PhD
- Yana Hristova, MD
- Assoc. Prof. Katia Todorova, MD, PhD - UMBAL “Dr. G. Stranski”- Pleven

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine

**RESULTS:** The main goal of the project: to study the alterations of vit D and essential trace elements iron, copper, zinc and selenium status in the relation to the effects of adipokines leptin and adiponectin in GDM. The study comprises 61 pregnant women ( $n_1=31$  with healthy pregnancy,  $25.9\pm 4.5$  gestational weeks and  $n_2=30$  with GD;  $26.87\pm 5.3$  gestational weeks). All included women are tested for 2-hours glucose-tolerance test with 3-fold glucose measurements by enzyme- amperometric principle; iron, copper and zinc levels are measured by flame atomic absorption and selenium-by electrothermal atomic absorption with Zeeman background correction; immune turbidimetry in use for CRP, ferritin, ceruloplasmin, transferrin, tandem mass-spectrometry TSQ Quantum (DiscoveryMax) for vit D3 and immunological ELISA method for leptin, adiponectin and hepcidin. Statistical significant differences for blood glucose are obtained for both tested pregnant groups:  $n_1$ : 0 min  $4.32 \pm 0.38$ ; 60 min-  $6.42\pm 1.48$ ; 120 min-  $5.1 \pm 1.2$  mmol/L and  $n_2$ : 0 min  $5.23 \pm 0.4$ ; 60 min  $8.57 \pm 2.29$ ; 120- $6.56 \pm 2.22$  mmol/L with  $P<0.01$ ;  $P<0.002$ ;  $P<0.02$ . The results for leptin, adiponectin, hepcidin, ser Fe, TIBC and vit D3 are as follows:  $n_1$ -  $23 \pm 13.3$  ng/ml;  $7.62 \pm 4.3$   $\mu$ g/ml;  $2.54\pm 0.46$  ng/ml;  $17.4\pm 5.9$   $\mu$ mol/L;  $75.6\pm 11.62$   $\mu$ mol/L;  $60\pm 22$  nmol/L and for  $n_2$ :  $31.74 \pm 24.7$  ng/ml;  $5.4\pm 1.41$   $\mu$ g/ml;  $2.81\pm 0.57$  ng/ml;  $15.01\pm 5.7$   $\mu$ mol/L;  $80.9\pm 11.0$   $\mu$ mol/L;  $52.7\pm 24.4$  nmol/L with  $P<0.02$ ;  $P<0.04$ ;  $P= 0.69$ ;  $P=0.07$ ;  $P< 0.04$ ;  $P=0.47/P<0.02$ ;  $P<0.04$ ;  $P= 0.69$ ;  $P=0.07$ ;  $P<0.04$ ;  $P=0.47$ . The study reveals ser Cu, Zn, Se and Cp for  $n_1$ -  $31.0\pm 4.09$ ;  $13.8\pm 3.6$ ;  $730 \pm 196$ ;  $0.59\pm 0.14$ ;  $3a$   $n_2$ -  $34.1 \pm 4.4$   $\mu$ mol/l;  $14.3 \pm 3$   $\mu$ mol/L;  $718 \pm 158$   $\mu$ mol/L;  $0.58\pm 0.08$  g/L with  $P<0.02$ ;  $P=0.61$   $P=0.83$ ;  $P= 0.7$ . GDM group is characterised with lower ser Fe values than healthy pregnancy in combination with significant increasing for TfSat% ( $P<0.016$ ) and no difference in hepcidin implying for iron deficiency. Significant differences between adiponectin and leptin in confirmation of hyperleptinemia as typical metabolic sign for GDM in Bulgarian population are established, with significant negative relation with iron for this pregnant group and highly positive correlation with vit D3 opposite to healthy pregnancy. Higher levels of vit D3 in healthy pregnant group could be due to pure adaptive physiological mechanisms. Highly increased serum Cu during pregnancy could be associated with increased affinity for binding copper ions to ceruloplasmin and stimulated by estrogens protein synthesis. The observed tendency for decreasing of Cu:Cp ratio could reflect the marginal depletion of copper labile pool because of stimulated transfer of copper ions to the fetus and increased by that synthesis of apoceruloplasmin. The ratio in GDM implies opposite combined effects of complex molecular mechanisms: from one hand physiological depletion because of pregnancy and from the other hand-increasing of the labile copper pool due to pregnancy insulin resistance, more pronounced in GDM. The ratio Cu/Zn, no significant difference between CRP and ser Se for both pregnancy groups are in confirmation for the lack of pregnancy pathology course with no manifestation of oxidative and inflammatory complications.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Genova M, Atanasova B, Ivanova I et al. Status na vitamin D pri sdravi bremenni geni. XI Nationalna konferencia po Klinichna laboratoria. Plovdiv. 27-29.09.2018. p-47
- Genova M, Atanasova B, Todorova-Ananieva K. In: Önal AE (Ed.), Body-mass index and health, vol. 2. IntechOpen, London, 2019, pp 19-53
- Ivanova I, Ivanova-Tododrova E, Kyurkchiev D et al. 25-OH Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> insufficiency in healthy subjects and patients with autoimmune disorders. 1<sup>st</sup> IFCC, EFLM, AFCB, FIFBCML CONFERENCE. ROME. 02-04.07.2018.
- Genova M, Atanasova B, Ivanova I et al. Copper, ceruloplasmin and copper:ceruloplasmin ratio in healthy pregnancy and gestational diabetes. 23<sup>rd</sup> IFCC-

EFLM European congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Barcelona. 19-23.05.2019

- Genova M, Atanasova B, Ivanova I et al. Copper levels, copper:ceruloplasmin ratio and body mass index in normal pregnancy and GDM. The 10<sup>th</sup> International Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome and Pregnancy. Florence. 29.05-01.06.2019.

### **Contract 86/2018    Implant provisionals as a prosthetic tool for peri-implant soft tissue management**

**Research team:** Prof. Andon Dimitrov Filchev, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Dimitar Filchev, PhD
- Assist. Prof. Neli Nikolova

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Dentistry, Department of Prosthetic Dentistry

**RESULTS:** Replacement of missing natural teeth with dental implants requires planned and precise manipulation of the peri-implant hard and soft tissues, guided by biological, functional and aesthetic criteria. The use of implant provisionals with a suitable transmucosal profile is necessary not only to sculpt the supra-implant soft tissues, but also to ensure their stability over time, and from there to the entire implant prosthesis. The aim of the article is to present: 1) prosthetic map of implant dental treatment, which aims to systematize and archive the detailed information concerning the prosthetic aspect of implant treatment, 2) detailed planning and fabrication of an individual temporary implant restorations, 3) creation of an optimal supra-implant soft tissue architecture. A survey about peri-implant soft tissues (PIST) was carried out among 31 dental practitioners experienced in implantology. Opinions were expressed about the significance of their specific characteristics in the creation of the implant supra-structure. A practical test for recognition of specific characteristics was performed by four dentists with a different level of experience in implant-supported prosthodontics, who have been thoroughly informed and instructed how to report the PIST status parameters in 10 implant sites. Manufacturing of 20 screw-retained implant provisionals following a specially developed clinical and laboratory protocol. A prosthetic map was created with the following sections containing: 1) personal data with brief information about the patient, 2) information about the implant, 3) information about peri-implant alveolar bone, 4) information about PIST, 5) information about the planned implant restoration, 6) information about follow-up examinations. The achieved implant provisional/ soft tissue configuration demonstrates stability for a monitoring time of 3months and proved the effectiveness of the applied methodology. The organization and formatting of the map allows very accurate marking of all data important for the implant prosthetic treatment and their follow-up over time. The Prosthetic implant map can be used as a guideline for implant supra-structure planning. From a practical point of view, it is a very convenient way of storing all the necessary information and its subsequent analysis for both clinician and patient. The described workflow for implant provisionals and PIST management is easy, accurate, predictable and usable by a wide range of dental practitioners.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Nikolova N, Filchev D, Filchev A. Prosthetic Implant Map (PIM) –Accurate and Convenient Assistant in Successful Implant Treatment. Journal of IMAB. 2020; 26(1)

- Nikolova N, Filchev D. Method for provisional implant supra-structure creation and transference. Infodent. 2019; 3

**Contract 90/2018    Development of a protocol for assesement of extraoral status of orthodontic patients by using photo analysis and database for orthodontic archive**

**Research team:** Assoc. Prof. Miroslava Miletı Dinkova, DMD, PhD

- Neli Dilkova, DMD
- Assist. Prof. Martin Mariyanov, DMD, PhD
- Assist. Prof. Viktoriya Gurgurıeva-Ivanova, DMD, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of dental medicine

**RESULTS:** Creation of a protocol for assessment of the extraoral status of orthodontic patients by using photo analysis and a database for the orthodontic archive. A total of 105 patients, distributed as follows: 32 mixed-dentition patients, 38 growing patients with permanent dentition (12 – 18 years old) and 35 adult non-growing patients (19 – 45 years old) were examined. In these three groups changes of the main parameters were tracked. 60 patients between the age of 16 and 45 were examined to study the statistical correlation between left and right profiles. All patients underwent clinical, biometric, cephalometric (profile cephalometric x-ray, orthopantomography) and photographic orthodontic analysis. Full photographic documentation was done - extraoral (frontal view; frontal view – smile, profile – left and right, oblique facial view with and without a smile) and intraoral photos. We developed a protocol for a profile photo in 5 steps and a method for analysis, including 3 linear and 5 angular measurements. We found significant changes in the lower facial height, the angle of complete soft tissue convexity, the frontonasal and nasolabial angle from mixed to permanent dentition in the studied groups. We found the amount of correlation between left and right profiles. A complete coincidence of the measured parameters was observed in 30.36% of the studied patients. In 42.86% there is a difference of  $\pm 1$ cm and  $\pm 2^\circ$ . In 26.79% the difference is more than  $\pm 1$ cm and  $\pm 2^\circ$ . The method allows comparison between left and right profiles of the studied patients and evaluation of the amount of symmetry. This will help the standardization of the diagnostic methods and establishment of standards and rules for good orthodontic practice. The proposed method for analysis of profile photo is clinically applicable and allows the diagnosis, planning, monitoring and evaluation of the orthodontic treatment.

**Scientific publications and presentations:**

- Dinkova M, Dilkova N, Mariyanov M, et al. Assesement of extraoral status of orthodontic patients on profile photograph, Orthodontic review 2019;21(1):13-21.
- Dilkova N, Dinkova M, Comparison between left and right profiles by using extraoral photo analysis”, SIDO Congress, Rome, Italy, 10-12.10.2019

**Contract 91/2018    Epidemiology of malocclusions and assesment of the different treatment approaches of dental students and residents at FDM-Sofia for period of 5 years**

**Research team:** Assoc. Prof. Dr. Greta Roussanova Jordanova-Kostova, PhD

- Assis. Prof. Dr. Viktoria Gurgurıeva-Ivanova, PhD
- Dr. Aishe Vechova

- Dr. Lilia Angelova
- Mario Grancharov, student
- Sibela Sandeva, student
- Velina Milucheva, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine

**RESULTS:** The goal we set up is to create a system for a long-term monitoring of the orthodontic deformations' incidence, archivation and classification of patients' diagnostic information, introducing new lectures and seminars to increase the clinical competence of students and specialists corresponding to these deformations. The study included 661 patients with an exact documentation, treated in the Department of Orthidic by the postgraduates - 365 and by students - 296. The patients are divided into subgroups by type of dentition and stage of treatment. The methods of differentiation, classification and frequency of different orthodontic deformations, the stages of their treatment and differences in treatment approaches have been applied. We found that the most common orthodontic deformation was the distal bite (55.20%), followed by a deep bite (48%), crossed in the front (11.6%) and a lateral area (15%), a medial bite (9.1%). The diagnosis of the most of these deformations requires paraclinical (radiological) prove, which makes the clinical epidemiological methods inaccurate. It was found that in a significant percentage of the treatments of these patients, the treatment methods and techniques used were not taught in the curricula. These are new appliances (MIA, Pendulum, FROG, Twin block, etc.) that are widely used in our treatments due to the high competence of the leading medical trainers but are not entirely theoretically known to students and specialists. The curriculum does not include a seminar preparation for a SSTC study, and this is required for patients with retained teeth who are 12.9% of all treated in the study. The study concluded that several treatments were conducted but in one growth period (mainly puberty), which reduced the duration of orthodontic treatment. The data from our study requires complementing and adapting curricula with new themes and clinical activities. Analyzing actual data on the incidence of orthodontic deformations is the basis for their prevention.

**Scientific publications and presentations:**

- Yordanova G, Gurgurieva V. Research of the most common malocclusions among the treated patients by students and post-graduate students in FDM-Sofia. Orthod. Review. 2018; 20(2):16-26.
- Yordanova G, Mladenov G, Gurgurova V, Gurgurieva V. Assessment of Treatment Phases of Class II Malocclusion Treatment. IJSR, 2019; 8(2): 43-46.
- Mladenov M, Gurgurieva V, Yordanova G. Effects of the Twin Block appliance in distal bite treatment in students education programs. Poster presentation, 2-d Scientific Congress "Science and Practice- hand in hand" 12-13.04.2019, Plovdiv

**Contract 92/2018      Creation of software product for digital data analysis when operating the face bow „Face bow Mini-Maxi**

**Research team:** Assoc. Prof. Zhanina Stamova Pavlova, MD, PhD

- Prof. Andon Filtchev, MD, DSc
- Assist. Prof. Anton Tumbalov, MD

**Organization unit:** Dept. of Prosthetic Dental Medicine, 1 G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The objective of the study is to create computer program for the achievement of precise digital data processing of records performed with the face bow “Face-bow Mini-Maxi” and the facilitation of information transfer to the articulator. A conceptual project was developed in order to create a new software product and requirements were defined towards its capacities, which are to provide guidance for its creation. With the assistance of computer programmer, the project was implemented. The program was tested through processing the data of 101 participants (52 men and 49 women). With the aid of the “Face-bow Mini-Maxi” was registered the sagittal condylar pathway, on the left and on the right, and was defined mandible’s central position via intraoral graphic registration. The data of each and every participant were imported in the program and was calculated the individual values of the registered parameters. Then was performed comparative statistical analysis of the data resulting from the conventional manual measurement and these established via the computer program. The computer program “Facebow Mini-Maxi Analyzer” was created. The program provides automatic recognition, reading, calibration and measurement of data recorded by “Facebow Mini-Maxi”. The main module gives us opportunities for measuring the values of: the sagittal condylar pathway, respectively, left and right; the arrow point angle, obtained by intraoral graphic registration and the length of the averaged horizontal hinge axis. After finalizing the calculations, the software automatically generates a scheme with visualization of the parameters that significantly supports the dental technician when it comes to defining the accurate position of the cast models when including them in the articulator. The average values of important parameters for the prosthetic treatment were obtained through this research: the length in mm of the auricular axis - 117.54 mm, the condylar axis - 138.13 mm; the averaged horizontal hinge axis - 127.41mm; the condylar sagittal pathway, respectively on the left - 35.86° and on the right - 34.89°; the size of arrow point angle - 107.52°. The computer program provides accurate analysis of facebow records. The comparative analysis between conventional and digital measuring approach on the accuracy of determined parameters by the program showed high product reliability. The software allows maintenance of rich database scientific research.

**Scientific publications and presentations:**

- Tumbalov A, Filtchev D, Pavlova Zh, Filtchev A. Length of the auricular, condylar and averaged horizontal hinge axis. Dental Medicine, 2018
- Pavlova Zh, Tumbalov A, Filtchev A. Computer program for digital data analysis of facebow records. Part 1. Acta Medica Bulgaria 2020;47(1):36-44.
- Pavlova Zh, Tumbalov A, Filtchev A. Computer program for digital data analysis of facebow records. Part 2. Examination of a sagittal condylar pathway and an arrow point angle. Acta Medica Bulgaria 2020;47(2):12-17.
- Pavlova Zh, Tumbalov A, Filtchev A. Computer program for digital data analysis of “Facebow Mini-Maxi”. 24<sup>th</sup> BAASS Congress, May 9-11, 2019, Tirana, Albania, PP 337

**Contract 103/2018 Bone markers and cardiovascular risk factors in polycystic ovarian syndrome**

**Research team:** Antoaneta Gateva, MD, PhD

- Prof. Zdravko Kamenov, MD, DSci
- Adelina Tsakova, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia



**RESULTS:** FGF23 and Klotho are extensively studied in relation to bone metabolism and progression of chronic kidney disease. There is very limited information about their role in polycystic ovarian syndrome (PCOS). The aim of the present study was to investigate some bone markers (FGF23, Klotho, Osteopontin, RANKL, vitamin K2, 25(OH)D) in women with PCOS in relation to obesity and CVD risk. In the present study were included 80 patients, divided into three age-matched groups - Nonobese PCOS (n=40); Obese PCOS (n=20) and Obese control group (n=20). Anthropometric measurements and biochemical tests, were performed. Bone markers (FGF23, Klotho, Osteopontin, Vitamin K2 and RANKL) levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Obese PCOS patients had higher levels of FGF23 and sRANKL, lower levels of 25(OH)D and higher prevalence of vitamin D deficiency compared to nonobese subjects. Patients with abdominal obesity (waist circumference > 80 cm) had significantly higher levels of FGF23 ( $112.5 \pm 86.5$  vs.  $73.4 \pm 37.9$  pg/ml;  $p=0.023$ ) and lower of 25(OH)D ( $35.8 \pm 21.4$  vs  $47.8 \pm 26.5$  nmol/l;  $p=0.034$ ). Patients with PCOS at risk of cardiovascular diseases according to AE-PCOS consensus also had increased levels of FGF23 ( $111.6 \pm 84.5$  vs.  $66.5 \pm 35.1$  pg/ml;  $p=0.031$ ) and decreased levels of 25(OH)D ( $31.9 \pm 16.8$  vs.  $47.1$  vs  $28.4$  nmol/l;  $p=0.017$ ) compared to those not at risk. No such difference was found for the other studied bone markers. Vitamin K2 levels showed a tendency towards higher levels in women without obesity, although without statistical significance. There was no difference between women with and without abdominal obesity or increased cardiovascular risk. There was no correlation between bone markers and blood glucose levels, insulin resistance or hormonal levels except from the weak negative correlation between 25(OH)D and testosterone. In conclusion FGF23 and 25(OH)D levels in patients with PCOS are related to abdominal obesity and cardiovascular risk.

**Scientific publications and presentations:**

- Gateva A, Tsakova A, Hristova J, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and 25(OH)D levels are related to abdominal obesity and cardiovascular risk in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecological endocrinology*. 2019 2019 Nov 10:1-4.

**Contract 104/2018 Serological and molecular genetic studies on the involvement of hepatitis E virus in the pathogenesis of neurological diseases**

**Research team:** Prof. Ivailo Ljudmilov Tarnev, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Sashka Zhelyazkova, MD, PhD
- Tencho Tenev, MD – NCIPD
- Assist. Prof. Elitsa Golkocheva-Markova, PhD – NCIPD
- Assoc. Prof. Evelina Shikova, PhD – NCIPD

**Organization unit:** Neurology department, Clinic of Neurology, University Hospital Alexandrovska

**RESULTS:** The aim of the present study was to determine the involvement of hepatitis E virus in the pathogenesis of inflammatory diseases of the central and peripheral nervous systems, such as Guillen-Barre syndrome, neural amyotrophy, and meningoencephalomyelitis. Blood serum specimens and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with neurological symptoms were examined to achieve this goal. Antibodies against HEV (anti-HEV IgM and IgG) in serum samples were demonstrated by the use of immunoassay methods - ELISA. All samples were tested for the presence of antibodies and for infection with other hepatotropic viruses, cytomegalovirus and

Epstein-Bar virus for the purpose of accurate selection of the target population and detection of patients with co-infections and viral infections giving false positive results using false positives tests for the detection of antibodies against HEV. Serum samples and CSF were further tested by real-time polymerase chain testing to determine the viral concentration of HEV. Of the 40 patients enrolled in the study, 21 (53%) tested positive for HEV antibodies, with 8 (40%) positive for anti-HEV IgM and anti-HEV IgG. Only in one anti-HEV IgM and IgG positive patient demonstrated HEV RNA in serum at a concentration of 115 [IU / ml]. Also tested for the presence of HEV RNA were 12 CSF, none of which gave a positive result. HEV-positive patients are characterized by a predominant neurological symptomatology and poorly displaced serum biochemistry. The predominantly chronic form of Guillen-Barre with moderate severe involvement of the sensory-motor nerves were identified. Maintenance Immunovenin therapy was applied in all patients and complete recovery was achieved in only one patient with a serological profile of acute HEV infection. Cross-reactivity was established in one patient with respect to CMV. From the results obtained, it can be concluded that timely diagnosis of HEV infection, as a causative agent of neurological symptoms, is crucial for the administration of adequate treatment and hence for the achievement of therapeutic success in the respective patients.

**Scientific publications and presentations:**

- Golkocheva-Markova E, Zhelyazkova S, Tenev T, Eet al. The role of hepatitis E virus in pathogenesis of neurological disorders. Med. Pregled / Med. Review., 2019; 55 (3): 19-23.

**Contract 105/2018 Organokines in men with late-onset hypogonadism and metabolic syndrome**

**Research team:** Prof. Zdravko Asenov Kamenov, MD, PhD, DSci

- Assist. Prof. Yavor Assyov, PhD
- Assist. Prof. Antoaneta Gateva, PhD
- Tsvetan Gatev, PhD Student
- Assist. Prof. Adelina Tsakova, PhD
- Assist Prof. Vera Karamfilova, PhD student
- Iveta Nedeva, PhD student

**Organization unit:** Dept. of Internal Diseases, University Hospital “Alexandrovska”

**RESULTS:** Late-onset hypogonadism is a clinical and a biochemical syndrome, dependent on age, characterized by reduced libido, erectile dysfunction, increased fat mass, and reduced muscle mass. The benefits of testosterone-replacement therapy are well established, but the mechanisms underlying this associations are not fully elucidated. A potential explanation might be hidden within the concept that striated muscles and the fat mass secrete humoral factors, called organokines, whose levels might fluctuate in tandem with the treatment and communicate with various organs and systems. In the current study, we have evaluated 40 men with late-onset hypogonadism and metabolic syndrome in the basal state and in the course of testosterone-replacement therapy for the changes observed in the metabolic and anthropometric parameters in our patients, as well as in the circulating levels of various organokines: leptin, adiponectin, resistin, visfatin, omentin, chemerin, vaspin, irisin and myostatin. Testosterone-replacement therapy has led to a statistically significant improvement of body composition, general well-

being and sexual function and was not related to any particular side effects. With regards to the evaluated organokines, the treatment was associated with a statistically significant increase in circulating irisin and myostatin levels and a decrease in serum resistin, after adjustment for potential confounding factors. Among the correlations of importance, we observed were a positive correlation of serum chemerin with BMI, waist circumference and serum leptin; a negative correlation of serum irisin with hepatic enzymes, uric acid and serum resistin and a positive correlation of serum irisin with serum testosterone, serum leptin, questionnaire-measured every-day physical activity and fat free mass as measured by impedance. Further, trials are needed to elucidate the potential physiological mechanisms underlying the observed associations.

### **Contract 106/2018 Nasopharyngeal microbiome in children with chronic pulmonary diseases**

**Research team:** Assist.Prof Iren Stoyanova Tzotcheva, MD, PhD

- Assoc. prof. Guergana Stoyanova, MD, PhD
- Snezhana Parina, MD
- Prof. Penka Perenovska, MD, PhD
- Assoc. prof. Rayna Gergova, MD, PhD, MU
- Snezhina Lazova, MD, PhD - UMHATEM “Pirogov”

**Organization unit:** Department of pediatrics, 1 G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** For accomplishment of the project goals for a period of 6 months (april-september 2018) we included 144 children divided in 4 groups: 42 children with bronchial asthma (BA), 34 with chronic wet cough (CWC), 38 with bronchiolitis and bronchitis (AB) and 20 healthy children (HC) as a control. We collected serum, nasopharyngeal and deep throat swabs from specific pathogen detection (culture examination, PCR, ELISA). In the HC we didn't identify any pathogens in the throat samples. In 20% of the nasal swabs we cultured *Staphylococcus aureus*. In 33% of the patients from the AB group we found only viruses (RSV, hRV and hMPV), in 25% we found combined infection with virus and bacteria (mainly *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae*). The BA group in 25% we found only viruses (Adenovirus, hRV and RSV). In 56% of the cases *Streptococcus pneumoniae* was confirmed in the throat swabs vs. only 33% for isolated *Moraxella catarrhalis*. Only in 10% of the CWC group we found viral infection (hMPV, Adenovirus and RV), 50% had *Streptococcus pneumoniae* and the rest 40% - polymicrobial etiology incl. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*. One fifth of the healthy children are carriers *Staphylococcus aureus*, for which antibiotic therapy is not required. For immunocompetent children outside winter seasons the most common infectious cough triggers are *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, hRV, RSV and Adenoviruses and this should be noted and antibiotic therapy could be postponed. In case of CWC at least biweekly antibiotic therapy in adequate doses is obligatory.

**Scientific publications and presentations:**

- Petrova G, Miteva D, Papochieva V, et al. Chronic wet cough in childhood. GPNews, 2018, vol 10: 7-10
- Tzotcheva I, Lazova S, Perenovska P, S. Parina, B. Georgieva, G. Petrova. Role of the lung microbiome for respiratory health. GPNews, 2018, vol.10: 39-42

- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Infectious Pathogens That Could Trigger Cough in Children outside Winter Epidemic Season. *Annals of Microbiology and Infectious Diseases* 2019, vol 2(1): 52-57.
- Georgieva B, Gergova R, Tsitou V-M, et al. Infectious pathogens that could trigger cough in children outside winter epidemic season, *Nauka pulmologia* 2019, vol 1 (50): 12-17
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Protracted bacterial bronchitis in childhood, *Prakticheska pediatria* 2019, in press
- Georgieva B, Gergova R, Tsitou V-M, et al. Infections and chronic wet cough in children poster presented at 20<sup>th</sup> Jubilee National Conference for GP and pediatricians, Sunny beach – 23-26 May 2019
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Bacteria and viruses that trigger cough in children outside epidemic seasons, poster presented at 18<sup>TH</sup> International Congress on Pediatric Pulmonology – 27-30 June 2019; Chiba- Tokyo, Japan
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Chronic and acute infectious triggers in immunocompetent children, poster presented at 37<sup>TH</sup> Annual Meeting Of The European Society For Paediatric Infectious Diseases – 6-11 May 2019; Ljubiana, Slovenia

**Contract 107/2018 Dynamic picture of the respiratory pneumococcal infections in children after introduction of routine pneumococcal vaccination in Bulgaria**

**Research team:** Assoc. prof. Guergana Petrova Stoyanova, MD, PhD

- Snezhana Parina, MD
- Prof. Penka Perenovska, MD, PhD
- Prof. Lena Sechanova, MD, PhD, DSci, MU
- Svetomira Bijeva, MD
- Assist. Prof. Yulia Marteva-Proevska MD
- Assoc. prof. Tzvetan Velinov, MD, PhD
- Iren Tzotcheva, MD, PhD –UMHATEM “Pirogov”
- Snezhina Lazova, MD, PhD –UMHATEM “Pirogov”

**Organization unit:** Department of pediatrics, 1 G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** For a period of 3 years (from December 2015 through November 2018) we evaluated 285 immunocompetent children hospitalized with radiographically confirmed pneumonia. We specifically looked for prior antibiotic use and immunization status. The laboratory data included – CRP, full blood count, sputum culture examination, PCR and/or serology for respiratory viruses, Chlamydia and Mycoplasma. In 44.9% of the cases we couldn't prove etiological agent, bacteria were confirmed in 41.6% and viruses in 16.2% (in 4.6% - co-infection). For the prior antibiotic use, we couldn't find any significance for etiological confirmation ( $p=0.36$ ) but for *Streptococcus pneumoniae* ( $p=0.015$ ). As expected *Mycoplasma* was isolated in older children and mainly in summer/autum season, while *Streptococcus* was mainly isolated in younger ones with no specific seasonal peak. Mean age for children with bacterial pneumonia was 6.54 years, for the ones with viral pneumonia 4.34 yrs., and for combined (viral+bacterial) 3.08 yrs. ( $p=0.000$ ). Almost 2/3 of the children have been immunized with pneumococcal vaccine (66%). The immunized patient had higher numbers of viral and lower of bacterial isolates 25.7% and 37.23% vs. non-immunized ones – 4.12% and 48.45%

respectively ( $p=0.002$ ). There was no difference in *Streptococcus pneumoniae* isolation and vaccination status, but there was a major drop in *Mycoplasma* isolates in vaccinated ones (6.9% vs. 32.98%,  $p=0.000$ ). In future we could expect more viral pneumonia with increasing of the vaccination coverage and maybe we should reevaluate our treatment guidelines.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Petrova G, Tzotcheva I, Lazova S, et al. Pneumococcus and infections of respiratory tract. *Nauka pulmologia* 2018, vol 3 (48): 21-28
- Petrova G, Miteva D, Parina S, et al. Etiological profile of community acquired pneumonia in hospitalized children in Bulgaria in the era of the pneumococcal vaccine. *Lung Breath J* 2019;3(1):1-5
- Petrova G, Miteva D, Perenovska P, et al. Etiological profile of community acquired pneumonia in hospitalized children in Bulgaria in the era of the pneumococcal vaccine. *Nauka pulmologia* 2019;1(50):4-10
- Georgieva B, Gergova R, Tsitou V-M, et al. Infectious pathogens that could trigger cough in children outside winter epidemic season. *Nauka pulmologia* 2019;1(50):12-17
- Petrova G, Perenovska P, Miteva D, et al. Etiological profile of community acquired pneumonia in hospitalized children in Bulgaria. *Prakticheska pediatria* 2019
- Georgieva B, Gergova R, Perenovska P, et al. Infectious Pathogens That Could Trigger Cough in Children outside Winter Epidemic Season. *Annals of Microbiology and Infectious Diseases* 2019;2(1):52-57.
- Miteva D, Perenovska P, Elencheva E, et al. Effect of previous antibacterial use on the etiological profile community acquired pneumonia in hospitalized children poster presented at 20<sup>th</sup> Jubilee National Conference for GP and pediatricians, Sunny beach – 23-26 May 2019
- Petrova G, Parina S, Miteva D, et al. Etiological profile of pneumonia in hospitalized children – effect of the pneumococcal vaccine poster представен на 18<sup>TH</sup> International Congress on Pediatric Pulmonology – 27-30 Jun 2019; Chiba- Tokyo, Japan
- Petrova G, Miteva D, Parina S, et al. Seasonal variations of etiology of pneumonia in hospitalized children in Bulgaria, 37<sup>th</sup> Annual Meeting Of The European Society For Paediatric Infectious Diseases – 6-11 May 2019; Ljubljana, Slovenia

#### **Contract 108/2018 Hormonal status and change in bone metabolism in patients with obstructive sleep apnea and metabolic syndrome and effect from treatment with non-invasive ventilation**

**Research team:** Prof. Daniela Stoichkova Petrova-Nikolova, MD, PhD

- Prof. Ognian Georgiev, MD, PhD
- Assist. Daniela Miletieva, MD
- Assist. Adelina Tzakova, MD
- Assist. Radoslav Bilyukov, MD, PhD
- Assist. Tzanko Mondeshki, MD
- doc. Vencislava Pencheva-Genova, MD, PhD
- Assist. Sevda Naydenska-Grudkova, MD
- Assist. Petko Shshkov, MD

- Assist. Martin Nikolov, MD

**Organization unit:** Department of Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology

**RESULTS:** The syndrome of obstructive sleep apnea (SOSA) is related with disregulation of the circadian rhythm of different hormones. The results from its influence to the bone metabolism are different. Treatment with CPAP makes changes in the hormonal and bones metabolism. The goal is to research the markers of bone metabolism in patients with recently diagnosed sleep apnea and to track the bone markers after the beginning of treatment with CPAP between 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month. There are 100 patients with recently diagnosed sleep apnea (82 men, 18 women) and 22 healthy people (8 men, 14 women) involved. Their bone markers are tracked between 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> month after the beginning of treatment. Anthropometric and blood researches. Polisomnography, rating of sleep during daytime with ESS are made. Osteodensytometry is made to 41 patients with SOSA and 10 healthy ones, the fracture risk is calculated with FRAX, based on the clinical risk factors of osteoporosis. Patients with medium and high degree of OSA have very high results on BMI, visceral fats and diameter of the neck. Results from ESS show a big difference between OSA and the control group. High level of OSA is related with longer lasting saturation under 90% and high deficit of vitamin D. Treatment with CPAP affects positively the remodeling of bones with dominating forming of them. Low levels of 25 (OH) D are related to longer lasting of the saturation under 90%. SOSA is a risk factor for secondary osteoporosis and higher fracture risk for both sexes. The compact tubular bone are more affected. Screening for osteoporosis is recommended for patients with SOSA. The data can be compared in the Web. Results confirm the connection between levels of vitamin D, the status of sleep apnea and the treatment with CPAP.

**Scientific publications and presentations:**

- Krasimirova D, Bilykov R, Nikolov M, et al. Disturbance in bone metabolism in patients with obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome. Thoracic medicine 2018;10(3):32-49
- Krasimirova D, Bilykov R, Nikolov M, et al. Disturbance in bone metabolism in patients with obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome. Thoracic medicine 2018;10(4):22-33
- Krasimirova D, Petrova D, Georgiev O, et al. Parametres of bone metabolism of patients with syndrome of obstructive sleep apnea and the effecte after one year of treatment with non-invasive ventilation- Thoracic medicine 2019;11(2)

**Contract 110/2018 Radiation lesions of the gastrointestinal tract after radiation treatment - assessment of the severity of the disease and definition of a therapeutic approach**

**Research team:** Prof. Borislav Georgiev Vladimirov, MD

- Prof. Lilya Gocheva-Petkova, MD
- Vaska Vasileva-Kodeikh, MD
- Assoc. Prof. Plamen Penchev, MD
- Stanislava Keremidchieva-Hristova, MD
- Radislav Nakov, MD
- Nadya Nakova, MD
- Plamen Getsov, MD

- Miroslav Novoselski, MD
- Stephanie Chakarova, MD
- Spaska Kovacheva

**Organization unit:** Department for Radiology and Imaging Diagnostics at the University Hospital "Tsaritsa Yoanna-ISUL"

**RESULTS:** This study included 25 patients with acute and chronic radiation-induced lesions of the gastrointestinal tract— 10 men, 15 women, mean age 65.60g (44-84), referred for video colonoscopy to the Gastroenterology Clinic at the Queen Joanna - ISUL between May 2018 and October 2019 and 50 healthy controls (mean age 40.45g). All underwent ileocolonoscopy, evaluated clinical activity on the RTOG / EORTC scale, performed full laboratory tests, and fecal calprotectin was examined by rapid quantitative immunochromatography (Quantum Blue® Calprotectin). In ROC analysis, a cut-off value of 85 microg / g distinguished post-LL patients from healthy controls with 61% sensitivity and 100% specificity in the area under the curve (AUC 0.745, 95% CI, 0.579-0.912). There was a statistically significant difference between the PKP values of controls and patients after treatment (Mann-Whitney non-parametric test, U = 167, Z = -2.948, p = 0.003). No correlation was found between fecal calprotectin and ESR, fecal calprotectin and WBC (fecal calprotectin and ESR - no significant correlation (p = 0.298); fecal calprotectin and WBC- no correlation (p = 0.497)). No correlation was found between the severity of clinical symptom scores assessed by RTOG / EORTC and fecal calprotectin (fecal calprotectin and EORTC - no correlation (p = 0.921)).

**Scientific publications and presentations:**

- Keremidshieva-Hristova S, Penchev P, et al. Radiation Colitis and Proctitis-Participation at the IV National Congress of Young Gastroenterologists, Sofia, University Hospital "Tsaritsa Yoanna-ISUL", Medical University, Sofia 23-24.03. 2018
- Keremidchieva S, Penchev P, Nakov R, et al. Fecal calprotectin - non-invasive method for evaluation of patients with radiation lesions of lower GIT - participation of the V National Congress for Young Gastroenterologists, Sofia, University Hospital "Tsaritsa Yoanna-ISUL", Medical University-Sofia, 29-31.03.2019
- Keremidchieva S, Penchev P, Nakov R, et al. Radiation colitis and proctitis; clinical case poster, First European Conference of Young Gastroenterologists, Zagreb, Croatia, 6-9.12.2018

**Contract 111/2018 Quantification of ischemically modified albumin in serum and study its importance as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with transient ischemic attack (TIA) and hemorrhagic / ischemic stroke**

**Research team:** Prof. Evguenia Vassileva Roustcheva, DSci

- Naira Muradian, MD
- Marina Krasteva, MD

**Organization unit:** Department of neurology, Bialo more 8, 1527, Sofia

**RESULTS:** The aim of our project was to study the diagnostic value of ischemia-modified albumin (IMA) in patients with acute ischemic stroke by investigating the association between blood levels of IMA and severity of neurological deficit, as well as to follow its dynamics over time. We enrolled a total of 67 consecutive patients (33 male и 34 female) with acute ischemic stroke (at mean age of 71.7±12.7 SD), admitted to the Neurology department between August

1st, 2018 and February 17th, 2019. The diagnosis of ischemic stroke was established by expert clinicians, based on the initial clinical history and presentation and was confirmed by computed tomography (CT), assessed with Alberta stroke programme early CT (ASPECT) score. Stroke severity was evaluated according to the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS). All patients underwent an extensive workup including a color-coded duplex sonography, 12-lead-electrocardiography (ECG), transthoracic echocardiography and Holter ECG monitoring. Serum levels of IMA were measured within 12 hours of stroke onset in all patients. In addition, IMA was measured once more within 72 hours after onset in 43 patients. All blood samples were stored at -80°C until used. Measurement of IMA was based on sandwich enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) technology. Results demonstrated an association between severity of neurological deficit, defined by the NIHSS scale and blood levels of IMA, measured within 12 hours of acute stroke onset (Spearman 0,466) ( $p < 0.001$ ). Furthermore, the IMA-levels, measured at admission were significantly lower (2.27 (IQR 0.5-134.3), (IQR 3.7-719.2),  $p = 0.004$ ) among patients with mild ischemic stroke (NIHSS < 3) ( $n = 30$ ), compared to patients with severe ischemic stroke (NIHSS > 3) ( $n = 41$ ). Another finding of our study was the dynamics of IMA blood levels in the acute phase of ischemic stroke. IMA levels were significantly higher within the first hours of stroke onset with tendency to decrease within the following hours. The comparison between IMA levels at the 12th and 72nd hour revealed the decrease of IMA over time ( $p = 0.017$ ). Serum IMA levels at the 12th hour are with median 3.9 and interquartile range (IQR) 0.8-291.0 and at the 72nd hour - median 2.3 and IQR 0.8-78.0. Cerebral ischemia causes an increase of serum levels of IMA in the acute phase of ischemic stroke and its elevation is strongly correlated to the stroke volume. Furthermore, IMA decreases over time within stroke onset, which confirms the crucial role of initial oxidative stress and brain ischemia for the increase of IMA. In conclusion, IMA may be included in the biomarker panels for distinguishing between stroke and different stroke mimics.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Krasteva M, Muraduan N, Hristova J, et al. Dynamics of ischemically modified albumin in acute cerebral ischemia. Bulgarian neurology. 2019;3(20)

#### **Contract 112/2018 Quality of Life, Obesity, and Metabolic Syndrome in the context of chronic subclinical inflammation**

**Research team:** Assoc. Prof. Atanaska Petrova Elenkova, MD, PhD

- Ass. Prof. Ralitsa Robeva, MD, PhD
- Boyka Milcheva, MD, PhD
- Iliana Borisova, MD, PhD
- Semra Mustafa, MD

**Organization unit:** Department of Endocrinology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The main objective of the study was to evaluate the role of chronic subclinical inflammation for the metabolic disturbances and quality of life in obese patients. Health-Related Quality of Life (HRQoL) was determined in 30 healthy normal-weight women and 110 overweight or obese female patients through a SF36 questionnaire. A total of 35 obese women were metabolically healthy (MHO), while the remaining 75 obese females were diagnosed with a metabolic syndrome (MS). Anthropometric and detailed biochemical markers as well as levels of different inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-10, interleukin-17A, and interleukin-17F) were estimated. MHO patients showed a



lower HRQoL physical component than healthy women ( $p < 0.001$ ), but better performance in comparison to the MS women ( $p = 0.022$ ). There were no differences in the concentration of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 between MHO and MS women ( $p > 0.05$  for all), whereas anti-inflammatory interleukin-10 levels were significantly lower in MS compared to MHO patients ( $p = 0.035$ ). The levels of interleukin-17F but not interleukin-17A were significantly higher in patients with type 2 diabetes mellitus. Interleukin-1 $\alpha$  levels were inversely related to the subjective physical functioning score ( $r = -0.417$ ,  $p = 0.003$ ) in the MS female individuals. Our study has shown that the development of metabolic syndrome might further aggravate the impaired perception of physical well-being in obese patients. The important protective role of the anti-inflammatory interleukin-10 for MS development has been confirmed. Interestingly, interleukin-1 $\alpha$  levels could influence the subjective assessment of quality of life in patients with metabolic disturbances. Future studies are needed to reveal whether the therapeutic modulation of different interleukin levels might improve the metabolic health and quality of life in obese women.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Robeva R, Milcheva B, Elenkova A, et al. Metabolic syndrome and quality of life – facts and mysteries. *Endocrinologia*. 2018; 23, 4, 179-186.

#### **Contract 113/2018 Assessment of the relation between islet cell, thyroid and transglutaminase antibodies in type 1 diabetes**

**Research team:** Prof. Tsvetalina Ivanova Tankova, DMSc

- 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 Todorova, MD, PhD student
- Mina Serdarova, MD, PhD student

**Organization unit:** Department of Endocrinology, USHATE “Acad. Ivan Penchev”

**RESULTS:** The aim of the study is to assess the prevalence and diagnostic value of ZnT8 antibody in adult patients with type 1 diabetes of short duration together with a complex assessment of the autoimmunity in this population including the prevalence of the autoantibodies for the most prevalent associated autoimmune diseases – autoimmune thyroid disease (AITD) and celiac disease, and their relation to islet cell antibodies. 160 patients with type 1 diabetes, of mean age  $36.3 \pm 10.9$  years, mean BMI  $23.0 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup> and mean duration of the disease  $1.35 \pm 1.69$  years were analyzed. Islet cell antibodies – glutamic acid decarboxylase antibodies (GAD 65-Ab), thyrosine phosphatase antibodies (IA 2-Ab) and zinc transporter 8 antibodies (ZnT8-Ab), transglutaminase antibodies (TTG-IgA-Ab) and thyroid antibodies – thyroperoxidase antibodies (TPO-Ab) and thyroglobulin antibodies (TAT-Ab) were assessed by ELISA method. 87.5% of the studied patients had one or more of the islet cell antibodies. 78.1% had positive GAD 65-Ab, 53.1% - ZnT8-Ab and 34.4% - IA 2-Ab. 5% were ZnT8 8-Ab monopositive. GAD 65-Ab identified 90.6% of the antibody positive patients with type 1 diabetes. The addition of IA 2-Ab as a second immunologic marker identified 94.4%, while the use of ZnT8-Ab as a second marker identified 98.8 % of the cases. 34.9% of the patients had positive thyroid antibodies and 36.3% had AITD. No relation was established between any of the

islet cell antibodies and the presence of AITD. There were no TTG-IgA-Ab positive patients. No significant correlations were found between the types of studied antibodies – islet cell, thyroid and transglutaminase antibodies. In adult patients with type 1 diabetes ZnT8-Ab is an important and independent diagnostic marker rating second in prevalence and diagnostic significance after GAD 65-Ab. AITD affects about 1/3 of this population and routine screening is required, while screening for celiac disease is not justified.

**Scientific publications and presentations:**

- Chakarova N, Dimova R, Serdarova M, et al. Islet, thyroid and transglutaminase antibodies in adult Bulgarian patients with type 1 diabetes. *Endocrine* 2020;70(2):299-306.
- Chakarova N, Dimova R, Serdarova M, et al. Autoimmune thyroid disease in adult patients with type 1 diabetes - one specialized center data. Third Specialized Scientific Symposium „Rare disorders of thyroid and calcium-phosphate metabolism”, 19-20 June 2020, Sofia

**Contract 114/2018 Antiviral immune response in children with virus-induced wheezing**

**Research team:** Assist. Prof. Ekaterina Ivanova Ivanova-Todorova MD, PhD

- Sirma Dimitrova MD, PhD
- Milena Ivanova MD
- Kalina Tumangelova-Yuzeir

**Organization unit:** Dept. of Clinical Immunology, University Hospital "St. Ivan Rilski", Sofia 1431

**RESULTS:** Viral bronchiolitis is one of the leading causes for hospitalization of infants and Respiratory syncytial virus (RSV) is associated with the majority of these cases. IFN- $\gamma$  is essential cytokine in the viral cell-mediated immune response and as Th2-type cytokine is used periostin. The present study assess the level of antiviral immune response presented with IFN -  $\gamma$  and periostin in nasopharyngeal aspirate and serum in children with viral - induced wheezing. Sixty-nine infants (40 boys and 29 girls), aged 2 to 23 months (average 11,4 mo), hospitalized at Pediatric Department of Alexandrovska University Hospital with first or recurrent episode of bronchial obstruction were enrolled in this study. Detailed history, physical examination, blood sample and nasopharyngeal aspirate (NPA) collection were done. The viral etiology of the respiratory tract infections was determined using polymerase chain reaction (PCR). The serum and nasopharyngeal (NPA) concentration of IFN- $\gamma$  and periostin was assessed by ELISA kits. The mean IFN- $\gamma$  levels in serum was 14.28 (0-100.3) pg/ml, and 11.02 (0-124.14) pg/ml in NPA. Interferon gamma production was lower in boys, infants with atopic status and family history of asthma, and recurrent wheezers. The mean serum periostin levels was 1295.24 (0-1915.48) ng/ml and 5.58 (0-124.14) ng ml in NPA. There was no significant dependence by age, gender and atopic status. We observed correlation between serum periostin levels with the severity of the clinical manifestations, and recurrent episodes of wheezing. Our study proves that RSV infection is associated with decreased IFN- $\gamma$  production and increased periostin response and their correlation with severity and recurrence of wheezing were the main outcome measures.

**Scientific publications and presentations:**

- Mileva S, Yankova M, Ivanova-Todorova E, et al. Immune response in children with bronchiolitis. XX National Conference of Pediatricians and General Practitioners. Sunny beach, 23-26 May 2019.
- Mileva S, Petrova G, Ivanova-Todorova E, et al. The Interferon-gamma level in nasopharyngeal secretions of infants with bronchiolitis. Poster. CIPP XVIII, June 27-30, Tokyo. Poster

**Contract 57/2019 Validation of immunologic method for erythroferrone serum evaluation and establishment of reference values for Bulgarian population****Research team:** Prof. Ognyan Borisov Georgiev, MD, PhD

- Assist. Prof. Victor Manolov, Md, PhD
- Assoc. Prof. Vencislava Pencheva-Genova, Md, PhD
- Prof. Iulia Petrova, Md, PhD
- Prof. Kamen Tzatchev, Md, PhD
- Assoc. Prof. Evgeniy Hadjiev, MD, PhD
- Todor Kunchev, PhD student

**Organization unit:** Dept. of Propaedeutics of Internal Diseases, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of this study is to validate immunochemical method for serum erythroferrone quantification and establishment of its’ reference values for Bulgarian population. For erythroferrone quantification sandwich type of ELISA method was used. Microwells are loaded with specific human erythroferrone antibodies. Color reaction is photometrically measured on 450 nm. Validation of ELISA method for erythroferrone quantification consists of the following steps: During method validation for erythroferrone quantification was made calibration curve by 8 standards with double measurement (recombinant human erythroferrone with known value of 20 ng/ml (1 ml); from this standard was prepared stock solution according to manufacturer instructions - 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.312 ng/ml, 0.156 ng/ml). blank was measured ten times – for evaluation of limit of detection, 0.056 ng/ml, which provides very high diagnostic sensitivity. Each standard was evaluated twice. Their values were corrected by blind reagent probe (standard diluent). Calibration curve was made, four parametric; by axis X – logarithmic, by axis Y – linear. Standards 0.156 ng/ml, 1.25 ng/ml, 10 ng/ml were measured twice for evaluation of low level of quantification (LLQ), middle level of quantification (MLQ) and high level of quantification (HLQ). Patient’s samples were measured twice. We established CV% - for LLQ 6.145%, for MLQ 5.057%, for HLQ 2.979%. We established the bias% - for LLQ 8.754%, for MLQ 3.47%, for HLQ 0.77%. Trueness of method was evaluated by recovery method (added/measured). We proved area of 96.7% to 97.9%. Repeatability was evaluated by five times measurement of three random patient samples with known erythroferrone levels. We established CV% from 1.91% to 4.17%. Traceability was evaluated by five times measurement of three random patient samples with known erythroferrone levels, previously frozen in Eppendorf tubes and measured one by one with each analytical series. We established CV% from 1.98% to 3.74%. During evaluation of analytical reliability of ELISA method was established: wide range for quantification; low limit of detection; high diagnostic sensitivity; low analytical variation. For establishment of reference values for erythroferrone in serum we measured 200 clinically healthy volunteers from Bulgarian nationality with age from 18 to 79 years, 90 of them males, 110 females. The group consists from individuals with different professions – medical staff, workers, students, employees. Different criteria for trial inclusion were used. Program REFVL was used for statistical processing of collected data and for establishment of reference values, according to IFCC/CLSI document C28-A3 from march 2008. Parametric evaluation of reference interval for

erythroferrone for total group of clinically healthy males and females; n=200\* - 95% reference interval showed values from 6.3 ng/ml to 15.7 ng/ml. Gaussian distribution was established for serum erythroferrone in control group of healthy volunteers from Bulgarian population.

**Scientific publications and presentations:**

- Manolov V, Georgiev O, Vasilev V, et al. Validation of ELISA erythroferrone serum quantification method. 27<sup>th</sup> Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Congress and 30<sup>th</sup> National Biochemistry Congress (NBC) of TBS. 27.10.-31.10.2019, Antalya, Turkey

**Contract 65/2019      Application of molecular genetic techniques in the diagnostic algorithm for non-cancerous urethritis**

**Research team:** Assoc. Prof. Vessela Vaskova Raykova, MD, PhD

- Assist. Radoslav Baykushev

**Organization unit:** Dept. of Medical Microbiology, 2 Zdrave str, 1431 Sofia

**RESULTS:** The purpose of this study was to investigate patients with urethritis, the application of genetic techniques, their comparison with routine one and their inclusion in the diagnostic algorithm of the disease. 78 sexually active men with urethritis and 20 men control group were tested. Samples used: urine/urethral smear used for - Gram staining; cultivation on media; DNA extraction and PCR. In 33 men, infections were reported through various tests. *N. gonorrhoeae* was detected by Gram staining in 5 samples; by culturing on Thayer Martin medium in 6 swabs; by PCR in 8 smears. Positive results for *C. trachomatis* were obtained after culturing on McCoy medium and immunofluorescence with anti-lipopolysaccharide monoclonal antibody in 13 samples; PCR positive results were 14. *U. urealyticum* was found in 7 samples by cultivation and semi-quantitative method with Mycofast Revolution Kit; in 9 swabs by PCR. *M. genitalium* was detected in 3 samples by PCR. *M. hominis* was negative for all secretions tested. *T. vaginalis* were demonstrated in 1 urine by culturing in TV4 medium; and 2 positive samples tested by PCR.

**Scientific publications and presentations:**

- Raykova V. Detection of common bacterial causes of urethritis in symptomatic men attending STD laboratory of MU-Sofia by microscopy, culture and NAAT. *Scripta Scientifica Medica* 2019;51(4):13-8.

**Contract 72/2019      One-year pilot study on the incidence of EGFR mutation status from bronchoalveolar lavage in patients with primary lung adenocarcinoma compared to peripheral venous blood liquid biopsy and tissue biopsy**

**Research team:** Prof. Dimitar Temelkov Kostadinov, MD, PhD

- Assoc. Prof. Nikolay Yanev, MD, PhD
- Dinko Vulev, MD, PhD
- Stoian Bichev
- Silvia Ivanova
- Assoc. Prof. Evgeni Mekov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Dora Marinova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Miroslav Mihailov, MD

- Assoc. Prof. Natalia Gabrovska, MD, PhD
- Assoc. Prof. Iva Popova, MD
- Assoc. Prof. Vladimir Milanov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Denica Dimitrova, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Pulmonary Diseases, 19 Akad Iv Evstratiev Geshov Blvd., Sofia 1431

**RESULTS:** This study aims to compare the prevalence of EGFR mutation status in bronchoalveolar lavage and peripheral blood according to the gold standard - tissue biopsy in patients with lung adenocarcinoma. We assessed all patients scheduled for bronchoscopy between October 2018 and August 2019. The exclusion criteria did not differ with those for standard contraindications for a bronchoscopy. The performed biopsy techniques were forceps biopsy, transbronchial biopsy, EBUS and bronchoalveolar lavage (BAL). For the period of the study 140 bronchoscopies were performed. In 112 patients (80%) a tumor was verified. Adenocarcinoma was present in 23.2% (26/112) of the patients with lung cancer. Thirteen patients had wild type EGFR and the other 13 had EGFR mutation. EGFR mutation from a peripheral blood sample was identified in 38.5% (5/13) patients, whereas EGFR mutation obtained from BAL was identified in 92.3% (12/13). In one case in both liquid biopsy samples (BAL and plasma) we found additional T790M mutation, which was not established in the corresponding tissue sample. The current standard for detection of mutation in patients with unknown status after negative tissue sampling is rebiopsy or venous blood. Establishing EGFR status from BAL is a viable and safe procedure especially in impaired patients with promising results. In this study, we demonstrated the superiority of BAL to venous blood liquid biopsy in establishing an EGFR mutation. This could facilitate a diagnosis with a minimally invasive method and lower risk for the patient with comparable results to histology samples.

**Scientific publications and presentations:**

- Yanev N, Mekov E, Ivanova . et al., Dignostic yield of standart flexible bronchoscopy for histological verification of lung tumors, *Torakalna Medicina*, 2019;11(3-4):64-75
- Yanev N, Mekov E, Petkov R et al., Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure, *Торакална медицина*, 2020;12(1):4-19
- Yanev N, Mekov E, Dimitrova D et al., Sensitivity and specificity of liquid biopsy of bronchoalveolar lavage and blood plasma in the assessment of EGFR mutation status in patients with primary lung adenocarcinoma, *Torakalna Medicina*, 2020;12(1):6.
- Yanev N, Mekov E, Vulev D et al. EGFR mutation status yield from bronchoalveolar lavage in patients with primary pulmonary adenocarcinoma compared to a venous blood sample and tissue biopsy, *PeerJ*, 2020;08:52396:0:1:
- Yanev N, Mekov E, Kostadinov D. Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for the diagnosis of paratracheal and peribronchial central parenchymal lesions, *Folia Med (Plovdiv)* 2020;60(4)
- Yanev N, Valev D, Kostadinov D. Determination of EGFR mutation status from bronchoalveolar lavage in patients with primary pulmonary adenocarcinoma, “Transforming future” Annula oncology meeting. Pravetz, 05-07 April 2019 г.
- Dimitrova I, Yanev N, Bichev S et al., Comparison of EGFR mutation detection among FFPET, bronchoalveolar lavage (BAL) and blood samples in patients with non-small cell lung Cancer, *ESHG 2020.2*, 06.06.2020

- Yanev N, Mekov E, Kostadinov D. Liquid biopsy in patients with adenocarcinoma - comparison between bronchoalveolar lavage (BAL) and blood samples, ERS 2020, Virtual Conference , 09.09.2020
- Yanev N, Mekov E, Kostadinov D. Determine EGFR Mutation Status from Bronchoalveolar Lavage, Virtual-LC, 24.09.2020

**Contract 86/2019    Micro-invasive and Antimicrobial Effect of Chemo-mechanical Excavation Means in Primary Teeth Caries**

**Research team:** Prof. Maya Rasheva Rashkova, PhD

- Assoc. prof. Raina Gergova, PhD
- Assist. Prof. Nadezhda Mitova, PhD
- Assist. Zornitsa Lazarova
- Assis. Virna-Maria Tsitou
- Assist. Hristina Tankova-Zlateva

**Organization unit:** Department of Pediatric Dentistry, St. Georgi Sofiyski 1, Sofia, 1431

**RESULTS:** The aim of this project is to conduct a study on the selective and antimicrobial activity of an enzyme-based method for controlled excavation in combination with photodynamic therapy (PDT) with FotoSan in the context of micro-invasive treatment of caries lesions and closed asymptomatic pulpitis in primary teeth. The subject group of the clinical study was 42 primary molars: 22 with a diagnosis of closed asymptomatic pulpitis and 20 with deep dental caries lesion. Dentin samples with different levels of destruction – infected, partially infected, affected and healthy dentin - were taken for microbiological examination (128 in total). Mechanical and chemo-mechanical excavation with Brix 3000 was used, controlled by fluorescence with ProFace and PDT with FotoSan. For the *in-vitro* microbiological study of the antimicrobial effect of PDT, 40 plates were prepared, divided into 10 in 4 groups: with Brix 3000, with PDT – FotoSan Intro Kit 630, a combination with Brix 3000 + FotoSan, and a control group – with no active ingredient. For the experimental micro-CT scan (100 scans) and the determination of the degree of destruction, 50 extracted primary molars with approximal carious lesions grouped into 4 groups with different method of excavation – mechanical and enzyme-based were used. The results showed that a greater variety of microbial associations in carious dentin in closed asymptomatic pulpitis compared to deep dentinal caries. In partially infected dentin, the disappearance of most microorganisms is observed, with 2/3 of the cases retaining *Str. mutans*, in association with 1 or 2 more microorganisms. In clinical conditions, the antimicrobial effect of PDT with FotoSan on residual microorganisms in partially infected dentin has been proven. *In-vitro*, a potential antimicrobial effect of the combination of Brix 3000 and PDT with FotoSan against cariogenic microorganisms was ascertained - *Str. mutans* and *Lactobacillus spp.*

The degree of destruction in the center of a cavitated carious lesion in primary teeth is characterized by a fourfold decrease in the mineral density of the carious dentin in comparison with the healthy one. Reduced mineral density is found in overpulpal dentin, with a clinical characteristic of healthy dentin. Controlled enzyme-based excavation with Brix 3000 results in lower volumes of carious dentin withdrawal due to its self-limiting biochemical action in combination with the antimicrobial effect recommended in the treatment of primary teeth.

**Scientific publications and presentations:**

- Lazarova Z. Controlled Excavation and Antimicrobial Activity in the Treatment of Dentine Caries in Primary Teeth (Literature review). Problems of dental medicine, 2019;45(2):42-52.

**Contract 88/2019      Disinfection of the endodontic space in immature permanent teeth**

**Research team:** Assoc. Prof. Nataliya Hristova Grancharova, DDS, PhD

- Assoc. Prof. Pavel Stanimirov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Raina Gergova, MD, PhD
- Assist Krasimir Hristov, DDS

**Organization unit:** Department of Pediatric Dentistry, G Sofiiski 1 Str., Sofia 1606

**RESULTS:** The purpose of this project is to study the effectiveness of endodontic irrigants and intracanal medications in decontamination of the endodontic space in immature permanent teeth. Immature roots are infected with *E. faecalis* in vitro. The prepared samples are disinfected with different protocols. The results show that the irrigation protocol proposed by the AAE does not provide better root canal disinfection in immature teeth than passive ultrasonic activation. The highest bacterial growth is observed in the samples disinfected with passive ultrasonic activation, due to the fact that immature teeth have wide and oval root canals, and the efficiency of the method decreases with the increase of the canal's diameter. Minimal mechanical instrumentation with XP-endo Finisher and Gentlefile Brush in immature teeth improves root canal disinfection. The use of citric acid in the irrigation protocol improves its antibacterial efficiency in immature teeth. The triple antibiotic paste at a concentration below 100 µg / mL has low activity against *E. faecalis*.

**Scientific publications and presentations:**

- Hristov K, Gateva N. Effectiveness of different root canal irrigation protocols in treatment of immature permanent teeth. Medinform, 2019;6(2):1043-1052.

**Contract 91/2019      3D Printed splints for bruxism prevention – experimental and clinical study**

**Research team:** Assoc. Prof. Todor Tsonkov Uzunov, PhD

- Assist. Prof. Iva Taneva
- Prof. Mariana Dimova-Gabrovska, PhD, DSci
- Assist. Prof. Nikolay Apostolov, PhD
- Denitsa Toneva, student

**Organization unit:** Department of Prosthetic dental medicine, 1 GSofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The main objective of the project was to develop and test a new, digital approach for manufacturing and application of occlusal splints for bruxism prebention using the technology of three-dimensional (3D) printing. As a result, a clear formulation of the stages is made. The methodology is sufficiently repeatable to be applied for the prevention of the parafunction in the long run, and the technology of three-dimensional printing has proven its high efficiency and precision. The newly introduced method was verified as clinically applicable and expands the range of preventive measures that a dentist can take to neutralize the negative effects of bruxism. A specific control examination regimen has been established. A questionnaire



was developed for the satisfaction of patients with their prophylactic splints. The advantages and disadvantages of the currently known techniques for producing occlusal splints for the prevention of the negative consequences of bruxism are clearly differentiated. The retention and stability of the splints made in the clinical part of this study were tested and proved a gnathodynamometric evaluation, as the results, compared with the values established by the same method in natural dentition, are significantly higher. A wide range of mechanical properties of the examined four types of materials were tested, fully representing the possible options for selection in the manufacturing of occlusal splints for bruxism prevention. Wear resistance as a mechanical property clarifies what the prospects in the behavior of a material in long-term applicability are. The study of the surface relief by atomic force microscopy, in addition to the described results, gives direction for future examination of how the surface of the materials can be improved, in particular the presented liquid photopolymer resin for three-dimensional printing – from a hygiene and maintenance of the splint point of view. A study of the changes occurring in the joint-muscle complex of the masticatory apparatus during the prophylaxis period at different intervals has been started and is being currently further developed.

**Scientific publications and presentations:**

- Taneva I, Uzunov T. Influence of post polymerization processing over the mechanical features of 3d printed occlusal splints. J. Phys.: Conf. Ser. 2020 1492 012018
- Taneva I, Grozdanova-Uzunova R, Uzunov T. Occlusal splints – changes in the muscular activity. J Phys: Conf. Ser 2021;1859(1):012046.
- Taneva I, Uzunov T, Toneva D. 3D printed occlusal splints for prevention of bruxism effects. 19<sup>th</sup> Scientific Congress of BgDA, Jun 6-8, 2019, Burgas-Pomorie, Bulgaria
- Taneva I, Uzunov T. Influence of post-polymerisation processing over the mechanical features of 3D-printed occlusal splints. Twenty-first International Summer School on Vacuum, Electron and Ion Technologies. Sozopol, Bulgaria. 23-27 Sep 2019
- Taneva I, Grozdanova-Uzunova R, Uzunov T. Occlusal splints – changes in the muscular activity. 21st International Conference and School on Quantum Electronics: “Laser Physics and Applications” – 21st ICSQE 21-24 Sep 2020.

**Contract 92/2019      Significance between presence of IL-17F gene polymorphism and severity of periodontitis**

**Research team:** Assos.prof. Antoaneta Miteva Mlachova, PhD

- Prof. Hristina Popova, PhD
- Assis. Prof. Zdravka Pashova-Tasseva
- Maya Kicheva, PhD

**Organization unit:** Dept of Parodontology, G Sofiiski Str., Sofia 1430

**RESULTS:** In the present study 40 patients with diagnosis periodontitis Stage II-IV and 10 healthy subjects, representing the control group were taking part. After analyzing the diagnostic data (clinical, paraclinical and laboratory methods were used, and statistical analysis by the means of analyzing the data base) we established the presence of two genotypes for the tested SNP of IL-17F in locus rs\_763780 – TT genotype and CT genotype (92% of the tested subjects were diagnosed with TT genotype, the other 8% - with CT genotype). We have established statistically significant differences between the basic parameters of periodontitis, gender and smoking, we did not establish statistically significant differences in the mentioned parameters

when comparing them between the patients with different genotype. We have determined strong correlations between the investigated parameters and they confirmed the data from different conducted studies. Important significant tendencies in the groups with different genotypes stand out: • in patients with genotype TT the periodontal sites with depth 5-7 mm (PD 5-7) are almost 18% more compared to the patients with patients with genotype CT; • in patients with genotype TT the deepest periodontal sites (PD >7) are just as 8% more than genotype CT; • in patients with genotype CT we established higher percentage of the sites with CAL 1-2 compared with the same parameter in patients with genotype TT; • in patients with genotype TT the clinical parameter BoP shows up to 100% compared to the CT genotype patients which also represent high percentage of BoP.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Mlachkova A, Pashova-Tasseva Z, Popova H, et al. Presence of SNP Interleukin-17 F in Bulgarian Population, Journal of IMAB 2021;27(2):3692-9.

#### **Contract 93/2019 Diagnostic and microinvasive dental approach in patients with arthropathies due to craniomandibular dysfunctions**

**Research team:** Profesor Mariana Iordanova Dimova-Gabrovska, PhD, DSc

- Prof. Bozhidar Yodanov, PhD
- Assoc. Prof. Todor Uzunov, PhD
- Assist. Prof. Nikolay Stoilov, PhD
- Assist. Prof. Nikolay Apostolov, PhD
- Desislava Dimitrova, PhD

**Organization unit:** Department of Prosthetic Dentistry, G sofiiski 1 Str, Sofia 1431

**RESULTS:** Craniomandibular disorders are conditions influencing the maxillofacial region and can disseminate to the musculoskeletal system, affecting the homeostasis of the whole organism. The aim of the scientific project is, on the basis of modern clinical research, to approve and apply in practice a protocol for diagnostics and micro-invasive dental approach in the pre-prosthetic preparation of the masticatory system in patients with arthropathy due to craniomandibular disorder (CMD). Subjects of the study were 45 patients (selected from 500) divided into 2 groups: a control group of 15 patients with no signs and symptoms of CMD and an experimental group of 30 patients with arthropathy divided into 2 subgroups: with and without prosthetic restoration. The study participants were subjected to clinical functional analysis, ultrasound examination of the temporomandibular joint (TMJ), clinical and digital occlusal analysis, examination of the maximum bite force, the centric condyle position and the individual values of TMJ. Patients with arthropathy were put to micro-invasive dental treatment with occlusal splints. Functional examination findings indicated that patients with arthropathy prior to treatment have a reduced range of active maximal opening, protrusion, and laterotrusion movements and more intensive pain symptoms in compression and palpation of TMJ than healthy patients. In a period of 6 months after treatment, there was a significant improvement in the criteria tested. The introduced protocol for the ultrasonographic study of the TMJ's spatial relation in three reference points allowed objectivity in the evaluation of the treatment's positive effect. Through clinical and digital occlusal analysis, the prerequisites for the occurrence of functional pathology - force imbalance, articulatory blockages and preliminary contacts were defined. Lower values of the maximum bite force were found in patients with arthropathies

which increased after the application of the therapeutic means. 43 The conducted studies allowed us to originate a protocol for the diagnosis and micro-invasive treatment of patients with arthropathy, due to CMD, and to develop recommendations regarding the influence of the functional pathology of the masticatory system.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Dimova-Gabrovska M, Dimitrova D, Yordanov B, et al. Ultrasound diagnosis of temporomandibular joint in patients with craniomandibular dysfunctions. J of IMAB. 2019; 25(2):2563-2569.
- Dimova-Gabrovska M, Dimitrova D, Yordanov B, et al. Clinical study of patients with arthropathy due to craniomandibular disorders. MedInform. 2020; 7(1): 1131-1135.
- Dimova-Gabrovska M, Dimitrova D, Yordanov B, et al. Ultrasound diagnosis of temporomandibular joint in patients with craniomandibular dysfunctions. 29-th Annual Assembly of IMAB and with the satellite 6-th Meeting of Alumni Club at Medical University Varna, Varna, Bulgaria, 9 - 12 May 2019.

#### **Contract 95/2019 Prevention of dental caries in children from 6 to 12 years by influencing their eating habits**

**Research team:** Assoc. Prof. Liliya Borisova Doichinova DMD., PhD

- Assist. Prof. Petar Bakardzhiev, DMD, PhD
- Assist. Prof. Dimitar Hristov, MD, PhD
- Assist. Prof. Maria Nikolova, MD, PhD
- Ilia Liondev - student
- Aphrodita Naumova - student

**Organization unit:** Dept. of pediatric dental medicine, 1.St. G. Sofiysky Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the current project was to investigate the prophylaxis of the dental caries through a change in the diet in children between 6-12 years. Sociological and clinical methods were utilized. A three-day diet diaries were used to assess the food intake of 227 children and the data was statistically analysed by SPSS Statistics 20 and Spearman-Brown correlation tests. The participants were insufficiently informed about the effect of the diet over the oral health. The anthropometric indexes revealed an insignificant correlation between the severity of the caries and the food habits of the children. The protein intake was higher than the recommended physiological needs. The consumption of carbohydrates surpassed the lower band, whereas that of the fibrous foods was within the normal range. There was a vitamin deficiency of A, B<sub>1</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, D, Ca, P and Fe, while C, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, Na and K intake exceeded the physiological norms. A negative correlation was found between the D1MFT+t and the intake of sweets ( $\rho=-0.36$ ,  $p<0,0001$ ), jam, honey, milk, soft and fizzy drinks ( $\rho=0,34$ ,  $p<0,0001$ ). A positive correlation was registered between the intake of chips and crackers ( $\rho=0.18$ ,  $0.019$ ), and none was observed among the cereals, fruits and vegetables, pastry and junk food ( $p>0,05$ ). The preference for monosaccharides increased the caries risk profile of the children. The prolonged TV viewing increased the D1MFT+t in half of the participants ( $p<0.001$ ),  $Rho=0.438$ . The oral health status was used to assess the programme for changing dietary habits between the experimental group and the control group, having a regular diet. After the completion of the programme D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> lesions showed signs of healing in comparison with the control group,

whereas no change was observed in D4. Dentists, parents and teachers should actively focus on the change of the dietary habits of children.

**Scientific publications and presentations:**

- Doychinova L, Kirov D, Bakardjiev P et al. Television advertising and the development of dental caries in children from 6 to 12 years. *Folia Medica* 2021;63(4):533-40.
- Doychinova L, Kirov D, Nikolova M et al. Nutritional intake of vitamin D and dental caries in children from 6 to 12 years. *Sylwan English Edition* 2020; 164(8): 126-137.

**Contract 96/2019 Assessment of the risk of developing dental caries in patients aged 19 to 64 years with Cariogram®.**

**Research team:** Prof. Snezhanka Topalova-Pirinska, DMD, PhD

- Assoc. Prof. Janet Nikolova, DMD, PhD -
- Assoc. Prof. Liliya Doichinova, DMD, PhD
- Assist. Prof. Dimitar Kirov, DMD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Conservative dentistry and endodontics, G Sofiiski 1 Str, Sofia 1431

**RESULTS:** The aim of the current study was to influence the risk factors for dental caries development in patients aged 19-24 years after the initial assessment of their caries risk with Cariogram®. The results showed that 24% of the patients exhibited an extremely high caries risk, 48% – a high one and the rest 28% have moderate and low risk. The most prevalent sector was the caries susceptibility (16.24%), followed by the food sector (11.64%), microorganisms (10.42%) and the conditions, leading to caries development (6.14%). The Cariogram® model revealed 55.56% chance of caries avoidance in the near future in the entire experimental group. The Spearman's Rank correlation test showed a statistically significant positive relationship between the caries risk and DIFMT, ( $r_s [100] = .358, p < .001$ ). The evaluation of the patients' diet revealed some negative tendencies in their food habits: high intake of animal fats and plant oils, fatty meat and salami; low intake of fish; consumption of high-fat milk; low intake of raw fruits and vegetables; a tendency of increased consumption of sweets and beverages, containing sugar that increases the caries risk. The most powerful risk factors among patients between 19-64 years were DMFT, insufficient oral hygiene and diet – carbohydrates and frequent eating. An individual prophylactic plan for caries prevention, containing specific approaches, was designed for each patient after the assessment of the unique combination of risk factors for caries development, depending on their severity. After the completion of the programme there was a statistically significant improvement of the oral hygiene and the diet of the patients with high caries risk ( $\chi^2=5.82 p<0.05$ ).

**Scientific publications and presentations:**

- Topalova-Pirinska S, Doichinova L, Kirov D, et al. Risk factors for dental caries in adults *Dental Medicine* 2018; 100(1): 56-63.
- Topalova-Pirinska S, Doichinova L, Kirov D, et al. Methods for assessing the individual risk of caries development. *Dental Medicine* 2018; 100(1): 64-69.
- Doichinova L, Kirov D, Topalova-Pirinska S et al. Caries risk assessment in adults using Cariogram *Folia Medica* 2020; vol. 62, issue 4. *Folia Medica*

- Doichinova L, Kirov D, Topalova-Pirinska S et al. Assessment of risk factors for development of caries in adults: a preliminary study. 29-th Annual Assembly of International Medical Association of Bulgaria (IMAB). 2019, Varna, Bulgaria

**Contract 100/2019 Apoptotic factor caspase-3 analysis in human primary epithelial cells from isolated intraoperatively and treated with *trypan blue* anterior lens capsules of patients with age related cataract and diabetes type 2 induced cataract**

**Research team:** Assoc. prof. Alexander Hugo Oscar. MD, PhD

- Academic, Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Antonia Isaeva, PhD
- Vasil Markovich Haykin, MD, PhD student
- Assist. Violeta Dimitrova
- Assist. Yani Zdravkov, MD, PhD
- Prof. Iva Petkova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Stanislava Ivanova, MD, PhD
- Assist. Valentinova Veleva - Krasteva, MD, PhD

**Organization unit:** University Hospital “Alexandrovska”, 1 Georgi Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Primary lens-epithelial cell cultures were obtained from in-vivo trypan-blue-stained anterior lens capsules (ALC) from patients with age-related and patients with type 2 diabetes-induced cataracts. Thirteen patients were studied (55-75y; 7 with age-related, 6 with type-2 diabetes induced cataracts). Cell nuclei, calcium deposit in the extracellular matrix ( $Ca^{2+}$ ) and intracellular hyperoxidative free radicals(ROS) were visualized by triple fluorescence labeling. Triple-fluorescence testing and quantitative analysis were performed. The highest level of ROS was found in LECs of trypanblue-double-stained ALC from patients with type 2 diabetes –5,214. Lowest level of ROS –3,420 for LECs of trypanblue-single stained ALC in age-related cataracts. The ROS for trypanblue-single-stained ALC in age-related cataracts was 3,761, and for trypanblue-single-stained LECs in type 2 diabetes –4,376. The highest level of  $Ca^{2+}$  was found in LECs of trypanblue-double-stained ALC in type 2 diabetes–0,299. The lowest  $Ca^{2+}$  –0.182 level in trypanblue LECs single-stained ALC in type 2 diabetes induced cataracts.  $Ca^{2+}$  in trypanblue LECs single-stained ALC for age-related cataract –0.238, and for trypanblue LECs of double-stained ALC for age-related cataract –0.208. We could speculate on the correlation between the relative levels of ROS and Caspase-3. However, the studies performed did not show statistically significant results. It is speculated that partial intracellular penetration of trypan-blue negatively regulates cellular physiology. Oxidative stress through ROS and induced apoptosis, with reduced antioxidant activity, are responsible for the development of cataracts. ROS induces an increase in  $Ca^{2+}$ . An increase in extracellular  $Ca^{2+}$  is characteristic of pathological conditions associated with oxidative stress and apoptosis. The major cause of age-related and type 2 diabetes-induced cataract formation is damage due to ROS and associated elevated  $Ca^{2+}$  levels. We have established: • Higher  $Ca^{2+}$  levels in double trypan-blue staining, both in type 2 diabetes-induced cataracts and in age-related. • Type 2 diabetes-induced cataracts - higher ROS levels with double staining. • In patients with age-related cataracts, similar ROS levels in both methods. The present study is the first of its kind in Bulgaria, contributing to the elucidation of the mechanisms of cataractogenesis.

**Scientific publications and presentations:**

- Haykin V, Tanev I, Oscar A, et al. Investigation of oxidative stress and calcium deposition on human primary epithelial cells from isolated intraoperatively and treated with trypan blue anterior lens capsules of patient with age related cataract. XIII Congress of the Bulgarian Society of Ophthalmology, October 24-27, 2019, Borovets.

**Contract 101/2019    Role of Vitamin D in myopia development**

**Research team:** Assoc. Prof. Galina Georgieva Dimitrova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Alexander Oscar, MD, PhD
- Assist. Prof. Nevyana Veleva-Krasteva, MD, PhD
- Assist Prof. Ognyan Mladenov, MD, PhD
- Assist Prof. Pavlin Kemilev, MD
- Vasil Haykin, MD, PhD student
- Prof. Dobrin Svinarov, MD, PhD, DSci

**Organization unit:** Department of Ophthalmology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** A study investigating the relationship between vitamin D (serum 25(OH)D levels) and risk of myopia was conducted in Bulgaria for the first time. The survey included 98 children, average age 11,6 years (SD  $\pm 3,09$ ) – boys 37 (37,8%) and girls 61 (62,2%). The participants were subdivided into two groups: myopic – 76 (77,6%) and nonmyopic – 22 (22,4%). Full ophthalmologic examination, cycloplegic refraction, echobiometry were performed. The serum levels of 25(OH)D were measured by liquid chromatographic mass spectrometry (level of insufficiency  $< 80$  nmol/L). The mean serum 25(OH)D level of all tested was 72,90 nmol/L (20 – 115; SD  $\pm 17,78$ ). Optimal levels of vitamin D had 35 (35.7%) children. The mean 25(OH)D serum level for myopia group was 69,53 nmol/L (20-115; SD  $\pm 17,55$ ), and for non-myopia group – 84,55 nmol/L (62-111; SD  $\pm 13,28$ ), (P $< 0,001$ ). Serum 25(OH)D concentration was inversely associated with axial length (AL) for the whole group (P=0,001), and this was confirmed with multiple linear regressive analysis after adjustment for age and outdoor activity (P=0,003). Myopia risk was significantly associated with lower serum 25(OH)D levels, proved with multiple logistic regression analysis, adjusted for sex and age (P=0,002) and maintained after adjustment for sex, age and outdoor activities (P=0,001). In summary, our results indicated two points. First, we established high percent of children with 25(OH)D insufficiency, which indicates the need for conducting a population study of its status among Bulgarian children. Second, lower 25(OH)D concentration in serum was associated with longer AL and a higher risk of myopia. According to our data, this appeared independent of outdoor exposure and gives scientific basis for future studies, exploring the potential role of vitamin D in myopia etiopathogenesis.

**Scientific publications and presentations:**

- Veleva N, Dimitrova G, Oscar A, et al. Vitamin D Status in Children with Myopia. Bulgarian Review of Ophthalmology 2020;64(1).

**Contract 102/2019    The role of the endocannabinoid system in metabolic and hormonal disorders in polycystic ovary syndrome**

**Research team:** Antoaneta Gateva, MD, PhD

- Prof. Zdravko Kamenov, MD, PhD, DSci
- Vera Karamfilova, MD
- Plamena Kabakchieva-Georgieva, MD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The endocannabinoid system is involved in the regulation of energy balance and ovarian function and probably in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS). The purpose of the present study is to analyze the association of anandamide (AEA) with metabolic and hormonal disorders in women with PCOS. The study included 88 women - 58 patients with PCOS (25.9±5.2 years) and 30 healthy controls (27.6±5.2 years). Further, patients were firstly divided into two groups: with obesity (BMI≥30; n=24) and without obesity (BMI<30; n=34) and after that into PCOS with android (WHR≥0.85; n=26) and gynoid fat distribution (WHR<0.85; n=32). Anthropometric, hormonal and biochemical studies were performed. AEA and SHBG levels were examined by ELISA. Patients with PCOS and healthy controls did not differ in AEA, SHBG, anthropometric and metabolic parameters. The PCOS group had an increased LH/FSH ratio (p=0.023) and increased total, free and bioavailable testosterone, FAI, DHEAS, androstenedione, 17-OH-progesterone levels (p<0.001). SHBG showed the strongest negative correlation with insulin at 120 minutes (r=-0.487, p<0.001) and with BMI, weight, waist, hip, WHR, and hirsutism. A negative correlation between AEA levels was found with glycemia at 120 minutes (r=-0.304, p=0.020) and WHR (r=-0.266, p=0.044). In the first subanalysis of the PCOS groups with and without obesity, a difference was found in most of the metabolic parameters, in the levels of LH (p=0.048), LH/FSH ratio (p=0.011), SHBG (p<0.001), FAI, free and bioavailable testosterone (p<0.001). In the second subanalysis of patients, there was a difference in the levels of AEA in the group with a gynoid type of fat distribution compared to android (p=0.020). In conclusion, AEA did not differ between healthy and patients, but a significant difference in its levels was found according to the distribution of adipose tissue in the PCOS. The association of SHBG with insulin resistance in PCOS was confirmed.

**Contract 103/2019 Assessment of regenerative processes in the basal nerve plexus after limbal stem cell and amniotic membrane transplantation using Cochet-Bonnet esthesiometry and optical coherence tomography**

**Research team:** Assis Prof. Yani Todorov Zdravkov, PhD

- Rozaliya Dimitrova, MD, PhD student

**Organization unit:** Dept. of Ophthalmology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The current study assessed the regenerative effect of limbal stem cell and amniotic membrane transplantation on corneal innervation in patients with trophic ocular surface disease. Twenty-five patients with ocular surface disease and mean age 49.12 years were included. Methods include Cochet-Bonnet esthesiometry, optical coherence tomography, impression cytology, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation, routine ophthalmic examination, questionnaire about subjective symptoms and quality of life. All patients demonstrated signs of limbal stem cell dysfunction. Impression cytology displayed conjunctivalization, lymphocytic inflammatory infiltration, epithelial xerosis in some cases. Mean corneal sensitivity was 115.84mm/grms±91.44 before treatment and 63.72mm/grms±71.50 after the surgical intervention, respectively. Wilcoxon's signed rank test demonstrated statistically significant difference between pre- and postoperative sensitivity. In three of the

patients no change in corneal sensitivity was observed. There was statistically significant decrease in corneal sensitivity with age. 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. Comparative analysis of the questionnaire before and after the intervention was conducted. Patients reported increased tolerance to work with electronic screens, phones and reading, which positively influenced their quality of life. The number of toxic topical medication was reduced. Before treatment corneal sensitivity correlated positively with symptoms such as tearing, photophobia, hyperemia and negatively with frequency of phone use and attending entertainment events. After treatment corneal sensitivity correlated with symptoms such as irritation, tearing, photophobia and hyperemia. Improvement in corneal sensitivity correlated with increased time for working with electronic screens and phones.

**Scientific publications and presentations:**

- Hristova R, Zdravkov Y, Hristova M, et al. Treatment of Limbal Stem Cell Deficiency in the Setting of Neurotrophic Keratopathy. J Int Translational Med2020;8(2):30-37
- Hristova R, Zdravkov Y, Markov G, et al. Inflammatory changes in the ocular surface of patients with persistent corneal ulcers, XIII Congress of the Bulgarian Society of Ophthalmology, Borovets, 2019

**Contract 105/2019 Tissue oxygenation monitoring in patients with severe sepsis and hypovolemia**

**Research team:** Ralitsa Georgieva Marinova, PhD

- Prof. Atanas Temelkov, MD, PhD,
- Petja Hubenova

**Organization unit:** Dept. of Anesthesiology and Intensive care, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The current study aim is to compare tissue oxygenation levels with hemodynamical monitoring and lactate levels in patients in severe shock. Methods: Study encompasses 19 patients treated in intensive unit care / ICU/ at University Hospital Alexandrovska. Ten of the patients cover the criteria for severe sepsis, the remaining nine patients have no data for septic condition. In both groups of patients tissue oxygenation levels measured with INVIOS monitor, mean arterial pressure / MAP/, oxygen saturation in mixed venous blood (SvO<sub>2</sub>) and lactate levels within 72 hours of ICU admission are compared. Results: The patients with severe sepsis have significantly lower levels of StO<sub>2</sub> in comparison with patient without sepsis. Tissue oxygenation levels correspond to the mean arterial pressure levels, oxygen saturation in mixed venous blood. StO<sub>2</sub> levels in the current study do not correlate significantly with the lactate levels in patients with sepsis. Conclusion: Near-infrared spectroscopy- NIRS as StO<sub>2</sub> levels correlate with the hemodynamical monitoring in patients with severe sepsis, but do not correlate significantly with the severity of the disease. This data might indicate that tissue oxygenation monitoring has clinical significance in patients with sepsis. Further profound studies are necessary for assessing the role of tissue oxygenation monitoring in the early phase of resuscitation in septic patients.

**Scientific publications and presentations:**



- Marinova R, Groudeva V, Krastev P. Tissue oxygenation measurement in patients with sepsis compared to the lactate levels and hemodynamical monitoring. Comp Rend Acad Bulg Sci 2021
- Marinova R, Temelkov AT. Tissue oxygenation monitoring in sepsis. Critical Care 2020;24(Suppl1)
- Marinova R, Temelkov AT. Tissue oxygenation monitoring in sepsis. 40<sup>th</sup> ISICEM, Brussels, 15-18 Sep, 2020

**Contract 106/2019 The role of intravascular ultrasound imaging in evaluation of degenerative pathology of the aorta**

**Research team:** Assoc. prof. Dobrin Iotkov Vassilev, MD, PhD

- Assoc. Prof. Raya Ivanova, MD, PhD
- Assist. Prof. Liliya Vladimirova, MD
- Niya Boykova Mileva - Petrova, MD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** We performed intravascular ultrasound imaging examination of aorta in 12 patients with transthoracic echocardiography (TTE) and computed tomography (CT) evidence for enlargement of the ascending aorta – diameter  $\geq 40.0$  mm. All the subjects involved signed informed consent form approved by our institution. We used a 20 MHz, Visions PV probe (Volcano Philips Corp, USA) through a 8.5 F femoral sheath. By virtue of manual pullback of the probe, the vessel was visualized through its whole length from the aortic root to the aorto-iliac bifurcation. Measurements of maximal systolic and diastolic cross-sectional area and diameters of the vessel were obtained, as well as, simultaneous recording of intra-aortic systolic (Ps) and diastolic pressures (Pd). 91% of the patients were males with mean age  $67 \pm 9.5$  years, all of them had arterial hypertension, 28.6% were with ischemic heart disease, 42.9% - with lower extremity artery disease, 42.9% were diabetics, 28.6% - smokers. Mean IVUS ascending aortic diameter was 49.6 mm. Mean values of the calculated elastic properties of the ascending aorta were as follows: compliance  $0.021 \pm 0.02$ ; strain  $205 \pm 4.3$ ; aortic stiffness index  $4.3 \pm 0.75$ ; elastic modulus  $0.31 \pm 0.05$ . On paired T-test analysis maximum ascending aortic diameter measured by CT aortography and IVUS did not differ significantly ( $t = -0.19$ ,  $p=0.985$ ). However, there was a significant difference between IVUS measurements and TTE derived diameters ( $t = 13.118$ ,  $p = 0.034$ ). On average, IVUS diameters were 4.1 mm larger than the results acquired by TTE (95% CI [14.21, 17.13]). IVUS examination of the ascending aorta provided larger diameters than the ones collected by means of TTE. However, IVUS measurements did not differ significantly from diameters derived by CT aortography.

**Contract 107/2019 The most common microbiological causes of acute purulent otitis and its complications after administration of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine**

**Research team:** Prof. Diana Petrova Popova MD, PhD, DSci

- Prof. Lena Sechanova, MD, PhD
- Assist. Prof. Milena Mitkova –

**Organization unit:** of ENT, 8 Bialo more Str., 1000 Sofia

**RESULTS:** The aim of the present study was to investigate the most common microbiological causes of acute purulent otitis and its complications after administration of the 10 valent pneumococcal vaccine, by examining the secretion from the middle ear by an ENT specialist in children with spontaneous perforation of the tympanic membrane in the course (otorrhea) or surgically taken secretion after paracentesis performed according to medical indications. In cases of uncomplicated episode of OAM, nasopharyngeal secretion is examined. In addition, the aim is to establish the sensitivity of isolated otopathogenic bacteria to antibiotics. Following the introduction of PCV10, significant changes were found in the number of major otopathogens isolated from MEF / otorrhea in children with established "severe" AOM and nasopharyngeal secretion in children with mild AOM. The role of *M. catarrhalis* as the main pathogen in our study was established with a share of 31.1% of all positive samples, compared to only 0.8% for the previous study period, and it was found that *M. catarrhalis* is a more common AOM pathogen. *M. Catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* and *H. influenzae* were found to be the most commonly isolated pathogens in the nasopharynx of children with "mild" AOM episodes compared to MEF / otorrhea samples obtained from clinically problematic cases of AOM, where *S. pyogenes* predominates. In the nasopharynx, the presence of the latter is significantly lower in children suffering from "mild" AOM than is presented in samples of MEF. This may mean that *S. pyogenes* are more likely to cause 'Severe' AOM, leading to high levels of infection, although levels of availability are low. The opposite is true for *M. Catarrhalis*, which was found in 32 of all our patients with "mild" AOM, but present in 1 of the children with "severe" AOM. In our study, no significant changes in antimicrobial susceptibility rates were observed in *S. pneumoniae* prior to PCV10 administration. 42 percent of antimicrobial insensitivity of pneumococci in Bulgaria remained high in the era after PCV10 due to the widespread prevalence of some multidrug-resistant strains, which were also found in this study. The prevalence of ampicillin-insensitive isolates of *H. influenzae* (33%) among children with AOM was comparable to that observed before universal administration of PCV10. In Bulgaria, the most prescribed antibiotics for AOM are amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid. The current prevalence levels of insensitive *M. catarrhalis* to amoxicillin and ceftriaxone (93.3% in total) and resistant *S. aureus* to amoxicillin-clavulanic acid and ceftriaxone (25%) appear to be low among children with AOM, but are justified in current observations. This study is crucial for the proper treatment orientation of children with AOM.

**Scientific publications and presentations:**

- Setchanova L, Stancheva I, Popova D et al. Bacterial Spectrum of Acute Otitis Media in Bulgarian Children during the 10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Era. *J Pediatr Infect Dis* 2020; 15(03): 135-143

**Contract 108/2019 Measuring the serum levels of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) in patients with inflammatory bowel diseases, microscopic colitis and irritable bowel syndrome**

**Research team:** Assc. Prof. Plamen Penchev, MD, PhD

- Ivan Lyutakov, MD, PhD student
- Radislav Nakov, MD, PhD
- Valentin Lozanov, PhD

**Organization unit:** Dept. of Gastroenterology, 8 Byalo more Str., 1527 Sofia

**RESULTS:** Microscopic Colitis (MC), Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are diseases of the group of inflammatory bowel diseases (IBD), and they are supposed to be multifactorial diseases that develop during an abnormal immune response to an intestinal antigen. (infection, medicine, autoimmunity and / or bile acids). Bile malabsorption (MCL). Aim: To determine the diagnostic value, sensitivity and specificity as well as cut-off limits of serum 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) as a marker of malabsorption of bile acids (MLC). In a prospective study, serum studies of 120 subjects were performed, as measured by FGF-19 using ELIZA, serum 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) at the Medical University of Sofia, MF, Department of Medical Chemistry and Biochemistry through by HPLC / LC-MS mass spectrometry, and FC was quantified by immunochromatography. Results: Median levels of C4 in IBD active were 53.1 ng/mL, IBD remission were 52.2 ng/mL, IBD after surgery were 85.7 ng/mL, IBS-D were 7.5 ng/mL, MC were 69.3 ng/mL and healthy controls were 3.7 ng/mL. We estimate a C4 cut-off of 48.9 ng/mL with 82.6% sensitivity and 84.3% specificity (AUROC, 0.89) for detecting BAM. Both C4 > 48.9 ng/mL and FGF-19 (<60 pg/mL) were found in 52.29% of the patients, compared with those 8% of patients below this C4 cut-off ( $p < 0.001$ ). Serum C4 correlated with the number of bowel movements/day ( $r = -0.709$ ;  $p < 0.001$ ) and correlated inversely with FGF-19 ( $r = -0.741$ ;  $p < .001$ ). Conclusion: Serum C4 above 48.9 ng/mL and FGF-19 below 60 pg/mL identify patients with diarrhea likely attributable to BAM with high diagnostic accuracy and they can be used as screening biomarkers for BAM in MC and IBD.

**Scientific publications and presentations:**

- Lyutakov I, Lozanov V, Sugareva P, et al. Serum 7- $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one and fibroblast growth factor-9 as biomarkers diagnosing bile acid malabsorption in microscopic colitis and inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2020.

**Contract 109/2019 Establishment of a stool bank, aiming safe and effective fecal microbiota transplantation in Bulgaria**

**Research team:** Assc. Prof. Ventsislav Ventsislavov Nakov, MD, PhD.

- Assis. Prof. Ivan Lyutakov, MD, -PhD student
- Ass. Prof. Atanaska Mitkova, PhD
- Prof. Vanya Gerova-Nankova, MD, PhD
- Veronika Petkova, PhD student,
- Silva Giragosyan, PhD student

**Organization unit:** Dept. of Gastroenterology, 8 Byalo more Str., Sofia 1527

**RESULTS:** For safe implementation and broader application of fecal microbiota transplantation (FMT), quality controlled stool banking is a must. Establishing a stool bank is a complex, time-consuming, and expensive process, making it a real challenge in an Eastern European country. We aimed to establish the first stool bank in Eastern Europe – in Bulgaria. A multidisciplinary team of gastroenterologists, microbiologist, infectionist, and geneticists was set up. We used a questionnaire based on the First European FMT Consensus in order to recruit possible stool donors. Laboratory blood and stool tests were performed on all potential donors. Between October 2018 and April 2019, 112 donor volunteers completed a questionnaire; 70 (62.5%) were excluded, mainly because of age above 50, an unhealthy BMI, and risk behavior. Forty-two (37.5%) donor candidates were invited for laboratory testing of blood and feces of which 12 (28.6%) passed this screening. Of 12 donors, 4 (33%) failed at the following screening test,

which is performed every 3-6 months. Finally, 8 (7.14%) active donors were enrolled. Ten successful FMTs were performed on patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. Even though we found many healthy volunteers, only a low percentage (7.14%) of them were suitable to become feces donors. Establishing a stool bank in Eastern European country is essential for making FMT safer and more popular as a treatment method, finding further implementation and regulation of FMT and supporting physicians offering this treatment to their patients.

**Scientific publications and presentations:**

- Nakov R, Lyutakov I, Mitkova A, et al. Establishment of the first stool biobank in Eastern Europe, aiming safe and effective fecal microbiota transplantation in Bulgaria. MD Journal, 2020; 17 (4): 111-115.
- Nakov R, Lyutakov I, Mitkova A, et al. Establishment of the first stool bank in an Eastern European country and the first series of successful fecal microbiota transplantations in Bulgaria. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021;25(1):390-396.
- Nakov R, Lyutakov I, Petkova V, et al. Establishment of the first stool bank in Eastern Europe. Helicobacter 2019 Sep 1 (Vol. 24). XXXIInd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer, Innsbruck, Austria, 5–7 September 2019
- Nakov R, Lyutakov I, Petkova V, et al. Establishment of a stool bank in a country with lower human development index. 27th United Eur Gastroenterology Week, 2019. 19-23 Oct, 2018, Barcelona

**Contract 110/2019 Screening and diagnosis of *H. pylori* infection and autoimmune gastritis and their concomitant gastric atrophy**

**Research team:** Prof. Borislav Georgiev Vladimirov, MD, PhD

- Assist. Prof. Mila Kovacheva-Slavova, MD, PhD
- Todor Angelov, MD

**Organization unit:** Department of Gastroenterology, 8 Byalo more Str., 1527 Sofia

**RESULTS:** The role of *H. pylori* (*HP*) infection and atrophic gastritis in the development and progression of inflammatory bowel disease (IBD) and chronic pancreatitis (CP) remains unknown. The aim of this study was to screen patients with IBD and CP for *HP*-infection and autoimmune gastritis (AIG), to assess gastric structure and function and the relationships between them all. We used Montreal and Cambridge classifications for IBD and CP. Screening for *HP*-infection, gastric atrophy and AIG was performed by GastroPanel, including pepsinogen-I (PGI), pepsinogen-II (PGII), gastrin-17 (G-17), *H. pylori* IgG; anti-parietal-cell antibodies (APCA) and anti-intrinsic-factor (AIF) using an ELISA method. The study included 86 persons (47 men, mean age 47.86±15.93 years): 44 with IBD; 30 with CP and 12 healthy controls. 27.27% of IBD patients and 40% of those with CP had *HP*-infection. AIG was observed in 34.09% with IBD and 46.67% with CP. Superficial *HP*-gastritis was found in 25% with IBD and 30% with CP, and atrophic gastritis - in 6.82% and 10%, respectively. We observed lowest PGI levels ( $p=0.026$ ) and highest APCA levels ( $p=0.015$ ) in IBD. Age in Crohn's disease (CD) correlated positively with G-17 and PG-I levels and negatively with AIF ( $p<0.05$ ). In CD, AIF were higher in women ( $p=0.05$ ) and correlated negatively with PGI and PGII. In CP, AIF correlates positively with G-17. Morphological changes, *HP*-infection and AIG did not correlate with IBD course; however, there was a tendency for protective effect of *H. pylori* on IBD complications.

We observed AIG more often by severe structural pancreatic changes. Patients with CP and concomitant autoimmune disease had increased risk of AIG and gastric atrophy. By iron-deficiency anaemia, we observed lower PGI, PGII and G-17 in IBD and higher *HP*-titer in IBD and CP. Proper diagnostic algorithm for *H.pylori*, AIG and atrophic gastritis allows their early diagnosis and treatment with subsequent prevention of associated malignancies and malabsorption complications.

**Scientific publications and presentations:**

- Kovacheva-Slavova M, Gecov P, Genov J, et al. Relationship between pancreatic structural changes and nutritional status by monitoring of patients with chronic pancreatitis, 52 Annual Meeting of the European Pancreatic Club, July 02-03, 2020.
- Kovacheva-Slavova M, Valkov H, Angelov T, et al. Screening for Helicobacter pylori infection and Clarithromycin resistance using real-time polymerase chain reaction. EHMSG – 33rd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer; Virtual Conference Sep 12, 2020, Helicobacter. 2020;25(Suppl.1), 4

**Contract 113/2019 Investigation of potential serum biomarkers in papillary thyroid cancer**

**Research team:** Prof. Roussanka Dimitrova Kovatcheva-Georgieva, MD, PhD

- Prof. Radina Ivanova, MD, PhD, DSci
- Assoc. Prof. Alexander Shinkov, MD, PhD
- Prof. Georgi Georgiev, MD, PhD
- Inna Dimitrova, MD - PhD student

**Organization unit:** Dept. of Endocrinology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim was to investigate galectin-3 (Gal-3), angiopoietin-1 (Ang-1), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and YKL-40 in the serum of patients with papillary thyroid cancer (PTC) and with benign thyroid nodules and to compare the levels between the two groups. Eighty patients were enrolled, 40 patients with cytological benign thyroid nodules and 40 patients with histological proven PTC. In all subjects, we evaluated the serum levels of some potential biomarkers (Gal-3, Ang-1, TIMP-1, YKL-40), using ELISA-method. There was no sex and age difference between patients with benign thyroid nodules and patients with PTC (female:male=9:1, 43.9±13.4 years in benign nodule group vs. 43.8±16.0 years in the PTC group, p=0.976). The prevalence of papillary microcarcinoma in the study was 57.5% and the prevalence of PTC with lymph node metastases – 32.5%. Serum levels of Gal-3 and TIMP-1 were significantly higher in the PTC group compared to the benign nodule group (Gal-3, p<0.001; TIMP-1, p=0.019). The levels of the other markers did not differ between the two study groups (Ang-1, p=0.473; YKL-40, p=0.445). The markers did not correlate with the PTC diameter, defined as the largest ultrasound diameter of the lesion. We found higher TIMP-1 level in PTC patients with lymph node metastases compared to those without lymph metastases (84.6±23.5 vs. 73.2±15.9, p=0.007), whereas a difference in the other markers was not established. The demonstrated up-regulated gene expression in PTC cells is a solid ground for evaluation of the gene products in the peripheral blood. This is a way to find biomarkers which could support the preoperative diagnosis of the disease. We found higher levels of TIMP-1 and Gal-3 in patients with PTC compared to the benign nodule group. New larger studies of these markers are needed, consisting patients with advanced PTC.

**Contract 114/2019 Comparison of Bone Metabolism Factors in Patients with Primary Hyperparathyroidism with and without Autoimmune Thyroiditis**

**Research team:** Assoc.Prof. Alexander Dimitrov Shinkov, MD, PhD

- Prof. Roussanka Kovatcheva, MD, PhD
- Prof. George Georgiev, MD, PhD
- Inna Yankova, MD, PhD Student

**Organization unit:** Dept. of Endocrinology, Zdrave 2 Str., Sofia, 1431

**RESULTS:** The aim was to compare the levels of some bone remodeling factors - RANKL, osteoprotegerin (OPG), IL-17A, in primary hyperparathyroidism (PHPT) with and without autoimmune thyroiditis (AT); to look for an association between the combination of the two diseases and the relationship between the studied molecules with the markers of mineral metabolism; to assess the possible overall pathogenetic role of IL-17A. Material and methods: Two hundred fifty-one patients with confirmed PHPT were admitted at USHATE for the project period. One hundred of them were included in the project - 50 with PHPT only and 50 with PHPT and AT. Two control groups were defined: 35 with AT and 35 subjects without PHPT and AT. Serum markers of mineral metabolism, RANKL, OPG and IL-17A were measured. Results: The prevalence of AT among the subjects with PHPT was 38.2% (95% CI 33-43%) and didn't differ significantly from that in the general population, 32.5% (95% CI 30-35%),  $p = \text{NS}$ . Age, BMI, markers of mineral metabolism, RANKL, OPG and IL-17A weren't significantly different in PHPT with and without AT or between the two control groups ( $p > 0.05$ ). Serum IL-17A levels were significantly higher in patients with PHPT compared to controls (31.9, 19.8-45 pmol/L vs 15.6, 3.4-28.7 pmol/L,  $U=1902$ ,  $p < 0.001$ ). RANKL and OPG in these groups didn't show such differences ( $p = 0.29$  and  $p = 0.49$ , respectively). IL-17A correlated positively with serum calcium ( $\rho = 0.325$ ,  $p < 0.001$ ), PTH ( $\rho = 0.201$ ,  $p = 0.019$ ) and RANKL ( $\rho = 0.176$ ,  $p = 0.021$ ) and negatively with serum inorganic phosphate ( $\rho = -0.273$ ,  $p < 0.001$ ). Conclusion: Higher levels of IL-17A in PHPT suggest a possible role in the PTH-induced bone remodeling. There was no evidence of an association between PHPT and AT. Further research is necessary to further clarify the problem.

**Contract 117/2019 Uromodulin – a marker for the early diagnosis of chronic kidney diseases**

**Research team:** Assoc. Prof. Atanas Ivanov Kundurdgiev, MD, PhD,

- Assist. Diyan Genov, MD
- Assist. Irena Ivanova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Ventsislava Pencheva-Genova, MD, PhD
- Assist. Anna Kostadinova, MD
- Assist. Vania Grozeva, MD
- Prof. Ognian Georgiev, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 15 Acad. Ivan Geshev Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the study was to identify the role of serum uromodulin (sUmod) as an early marker for the diagnosis of renal impairment in chronic kidney disease (CKD). 70 patients with different CKD stages at an average age of  $56.53 \pm 11.753$  years were included. The male /

female ratio was 28/42 (40.0% male, 60.0% female). Anamnesis and basic demographic data were collected. Haematological and biochemical tests and renal ultrasound have been performed. sUmod and cystatin C were measured using ELISA methods. Patients were divided into five groups according to the recommendations of KDIGO. 11 patients had CKD grade I (eGFR > 90 mL / min / 1.73m<sup>2</sup>), 17 - grade II (eGFR: 60 to 89 mL / min / 1.73m<sup>2</sup>), 6 patients - grade IIIa (eGFR: 45 to 59 mL / min / 1.73m<sup>2</sup>) and 13 patients - grade IIIb (eGFR: 30 to 44 mL / min / 1.73m<sup>2</sup>). 13 patients had grade IV CKD (eGFR: 15 to 29 mL / min / 1.73m<sup>2</sup>) and 10 patients - grade V (eGFR < 15 mL / min / 1.73m<sup>2</sup>). The mean sUmod value was 123.2367 ng / mL (2.64 to 709.64 ng / mL). sUmod decreased with increasing degree of renal impairment. Correlation analysis showed a significant negative relationship between sUmod and creatinine (r = -0.467, p < 0.0001), cystatin C (r = -0.430, p < 0.0001) and urea (r = -0.495, p < 0.0001). A statistically significant positive relationship was found between sUmod and glomerular filtration rate (r = 0.628, p < 0.0001). Our study shows a significant correlation between sUmod and all well-established markers for renal impairment. Our results confirm the usability of sUmod as a potential early biomarker for the CKD diagnostic. sUmod measurement allows early detection and treatment of renal impairment in various diseases and possibly to stop the development of the disease.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Ivanova I. Genov D. Kundurdgieva A et al. Serum uromodulin – a marker for diagnosis of chronic kidney diseases. IFCC WorldLab Congress, Seoul 2020

#### **Contract 118/2019 Investigation of serum biomarkers as predictors for response to Cardiac Resynchronization Therapy in patients with chronic heart failure**

**Research team:** Assoc. Prof. Ekaterina Ivanova Ivanova-Todorova, MD, PhD

- Ekaterina Kurteva, MD, PhD
- Prof. Dobroslav Kyurkchiev, MD
- Assist. Prof. Kalina Tumangelova-Yuseir, MD
- Georgi Vasilev, MD, PhD student
- Svetoslav Kurtev, MD
- Assoc. Prof. Dobrin Vasilev, MD, PhD

**Organization unit:** Faculty of Medicine, Department of Clinical Immunology

**RESULTS:** The aim of the study was to evaluate the serum levels of several signaling proteins involved in chronic inflammation, cardiac fibrosis, and remodeling in terms of HF and to establish if these proteins or combined panels can be markers of the response to CRT. We enrolled 81 consecutive patients (69 ± 10.11 years) with HF-REF treated with CRT as well as a control group of 20 healthy volunteers (61 ± 12 years). We quantified the serum levels of human TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, FGF-basic, and Periostin using ELISA method before CRT implantation and at six months follow-up. Response to CRT was defined as at least 5% amelioration of the initial HF-REF plus improvement by at least one functional class according to NYHA. At baseline, patients eligible for CRT had comparable serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-13 and elevated serum Periostin and FGF-basic, compared to the control group. Regarding the response to CRT, baseline serum levels of Periostin were elevated in 20 patients, with non-parametrical distribution: 1348 [771-2326] pg/mL versus 1396 [916-2313] pg/mL at follow-up, with no significant difference between responders and nonresponders. We detected a threefold higher

probability for patients with raised levels of Periostin to be nonresponders with a trend toward significance (Fisher's exact test  $p = 0.088$ ,  $OR = 3.06$ ). Baseline serum FGF-basic was elevated in 22 patients: 6,375 [1-482] pg/mL versus 4,3 [0.9-497,35] pg/mL at six months follow-up, *ns*. In search of a combined biomarker panel predicting the response to CRT, we found the following association: the "double-positive" patients for elevated levels of Periostin and FGF-basic have a ninefold higher probability to be nonresponders (Fisher's exact test,  $p = 0.12$ ,  $OR=9.1$ ). The combined serum panel of Periostin and FGF-basic in patients with HF-REF could predict the type of response to CRT. Further investigation of this biomarker panel in a large population of patients is needed to confirm this biomarker panel as a reliable marker of non-response to CRT. The precise role of Periostin and FGF-basic in cardiac remodeling also remains to be established.

### **Contract 119/2019 Hybrid methods for treatment of multilevel atherosclerotic lesions of the lower limbs**

**Research team:** Assoc. Prof. Valentin Stefanov Govedarski, MD, PhD

- Assist. Prof. Svetoslav Dimitrov, MD, PhD
- Assist. Prof. Borislav Atzev, MD, PhD
- Assist. Peio Zhivkov, MD

**Organization unit:** Department of Cardio-Vascular Surgery and Invasive Cardiology, University Hospital "Saint Ekaterina" – Sofia.

**RESULTS:** Aim of this project was to investigate hybrid methods for revascularization of multilevel atherosclerotic arteries lesions of the lower limbs. From May 2019 to February 2020 at the Clinic of vascular and endovascular surgery of "Saint Ekaterina" – University Hospital, a prospective study was conducted on 60 patients with peripheral arterial disease (PAD) and multilevel atherosclerotic pathology, diagnosed and treated by hybrid methods (simultaneous combined open surgical and endovascular techniques) for revascularization. Risks factors, type of lesions, methods and effect of treatment were analyzed. Procedures' results were evaluated technically (angiography), hemodynamically (ankle-brachial index – ABI value) and clinically. Patients were followed up to 30<sup>th</sup> postoperative day. Heterogeneous comorbidity and risk factors for atherosclerosis/PAD were recorded: hypertension (93.3%), dyslipidemia (56.7%), diabetes mellitus (43.3%), ischemic heart disease (33.3%), chronic kidney disease (15%). In more than 1/3 of the cases, atherosclerosis was multifocal accompanied with carotid (26.7%) and coronary (11.7%) pathology. 55% of patients had undergone previous revascularization of lower limbs and 66.7% of them were diagnosed bilateral lesions. Most commonly used surgical technique was thrombendarterectomy of the aorto ilio-femoral and femoro-popliteal segment (58.3%), as for the endovascular technique was femoropopliteal angioplasty (38.3%). Surgery was performed mostly for lesions with length > 20 cm and endovascular treatment for 4-10 cm. 100% technical and 96.7% hemodynamical success was recorded. Postoperatively, 3 (5%) complications were diagnosed - revascularization edema in 2 patients, hematoma - in 1. On the 1<sup>st</sup> month after the procedure persisting claudication was found in 31.7% with improvement of symptoms; in 46.7% - limb paraesthesia, in 11.7% - postoperative edema. 17 (28.3%) of the cases were without complications. Hybrid procedures provided effective treatment for multilevel atherosclerotic lesions of the lower limbs' arteries, allowing simultaneously complete revascularization. They were particularly suitable for polymorbid patients with high risk during conventional surgery.

**Scientific publications and presentations:**



- Govedarski V, Dimitrov S, Atzev B, et al. Hybrid methods for treatment of multilevel atherosclerotic lesions of the lower limbs. *Angiology and Vascular Surgery* 2020;1:28.

**Contract 94/2018    Analysis and evaluation of occupational psycho-social stress and cardiovascular risk in individuals working in significant and risky areas of social and political life****Research team:** Assoc. Prof. Rouja Ivanova Nikolova, MD, PhD

- Prof. Nevena Tzacheva, MD, PhD, DSci
- Prof. Karolina Lyubomirova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Todor Kundurdjiev, PhD
- Assoc. Prof. Yanka Prodanova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Milena Yancheva-Stoycheva
- Assoc. Prof. Iva Miteva, PhD
- Assist. Prof. Lidiya Hristova, MD, PhD
- Assist. Prof. Milena Tabanska-Petkova, MD, PhD
- Assist. Prof. Marina Samuneva-Jelijabova, MD, PhD
- Martina Hudyakova, PhD – OHS “Aktiva 1” Ltd.
- Ivayla Georgieva – PhD Student
- Tzonka Ivanova – PhD Student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Public Health, Department of Occupational Medicine

**RESULTS:** The aim of the study was to investigate the aetiological role of occupational psycho-social stress and its dependence on autonomic cardiovascular control and cardiovascular risk factors in individuals working in risky areas of socio-political life with a view to screening mechanisms, mediating and conditioning the pathogenesis of CVD and their early determination. Persons working in risky areas of social and political life were examined: physicians, nurses, military personnel, employees. The following methodologies were used: Investigation of the functional state of Cardiovascular System and autonomic cardiovascular control, using a computer diagnostic method for Analysis of Heart Rate Variability; Physical sphygmomanometric examination of arterial systolic and diastolic pressure; NIOSH methodology for psycho-social stress assessment; Medical history of cardiovascular risk factors. Work-physiological screening of risk factors was carried out in the studied groups: psycho-social, occupational and cardiovascular risk factors. Screening for physiological mechanisms that determine the origin of early forms of CVD has shown that the persistent impact of occupational and psychosocial stressors induces a process of dys-functional cardiovascular control. Stress in physicians, nurses and employees induces a process of reciprocal inhibition of parasympathetic and activation of sympathetic parts of ANS; stress in military personnel causes a process of co-activation of parasympathetic and sympathetic parts of ANS. In addition, we identified three other major functional models of inducing CVD: indirect effects of occupational stress on cardiovascular risk factors; impact of occupational stress on inducing dys-functional control; influence of identified cardiovascular risk factors on stress-induced overreactivity of sympathetic and inhibition of parasympathetic parts of ANS. The aetiological role of occupational psychosocial stress in inducing latent forms of CVD was clarified. In addition to the major physiological mechanisms, other important factors such as disturbance of baroreflex sensitivity,

lipid metabolism, thermoregulatory activity, activity of the renin-angiotensin-aldosterone system, blood pressure response, which initiate latent forms, are included.

**Scientific publications and presentations:**

- Nikolova R, Tzacheva N. Characteristics and impact of workload in medical profession. General Medicine, 2020
- Nikolova R, Tzacheva NK. Allostatic Stress Load - Modulator of the Functional Association between Autonomic Cardiovascular Control and Serum Lipids in Normal Weight and Overweight. Psychol Behav Sci Int J. 2019; 12(5): 1-5.
- Nikolova R, Tzacheva NK. The Effect of Cardiovascular Risk Factors on Metabolic Syndrome and Risk of Cardiovascular Diseases. Psychol Behav Sci Int J. 2019; 12(5): 6-11.
- Nikolova R. Stress, autonomic cardiovascular control and cardiovascular risk in high-risk professions. Faculty of Public Health, Sofia, 2019, 192 pp.
- Nikolova R, Tzacheva N, Kundurzhiev T, et al. Constructive and primary prophylaxis with investigation and determination of autonomic cardiovascular control - a mechanism for identification of early asymptomatic forms of Cardiovascular Diseases. Deontological problems in medical practice. BMA Scientific Practical Conference. Nessebar. October 24-26, 2019.

**Contract 95/2018 Investigation of pilot data collection and initial attempt to implement the European injury database in Bulgaria**

**Research team:** Assoc. Prof. Petya Dimitrova Trendafilova-Vancheva, PhD

- Prof. Antoniya Yanakieva, PhD
- Assist. Prof. Nikpleta Leventi
- Assist. Prof. Kremena Ivanova
- Assist. Prof. Svetlin Georgiev
- Assoc. Prof. Stefan Velikov, PhD
- Assist. Prof. Stamatios Priftis

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Public Health, Department of Health Care

**RESULTS:** The aim of this study is to collect data on injuries in Bulgaria and the circumstances that have resulted in injuries that are comparable to data collected from other EU countries. In retrospect, data were collected on the pilot injury data in the two largest emergency centers in the capital and the country: • UMHATEM "N. I. Pirogov" EAD for the period 01.01.2013 - 15.10.2018 and • UMHAT "Saint Anna" - Sofia AD - all data on fatal and non-fatal injuries for the whole year 2017 were collected (the period 01.01.2017-01.01.2018). A unified set of elements was used - the so-called. IDB-FDS Data Dictionary specially designed to record injury data at emergency care clinics with the least level of ability to be collected in hospitals with a particular interest in injury research and injury prevention. The results show that in 2017 3823 patients + 142 deceased patients (3965 in total) were hospitalized at Saint Anna Hospital - Sofia AD for the same year. For comparison, the largest emergency center in the country for 2017 hospitalized 17,886 patients, or approximately 4.51 times more patients. In terms of the nature of mortality for the analyzed period and for the particular medical institution with the highest mortality, there are Intracranial injuries, Head injuries, as well as Injuries of the hip and lower leg, of which Fractures. Injury data were analyzed - with regard to the relevance of the topic and

the consequences of the occurrence of the injury, its scale, nature and specificity. A profile of traumatism in Bulgaria has been prepared, which to a large extent has a preventive and prophylactic value, following patterns and trends.

**Scientific publications and presentations:**

- Trendafilova P, Kundurdjiev T, Priftis S. Prevalence of childhood injuries. Sestrinsko delo. 2019.
- Trendafilova P, Kundurdjiev T. Injury as a Cause of In-Hospital Treatment. Health Care 2019: 4.
- Trendafilova P. Types of patients' injuries admitted for in-hospital treatment. Sestrinsko delo. 2019.
- Trendafilova P, Velkova A. Working towards more effective policy approach about road safety in Bulgaria, European Journal of Public Health, 2018;28(suppl 4)
- Trendafilova P, Priftis S, Yanakieva A. A Pilot Collection of Data about Injuries in Bulgaria. Third National Conference of the Bulgarian Scientific Society of Public Health „Public Health – the Capital of the Future“. Plovdiv, 30 May–01 June 2019.
- Trendafilova P, Leventi N, Yanakieva A. Road traffic injuries: A need for continuous monitoring and prevention. Second National Conference of the Bulgarian Scientific Society of Public Health „Public Health – a Global Priority in Science and Practice“, Stara Zagora, 14-15 June 2018.
- Trendafilova P, Velkova A. Working towards More Effective Policy Approach about Road Safety in Bulgaria. 11th Eur Public Health Conference ‘Winds of Change: towards new ways of improving public health in Europe’. 28 Nov - 1 Dec 2018, Ljubljana, Slovenia.

**Contract 96/2018      Development of new digital materials for bioethics training in Bulgarian kindergartens and schools**

**Research team:** Prof. Antoniya Iordanova Yanakieva, PhD

- Prof. Krasimira Markova, PhD
- Assoc. prof. Alexandrina Vodenitcharova
- Assoc. prof. Kristina Popova, PhD
- Prof. Mariela Janeva-Deliverska, PhD, DSc
- Assist. Prof. Antoniya Trendafilova, PhD
- Assist. Prof. Svetlin Georgiev, PhD
- Assist. Prof. Ani Miteva, PhD
- Assoc. prof. Iva Miteva, PhD
- Assoc. prof. Vanina Alakidi, PhD
- Assist. Prof. Vlayko Vodenitcharov, PhD
- Assist. Prof. Todor Dimitrov, PhD

**Organization unit:** Department of Health Technology Assessment, 8 Byalo more Str., 1427 Sofia

**RESULTS:** The objective of the project is to develop digital educational materials for children between the ages of 3 -5 years adapted for national, cultural, social, and national case studies for preschool and school-age children. The methods that have been used include pedagogical

methods, interviewing and observation as well as a documentary method. During the project were held meetings with teachers from preschools and schools, were discussed the methodology and the development of case studies on bioethics for the various age group. On meetings with Mrs. Denitsa Sacheva, Deputy Minister of Education and Science, as well as Mrs. Vanya Kastreva-Monova, Director of Regional Governance of Education in Sofia were discussed the opportunity to implement this education as mandatory part of the kindergarten and school curriculum. The project included three short films for children between the ages of 3 and 5 years and a guide with case studies. A lecture program was developed to train teachers of children and teachers of students in kindergartens and schools. Education in bioethics contributes to increase the sensitivity for responsibility and empathy in children. Implementation in education as obligatory term will impact positively on enrichment students' knowledge in Bulgaria and they will build better personal ethics. The bioethics program for teacher training is based on problem-based learning that has proven its advantages for ages. Self-learning skills, teamwork, thinking hierarchy, problem solving, self-confidence, and lifelong learning are just some of the benefits and in-depth knowledge that children acquire at an early age. Also, children learn to transfer all these skills in solving professional and personal problem situations. Case resolution requires critical and analytical thinking, including flexibility in seeking more alternatives to find better solutions to ethical and moral issues.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Yanakieva A, Vodenitcharova A, Popova K. Implementing of Education In Bioethics at Contemporary Schools in Bulgaria, UNESCO Chair in Bioethics 13th World Conference Bioethics, Medical ethics and Health Law, November 27-29, 2018, Jerusalem, Israel

#### **Contract 97/2018    Research on personal responsibility towards own health of physicians and healthcare specialists in hospitals**

**Research team:** Assoc. Prof. Natalia Mihaylova Shtereva-Nikolova, DD, PhD

- Prof. Magdalena Alexandrova, PhD
- Assist. Prof. Radka Goranova-Spasova, MD, PhD
- Assist. Prof. Neli Gradinarova, PhD
- Assist. Prof. Emilia Naseva, PhD
- Tihomira Petrova, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Public Health, Department "Medical ethics and law"

**RESULTS:** Personal responsibility for health is the realization that each individual has not only rights but also obligations towards his or her own health. The health of medical staff affects them, their families, their professional duties and patient's care. The purpose of this study is to investigate personal health responsibility among 518 hospital healthcare staff and to develop methodical recommendations and guidelines to improve their own health status. A direct, anonymous, survey was conducted with patients working in hospitals with a specially designed questionnaire. The sample includes: physicians (n = 257) and healthcare specialists (n = 261) working in seven hospitals divided into four groups: by sex and by professional field. Documentary, sociological and mathematical-statistical methods were used. 22.1% of all respondents do not visit their GP at all, 15.6% do not go to prophylaxis and 11.8% do not do prophylactic tests. 73.9% of them are convinced of the relationship between lifestyle and health. 56.7% of the investigated group indicated that they were sick for the past year, but only 23.5%

had sick leave. 45.5% assessed their health as "good". 36.4% of respondents associate personal responsibility for health with a healthy lifestyle, 31.6% with the health system. According to physicians and healthcare specialists (77.7%) the responsibility for health should be shared between the state and the people. From the study of the problem it has been found out that health workers often overlook their physical, emotional and social condition, which is related to their nature of work. A healthy lifestyle must be recognized as a health need, and this would be a useful investment for healthcare systems. A better understanding of issues concerning personal responsibility is an important aspect of policy assessment aimed to face the challenges of the contemporary healthcare.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Shtereva-Nikolova N, Goranova-Spasova RN, Naseva EK, et al. Self-Assessment Of Physicians' and Healthcare Specialists' Health, Occupational Medicine and Work Ability, Issue 1/ 2019,
- Shtereva-Nikolova N, Goranova-Spasova R, Naseva E, et al., Physicians' And Healthcare Specialists' Behavior Towards Their Own Health, J of IMAB. 2018, Oct-Dec;24(4):2241-2244
- Shtereva-Nikolova N, Goranova-Spasova RN, Niniva M. Risk Behavioral Factors among Medical Staff in Hospitals, in 42-th Science and Technology Session Contact 2018, Publ. Tempo, Sofia, 2018, pp 216-222
- Shtereva-Nikolova N, Goranova-Spasova RN, Gradinarova NP, et al., Personal responsibility for health - essence, arguments "for" and "against" and factors of influence, Health Policy and Healthcare Management, 2018, issue 18, № 3, pp 39-41
- Shtereva-Nikolova N. Methodological recommendations and guidelines for improving the health of the medical staff, Print: ID Print, Sofia
- Goranova-Spasova R. Information brochure "My health is important to me!"
- Shtereva-Nikolova N, Goranova-Spasova RN, Niniva M, Risk Behavioral Factors among Medical Staff in Hospitals, in 42-th Science and Technology Session Contact 2018, Sofia, 26/10/2018, Sofia
- Shtereva-Nikolova N, Goranova-Spasova RN, Naseva EK, et al., Self-Assessment Of Physicians' and Healthcare Specialists' Health, First Congress On Occupational Medicine And Expertise Of Work Ability With Epsilon Project International Conference, 07 - 08 November, 2018, Sofia, National Palace of Culture, Hall 6

#### **Contract 98/2018 Improvement of the access to ethics committees through training of medical specialists and patients in healthcare establishments in Bulgaria**

**Research team:** Prof. Tihomira Zlatanova Zlatanova, MD, PhD

- Prof. Tihomira Zlatanova, MD, PhD
- Prof. Magdalena Alexandrova, PhD
- Assist. Prof. Neli Gradinarova, LL.M, PhD
- Assoc. Prof. Natalia Shtereva-Nikolova, PhD
- Assist. Prof. Radka Goranova-Spassova, PhD
- Assist. Prof. Emilian Radev, PhD
- Kalina Peycheva, PhD, PhD student

- Genoveva Bakardjieva - PhD student
- Silvia Ivanova, student

**Organization unit:** Faculty of Public Health, 8 Byalo more Str., Fl. 4, 1527 Sofia

**RESULTS:** The aim of the developed and implemented project is to improve the awareness among health professionals and patients about the ethics committees and, as a result, to create an objective prerequisite for their more efficient functioning. During the project realization, six tasks were carried out, using didactic, sociological and mathematical-statistical methods. By means of the didactic method, two information manuals were developed and printed, one for medical specialists and the other for patients. Training seminars and questionnaires studies were implemented in three medical institutions in the country. The survey was taken in the period from 01.07.2018 to 01.09.2018, with 213 medical specialists and 252 patients being inquired. Over 80% of the surveyed medical specialists and 78.8% of the surveyed patients believe that the dissemination of information guides on existing ethics committees is useful. 33.8% of medical professionals and 23.8% of patients are of the opinion that training of medical professionals on ethics committees is imperative, 38.5% of medical professionals and 48% of patients believe that further training would be very useful for both medical professionals and ethics committees themselves. Analyzing the results of the survey, it is evident that despite the information campaign and the improved awareness among the medical specialists and the patients in the country, they remain poorly informed about the existing and functioning ethics committees. There is no awareness of the problem, the majority of the respondents believe that additional information is not only necessary, but also imperative but still a large percentage of the surveyed medical specialists and patients show lack of initiative and motivation to learn in such additional training. It is necessary to continue to carry out such information campaigns at national level. Most of the information is a guarantor of the better functioning of ethics committees, greater continuity among committee members, facilitating the work of medical professionals, and better protection of patients' rights.

**Scientific publications and presentations:**

- Ethics committees in healthcare, Information brochure for patient, Sofia 2018
- Ethics committees in healthcare, Information brochure for medical specialists, Sofia 2018
- Gradinarova N, Radev E, Aleksandrova M, The need for a change regarding Ethics committees in healthcare establishments, "The Interdisciplinary Idea in Action" (collection of articles), prof. Teodor Popov and prof. Niagol Manolov, TEMTO Publishing House, 2018, p.263-267
- Gradinarova N, Radev E, Shtereva-Nikolova N. Medical Specialists and ethics committees in Healthcare Establishments in Bulgaria. J of IMAB. 2019 Jan-Mar;25(1):2447-2451.

**Contract 99/2018 Awareness and training of nurses and nursing students about aggression and violence in health care**

**Research team:** Prof. Galina Stamova Chaneva, PhD

- Prof. Antonia Ianakieva, PhD
- Assoc. prof. Nadka Vasileva, PhD
- Assoc. prof. Antoaneta Ilieva, PhD
- Assoc. prof. Pepa Bikova-Ivanova, PhD

- Assist. prof. Petia Kantareva, PhD
- Assist. prof. Stefka Georgieva - Gurbeva, PhD
- Assist. prof. Svetlin Georgiev, PhD
- Assist. prof. Kamelia Bogdanova, PhD
- Tania Popova, - PhD student
- Dimitrina Iordanova, PhD student
- Ivanka Milotina
- Assist. prof. Anuchka Dimitrova, PhD
- Nadia Manolova
- Assist. prof. Miloslava Ilieva, PhD
- Nasi Georgieva, student
- Evgenia Izvorska, student
- Stanislava Aidarova, student
- Virginia Vasileva, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Public Health

**RESULTS:** Aggression often occurs in situations where the patient's needs are not fully satisfied and anger and frustration arise. The emergence of aggression is related to the complex interaction of interpersonal factors. The purpose of the study is to investigate the awareness of nursing nurses and nursing students about the emergence of aggression by the patient and the development of a manual for professional behavior of nurses to assess the risk of aggression and violence in health care. An anonymous questionnaire was conducted by 200 nurses from four university hospitals in Sofia and 150 students from the Faculty of public health of MU - Sofia - specialty "nursing" in 2018 and 2019. The results show that the nurses and students are informed about the violence and aggression, but they need training on the use of communication strategies for aggressive behavior by the patient. It is necessary to introduce procedures for assessing the risk of aggression and the establishment of an organization for professional behavior of the staff. According to the nurses and students, patients show rather nonverbal aggression during the performed manipulations and research. A leading factor for aggressive patient behavior is the disease process and the discrepancy between patient expectations and hospital reality. Experts consider that the developed manual for nurse professional conduct in aggressive behavior by the patient is sufficiently informative and specific to enable staff to make adequate decisions in such situations.

**Scientific publications and presentations:**

- Tchaneva G, Bikova P, Bogdanova K. Competence of nurses to deal with violence and assess the risk of aggressive behaviour, Health care, 2/2019
- Chaneva G, Georgieva St, Popova T, et al. Training needs of nurses to deal with situations of aggressive behaviour, Journal of Nursing 2/2019
- Vasileva N, Terzieva A, Blagoeva D, et al. Awareness nurses and students about violence and aggressive behaviour, Health of science, 1/2019

**Contract 100/2018 Awareness and training of midwifery students and midwives to assess the risk of postpartum depression**

**Research team:** Assoc. prof. Delyana Petrova Hadzhideleva, PhD



- Assoc. prof. Daniela Gavrailova, PhD
- Assist. Prof. Aleksandra Traikovska-Dimitrova, PhD
- Assist. prof. Tanya Angelova, PhD
- Boryana Simeonova, PhD
- Antoaneta Dimitrova
- Iliana Sokolova
- Nino Koleva, student
- Denica Petkova, student
- Viktoria Karanesheva, student

**Organization unit:** Department of Health Care, Bialo more 8 Str., Sofia 1527

**RESULTS:** Postpartum depression is a socially significant and health problem, often leading to a serious impairment of the quality of life, not only of the mother but also of the family. Untreated depressive disorders pose a risk of recurrent illness and are related to long-term cognitive, emotional and behavioral problems in children. Midwives play an important role in maintaining both the physical and mental health of future mothers. In modern obstetric care, methods and means for early identification of the symptoms of emotional instability of the mother and prevention of postpartum depression are sought. The aim of the study is to train midwifery students and midwives to early identify psychosocial and emotional behavioral problems in nursing mothers by conducting a screening method for assessing the risk of postpartum depression and applying adequate targeted obstetric care. An anonymous questionnaire of 100 mothers was conducted at the Specialized obstetrolgy hospital- Sofia, Specialized obstetrolgy hospital "St. Sofia", Specialized obstetrolgy hospital "Sheinovo", 50 midwives from the maternity services in the same hospitals in Sofia and 60 students from the Faculty of Public Health of MU - Sofia - specialty "Midwife" in 2018 and 2019 in the period from February 2018 - April 2019. The results of the study of the mothers show the positive influence of their psychological preparation during pregnancy, such as the prevention of emotional and behavioral disorders in the postpartum period. Midwives are of the opinion that midwifery care in the prenatal and postpartum period is a prerequisite for the effectiveness of prevention and has a positive attitude towards improving their professional competencies through postgraduate training courses to conduct screening programs to assess the risk of postpartum depression. The analysis of the students showed that the training has led to the formation of knowledge and skills for recognition and early identification of the symptoms of postpartum depression and the application of effective and adequate care in their future practice

**Scientific publications and presentations:**

- Hadzhideleva D, Dimitrova A, Sokolova I, et al., Relationship between psychoprophylactic during pregnancy and postpartum behavioral disorders, In: Second Scientific Conference with International Participation "Health - Challenge to Healthcare Professionals", Vratsa 29-30 November 2018

**Contract 101/2018 Investigation and management of health risk of sensitization to relevant dental materials among dental students from the Medical College "Iordanka Filaretova" - MU – Sofia**

**Research team:** Assoc. Prof. Maya Grigorievna Lyapina, MD, PhD

- Prof. Angelina Kisselova-Yaneva, DDS, PhD, DSci

- Prof. Karolina Lyubomirova, MD, PhD
- Assoc. Prof. Maya Vizeva, PhD
- Assoc. Prof. Todor Kundurzhiev, PhD
- Prof. Mariela Yaneva – Deliverska, PhD, DSci
- Assit. Prof. Spartak Yanakiev, DDS, PhD
- Assoc. Prof. Jordan Deliverski - UniBit, Dept. of National security
- Atanas Stoimenov, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Medical College “Iordanka Filaretova”, MU – Sofia

**RESULTS:** Sensitization to metals and methacrylic monomers is a significant problem in occupational exposure in dental technician practice. The aim of the present study was to evaluate the risk of sensitization to ingredients of relevant dental materials during the course of practical training of dental technician students at the Medical College "I. Filaretova", Medical University – Sofia, and to elaborate a complex program for its prevention and management. Skin patch testing with allergens relevant with the materials used during the practical training of dental technician students - metals and methacrylic monomers was performed among 150 individuals (38 – 1st, 40 – 2nd and 38 – 3rd year of education dental technician students); 34 students without exposure occupational to the selected allergens served as controls. Through questionnaires data on family history of allergic predisposition and previous occupational exposure to allergens were collected. Fisher Exact Test ( $p < 0.05$ ) and Chi square test and were used in data analysis. During the educational course of dental technician students, a clear tendency of increase of the incidence of sensitization to nickel (1st year of education - 10.5%, 3rd year - 36.8%), cobalt (1st year 13.2%, 3rd year - 39.5%) and palladium(II)chloride (1st year - 10.5%, 3rd year - 26.3%) was established. For the whole population, highest is the incidence of positive reactions to sodium tetrachloropalladate(II) hydrate – 30%, being the highest recorded among the 2nd year of education students – 57.5%. High is the incidence of sensitization to more than one metal allergen, being highest among 3rd year of education dental technician students (78.9%). In conclusion. high and increasing risk of contact sensitization to metals relevant for dental technician students during their practical training was established. We could point out sodium tetrachloropalladate(II)hydrate as a sensitizer major of major importance, probably due to the higher sensitivity of this test salt. A handbook presenting information about the sensitization potential of the materials used during the practical training of dental technician students, the results of the study and a comprehensive prevention program was produced. The scientific results from the study may serve as theoretical justification and practical application of adequate preventive measures, both in occupational and non- occupational exposures to products containing the investigated by us agents. This will provide better occupational, medical and socio-economic prognosis and objective health status.

**Scientific publications and presentations:**

- Lyapina M, Moskova M, Kostova – Kamburova N, и et al. Contact sensitization to methacrylic monomers among students of specialty "Dental technician" - preliminary results. Sixteenth Jubilee National Scientific Session for Students and Teachers, MU-Pleven, 29-30 Oct 2018,
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to ingredients of dental materials among dental technician students from Medical College "Yordanka Filaretova" - preliminary results. First Congress on Occupational Medicine and Expertise of ability with an International Conference on EPSILON Project, Sofia, 07-08 Nov, 2018

- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to methacrylic monomers among dental technician students in relation to duration of educational exposure. J of IMAB. 2019;25(2):2526-2531.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to metals among dental technician students in relation to the duration of educational exposure. 29th Annual Assembly of IMAB. Varna, Bulgaria. 9- 12 May 2019.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K, et al. Contact sensitization to methacrylic monomers among dental technician students in relation to duration of educational exposure. 29th Annual Assembly of IMAB. Varna, Bulgaria. 9- 12 May 2019.
- Lyapina M, Kundurzhiev T, Lyubomirova K. Contact sensitization to metals among dental technician students in relation to duration of educational exposure. Journal of IMAB 2021;27(3):3835-41.

**Contract 102/2018 Investigation of the possibilities of using computing and communication technologies in healthcare training in Affiliate "Prof. Dr. Ivan Mitev "- Vratsa**

**Research team:** Prof. Ralitsa Zlatanova Zlatanova-Velikova, MD, PhD

- Assoc. Prof. Pavlinka Dobrilova, PhD
- Assoc. Prof. Stefan Velikov, PhD
- Assoc. Prof. Kalina Stefanova, PhD
- Assoc. Prof. Galya Yankova, PhD
- Miroslava Kostadinova, student

**Organization unit:** MU - Sofia, Vratsa, Department of Health Care

**RESULTS:** Motivation is a major factor influencing the quality of learning. The use of analytical methods to determine student's motivation allows an objective and evidence-based impact on motivation by introducing ICT into healthcare education. The study was conducted during the summer semester of the academic year 2017/2018 in the branch "Prof. Dr. Ivan Mitev", Vratsa, Medical University - Sofia. The subject of the study is the capabilities of information and communication technologies in healthcare education. The study covered 300 students from the professional healthcare department, of which 200 are trained in the nursing specialty, 70 are in the "midwifery" specialty and 30 students are in the "medical assistant" specialty, trainees in "Prof. Dr. Ivan Mitev"- Vratsa After the review of the current situation and the perspectives for the introduction of an e-learning content on "Health care", the following conclusions are made: Development of the information and the communication technologies, a priority for health care teachers. More of the students (85,3%) who have need to use an e-learning content in the subject "Health" care. In the existing need of an e-learning content, only more than half of the respondents (54,4%) said that during the training they did not use an electronic textbook on "Health care", and 13,3% of them used an electronic edition in a foreign language. To satisfy the need of an e-learning content about "Health care", it is a necessary to create a team of teachers to develop teaching materials and to entry into a self-training platform. As a result of the project, the team has prepared: rules and techniques for parenteral drug delivery as part of a practical guide to nursing care. The introduction of interactive teaching methods by improving the material and technical reduces the role of the teacher as 'Instructor' on

account of this as a "facilitator". In the context of an information society, the timely updating of knowledge is crucial for the professional realization of the personality.

**Scientific publications and presentations:**

- Dobrilova P, Yankova G, Zlatanova-Velikova R. The information and communication technologies – contemporary challenge for the education in health care. Int Sci Publications: Educational Alternatives, 2018;16:287-293;
- Yankova G, Dobrilova P, Stefanova K. Research of the students satisfaction from the quality of training in an affiliate „Prof. dr. I. Mitev” to Vratsa at medical university in Sofia, Int Sc Publications: Educational Alternatives, 2018;16:294-302;
- Stefanova K, Dobrilova P, Velikov S. Opportunities for implementation of information and communication technologies in the healthcare education, International Scientific Publications: Educational Alternatives, 2018;16:309-313
- Velikov St, Zlatanova-Velikova R, Dobrilova P. The Teachers Opinion About Introduction Interactive Methods in Training Of Medical Specialists, Journal Of Educational And Instructional Studies In The World, May 2018;(8 Issue 2):8-13
- Zlatanova-Velikova R, Velikov St, Dobrilova P. The interactive methods of training through the eyes of specialty "nurse" students, 52nd Days of preventive medicine, 25-28 Sep 2018, Niš, Serbia
- Velikov S, Zlatanova-Velikova R, Stefanova K. The interactivity and motivation for training, 52nd Days of preventive medicine, 25-28 Sep 2018, Niš, Serbia

**Contract 87/2019 Motivation of parents for prevention of oral diseases of their children through educational site****Research team:** Prof. Rositsa Kabakchieva, PhD

- Assoc. prof. Natalia Grantcharova, PhD
- Assist. Ralitsa Bogovska-Gigova

**Organization unit:** Department of Pediatric Dentistry, G Sofiyski 1, Sofia, 1431

**RESULTS:** The aim of the present study was to assess the knowledge, attitudes and practices of mothers of children up to 3 years of age regarding oral health for their children. Under the first task, 90 mothers were studied. The results of the questionnaires showed unsatisfactory knowledge about oral hygiene, fluoride prophylaxis, risk of developing caries due to nocturnal feeding. The results showed us the need to promote the idea of creating a Dental Home. In Bulgaria, caries in early childhood is still widespread and poses a serious public health problem. Oral health promotion and oral health education among mothers are needed, as well as a national prevention program involving all medical professionals around the pregnant woman and mothers: nurses, pediatricians, obstetricians, GPs and dentists. Since we notice that digital technologies are taking over our daily lives at an extremely fast pace, we have created a website - a convenient, fast and easy way to promote oral health to mothers and pregnant women in Bulgaria and to educate them in basic care of their children regarding oral health and well-being. The results of the questionnaires on the fourth task from mothers who visited and received advice and information from our site, showed that their knowledge regarding fluoride prophylaxis, long night feeding with formula bottle, wrong eating habits and oral hygiene have increased. Our recommendations for prevention of early transmission of cariogenic microorganisms from mother to baby also give good results - the number and the percentage of mothers who are careful not to infect their children with caries-causing bacteria has increased by almost three times compared to the control group of mothers. Young mothers' knowledge of early childhood caries has also increased significantly since visiting the Dental Home website.

These data give us reason to believe that online type of health education program is useful and needs continuous development and promotion among the public.

**Scientific publications and presentations:**

- Bogovska-Gigova R, Kabakchieva R. Dental Home – contemporary concept for early primary oral prophylaxis of children up to 3 years old – review. Problems of dental medicine, 2019; 45(2):53-61.

**Contract 97/2019 Influence of ethical aspect on the motivation of medical professionals to work in the Republic of Bulgaria****Research team:** Prof. Mariela Svetoslavova Yaneva – Deliverska, LL.M, MPH, Ph.D,D.Sc.

- Assoc. prof. Evgeni Ivanov, PhD
- Assoc. prof. Alexandrina Vodenitcharova, PhD

- Assoc. prof. Desislava Todorova, PhD
- Prof. Tsvetomir Dimitrov, PhD
- Assoc. prof. Tsvetelina Mihaylova, PhD
- Assistant Neli Gradinarova, PhD
- Dimitrina Jordanova, PhD student,
- Alexandrina Stoyanova Stoyanova – student

**Organization unit:** Faculty of Public Health, 8 Byalo more Str. Sofia, 1527

**RESULTS:**The aim of the project is to increase the motivation among medical specialists by focusing on the ethical aspects of their work and as a result to create a prerequisite for more efficient functioning of the medical establishments and for the realization of medical specialists in the Republic of Bulgaria. The research methods used in the project are descriptive method, analytical method, didactic method, sociological method, mathematical and statistical methods. The main results are: 1. A Guide “Ethical and Psychological Aspects in the Professional Practice of Medical Specialists” has been developed and published. 2. Training seminars were held in four healthcare establishment in Bulgaria concerning the ethical aspects of collective activity and motivation to work. 3. A direct individual survey of medical specialists was conducted in four medical establishments in the country. 4. The analysis of the obtained results was presented at an international and national conference, as well as publications in different periodical medical scientific editions in Bulgaria. Emotional abilities can also be developed, as can intellectual abilities. Combined methods can be used for the training of health professionals as part of a lifelong learning strategy. The juxtaposition of expectations and reality of daily work coincides completely, or for the most part, for doctors and nurses. More than half of the respondents - 53.3% agree to increase the current volume of work at pay increase and secondly 34.9% "Reduce the volume of current work at current pay", which indicates options for optimizing work in the medical establishments. The study found that organizational and ethical aspects of work, which are a function of the leadership positions, are important motivators for the staff in medical establishments. On that basis of the completed project, it can be concluded that there is a need to introduce ethical rules of conduct as part of the value standards, in the context of the rights and duties of medical professionals.

**Scientific publications and presentations:**

- Vodenitcharova A, Gradinarova N, Deliverska M. The role of ethical standards as a factor for better motivation among medical professionals, J General Medicine, 4/2020
- Todorova D., Mihaylova Tsv., Ivanov E. Aspects of the motivation of staff to work in medical institutions for hospital care. J Medical magazine, 2020, ISSN 1314-9709
- Mihaylova T, Ivanov E, Todorova D, et al. Ethical and Psychological Aspects in the Professional Practice of Medical Specialists. Guide. Avangard Prima, Sofia, 2019;71
- Mihaylova T, Ivanov E, Todorova D. Opportunities To Increase The Motivation Of Health Professionals Through Training. Multidisciplinary J of Science, Education and Art. USB-Blagoevgrad, 2019;427-435.
- Todorova D, Mihaylova T, Ivanov E. Influence of ethical aspect on the motivation of medical professionals to work in the Republic of Bulgaria. 53rd International Medical Conference „Progress in Medical Practice and Education in the Changing World”, 10-13.08.2019, London.

## **Contract 98/2019 Awareness and education of parents with infant children**

**Research team:** Associate Prof. Pepa Rashkova Bikova- Ivanova, PhD

- Prof. Galina Tchaneva, PhD
- Prof. Silvyia Mladenova, PhD
- Assoc Prof. Deliana Hadgideleva, PhD
- Assist Neli Gradinarova, PhD,
- Assist Petia Kantareva, PhD,
- Assist Kamelia Bogdanova, PhD,
- Dimitrina Blagoeva, PhD student
- Iliana Sokolova,
- Ivanka Milotinova,
- Margarita Stanoeva,
- Angelina Sokolova, student
- Asia Demireva, student
- Polina Georgieva, student
- Melani Voleva, student
- Silvyia Krasteva, student

**Organization unit:** Department of Health Care; 8 Bialo more Str., Sofia, 1527

**RESULTS:** The aim of the study was to establish the awareness of the parents of infant children regarding physical and neuro-psychological development and to develop training aimed at hygiene care, nutrition / breastfeeding / physical and neuro-psychological development of the infant. Using a sociological method, a survey was conducted involving 112 parents of infant children about their awareness and knowledge regarding physical development and activities, mental and psychological development, hygiene care, breastfeeding, nutrition, child rights and family responsibilities. Sixty parturients were examined for their immunoprophylaxis attitudes. Breastfeeding problems, preparation, prenatal knowledge and the first hours after birth for effective breastfeeding were examined in 682 women in the maternity ward. Experimental training of 50 parents of infants during the breastfeeding period was carried out, for this purpose a training material was prepared based on the “Standards for development and learning in early childhood: from birth to three years” developed by the country and a guide for independent preparation of parents. The participants, who were provided with informational flyers, electronic media and professional advice, all indicated that they were fully satisfied with the theoretical and practical training that was provided. Simulation games and hands-on training with mannequins and other props were highly appreciated. Survey data shows that the majority of mothers included in the survey are between 20 and 30 years old, and a significant proportion of fathers are between 31 and 40 years old. Families with a single child have a higher relative share (60.66%). Parents need focused training to gain more knowledge and build practical skills to support the infant's physical and mental development. A significant proportion of the study participants prefer personal contact with a specialist to receive support and training in child care. The awareness and preparation of the parents is crucial for supporting the child's development during the breastfeeding period.

**Scientific publications and presentations:**

- Bikova P,S. Mladenova, N Gradinarova et al. Training needs of parents of infant children. Health Care, 2020; 2

- Tchaneva G, P Bikova, K Bogdanova, et al. Awareness of parents of infant children about physical development and physical activity. *Nursing*, 2020; 2
- Hadgideleva D, G Tchaneva, I Sokolova et al. Feeding the infant during infancy - awareness and preparation of parents. *Nursing*, 2020; 2: under seal
- Hadgideleva D, I Sokolova, M Stanoeva, et al. Maternal health culture - a condition for carrying out immunoprophylaxis in the infant. *Management and Education*, 2019; 15 (5): 79-83
- Bikova P, Demireva A, Sokolova A. The need for breastfeeding training during and after pregnancy. *Management and Education*, 2019; 15 (5): 214-219
- Hadgideleva D, I Sokolova, M Stanoeva, et al. Maternal health culture - a condition for carrying out immunoprophylaxis in the infant. *International Scientific Conference "Education, Science, Economics and Technology" Burgas, June 20-22, 2019/*
- Bikova P, A Demireva, A Sokolova. The need for breastfeeding training during and after pregnancy. *International Scientific Conference "Education, Science, Economics and Technology" Burgas, June 20-22/*



## COMPETITION „YOUNG SCIENTIST” 2018-2019

### MEDICO-BIOLOGICAL AREA

### „YOUNG SCIENTIST 2018”

#### **Contract 116/2018 Molecular-genetic techniques for diagnostics of the metabolic disorders - advantages and disadvantages**

**PhD student:** Slavena Hristova Ategin

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanyo Mitev, PhD, DSc and Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**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 metabolic disorders, including sequencing for point mutations detection and MLPA analysis for large deletions/duplications on a selected group of Bulgarian patients with suspected clinical diagnosis of metabolic disorders. In addition, a diagnostic algorithm to filter and interpret the data from the next generation sequencing was selected. This study showed advantages and disadvantages of the applied methods namely Sanger sequencing, next generation sequencing and MLPA analysis. We verified the genetic cause of metabolic problems in 8 out of 10 patients (80%). Based on the Sanger sequencing we confirmed the diagnosis in 6 patients. In one of tested patients with clinical diagnosis of Wolman disease pathogenic variants in *LIPA* gene, which may explain the clinical presentation, were not detected. Based on the next generation sequencing we established the genetic cause of metabolic problems in 2 patients. By MLPA analysis we did not identify any large deletions/duplications along the *CYP21A2* gene. Based on the obtained results and the applied methods we performed an algorithm for fast and accurate diagnostics of the metabolic disorders. Adequate genetic diagnosis of the metabolic disorder in the patients will assist to choose an appropriate and successful treatment and correct medico-genetic counseling in the families.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Ategin S, Todorov T, Angelova L et al. Zellweger syndrome – genetic heterogeneity of the Bulgarian population. Third PhD symposium, Molecular biology – from the molecule to the cell and back, Sofia, 7-8 March; p. 32-33
- Ategin S, Todorov T, Ivanova M et al. First genetically proven Arginase deficiency case of Bulgarian Roma origin due to a novel pathogenic splice site variant in the *ARG1* gene. European Conference of Human Genetics 2019, Gothenburg, Sweden, June 15-18, 2019

#### **Contract 117/2018 Molecular Genetic Diagnosis of Skeletal Dysplasias and Collagenosis**

**PhD student:** Mihaela Boykova Mladenova

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanyo Mitev, DM, DSc and Prof. Albena Todorova

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 1 G Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** There were introduced and optimized the analytical methods for testing genes associated with skeletal dysplasia and disorders with aberration in connective tissue including sequencing analysis of the targeted genes and NGS. Based on the clinical data the patients were classified in 2 groups: patients with skeletal dysplasias, patients with disorders with aberration in connective tissue. The present study was focused on clarification of molecular defects along the *FGFR3*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL11A1* genes and test of copy number variation in genome. *FGFR3* gene was screened for mutations in 10 patients. In 5 patients point mutations were found (5/10 = 50%) - 3 patients with achondroplasia and 2 with hypochondroplasia. For syndromes associated with *COL11A1* / *COL2A1* genes, 2 patients were analyzed and a new non-published mutation with 3474 + 1G> A in intron 44 in *COL11A1* was detected. NGS analysis was performed in 1 patient and was identified Xq23 microdeletion- non-published variant. The clinical diagnosis was genetically proved in 5 out of 13 patients (~40%).

**Scientific publications and presentations:**

- Mladenova M, Todorov T, Grozdanova I, et al. Novel mutation in *COL11A1* gene causing Marshall-Stickler syndrome in three generations Bulgarian family. The European Society of Human Genetics (ESHG), Jun 16-19, 2018 Milano, Italy

**Contract 118/2018 Optimization of molecular-genetic methods for specific microRNAs identification in neuro-oncology and assessment the role of viral component**

**PhD student:** Emilya Krasimirova Nikolova

**PhD supervisor:** Akad. Prof. Vanyo Mitev, PhD DSc and Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave, Sofia 1431

**RESULTS:** Brain tumours are among the most aggressive and lethal cancers and, even with the current therapy, the life expectancy rarely exceeds 2 years. In the current project, we optimized the platform for miRNA expression profiling and analysed the role of the selected miRNAs in primary and secondary brain tumours. The noncoding RNAs like microRNAs are molecules that are not translated into a protein but regulate gene expression by binding to complementary sequences in the mRNA and silence its translation into proteins. In parallel, the presence of an active Human Cytomegalovirus - HCMV infection was assessed. MiRNAs were analysed by a platform using RNA column-based extraction, cDNA synthesis by reverse transcription and Taqman miRNA assay was used for expression profiling of the selected miRNAs and controls. The utilised methods for virus detection were DNA isolation with commercial kit, PCR amplification and agarose gel electrophoresis for visualisation of the obtained products. MiRNA-21 and miRNA-10 were upregulated in brain tumour patients compared to controls. miR-21 has antiapoptotic activity in glioblastoma. miR-21 targets a set of tumour suppressors and genes involved in tumour infiltration and angiogenesis. miR-10b is involved in tumour invasion and it has been studied as a therapeutic target because of its high and generalized expression in all glioma subtypes. The prevalence of HCMV active infection was 10% among the analysed patients. None of the control patients was positive for HCMV. The positive patient was with recurrent Glioblastoma multiforme - GBM. The reactivation of the virus is probably due to medical immunosuppression applied during hospitalization. Brain cancer is a disease with

extreme heterogeneity and multiple gene aberrations. The development of novel approaches to identify diagnostic and prognostic biomarkers like miRNAs and to assess the status of viral infections may result in improving the cancer management and treatment.

**Scientific publications and presentations:**

- Nikolova E, Mitev V, Todorova-Georgieva A. Role of miRNAs in Glioblastoma multiforme, III<sup>rd</sup> PhD symposium, Molecular biology – from molecule to cell and back, IMB, BAS, Sofia, Bulgaria, 07-08.03.2019
- Nikolova E, Ferdinandov D, Dimova P et al. Prevalence of human cytomegalovirus infection among Bulgarian patients with brain tumours, ESHG, Gothenburg, Sweden, 15-18.06. 2019

**Contract 119/2018 Sperm infectious status as a reproductive failure factor**

**PhD student:** Kremena Stoycheva Mesechkova

**PhD supervisor:** Prof. Vanyo Mitev, MD, DSc and Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc

**Organization unit:** Dept. of Molecular chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Sexually transmitted infections of male genital tract are major factor for idiopathic reproductive failure occurrence. Intracellular sperm pathogens, such as chlamydia (*C.trachomatis*), cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus (HSV), can alter sperm concentration, motility, viability and morphology reducing natural and assisted reproduction successfulness. The aim of this study was to detect these pathogens in patients with compromised sperm status in terms of reproductive complications. Using PCR technique we studied 140 patients having reproductive failures, of which 120 patients with sperm disorders and 20 patients with normal sperm parameters, for *C.trachomatis*, HSV and CMV presence. CMV infection was detected in 2.5% (3/120) of the patients with reproductive failure history and abnormal sperm parameters, and one (5%) *C.trachomatis* infection in the group of 20 patients with normal sperm parameters and reproductive failure history. HSV infection was not detected in any of the samples studied. Current study results compared to other data published indicate the role of CMV and *C.trachomatis* infection as a male infertility factor. Except for their significance in male infertility, asymptomatic intracellular sperm infections endanger also the health of the partner and offspring. Timely diagnostics of acute and asymptomatic intracellular pathogens sperm infection with chlamydia, cytomegalovirus and herpes simplex virus will permit the suitable antiviral and antibiotic therapy to increase the possibility of fertility restoration and long-term protection of sperm quality.

**Contract 129/2018 Identification and biochemical characterization of hydroxycinnamoylchonic acids and flavonoids from *Tanacetum vulgare* L. as potential therapeutic agents**

**PhD student:** Aneliya Mateva Vasileva

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanio Mitev, PhD, DSci and Assoc. Prof. Ivaylo Ivanov, PhD

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave Str., Sofia 1431

**RESULTS:** The effect of the crude extract from tansy on the postproline-specific enzyme activity in three human cell lines MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 was investigated. In all

the three cell lines, a concentration-dependent inhibition was observed, with the degree of inhibition in MDA-MB-231 being highest and the lowest in MCF-7. The type of inhibition of the extract on proline-specific enzyme activity in MDA-MB-231 cell lines proved to be uncompetitive. Our results show that different tansy extracts, obtained from the crude extract, have a pronounced inhibitory dose-dependent effect on the enzyme activity in the cancer cell line MDA-MB-231. The highest effect was observed using the ethyl acetate/aqueous extract of the herb. Since the proline specific enzymes are known to participate in different tumors growth, it could be concluded that the natural inhibitors from tansy have a potential to be used as therapeutic anti-cancer agents. The components in the extracts from flower of *Tanacetum vulgare L.* show high selectivity with respect to the inhibition of prolyl oligopeptidase. These inhibitors have a potential to be used as therapeutic agents at least for mammary gland carcinoma.

**Contract 130/2018 Development of a specific and sensitive method for quantitative determination of ergothioneine - potential modulator of apoptosis and the cell signaling**

**PhD student:** Yassen Georgiev Hristov

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanio Mitev MD, PhD, DSci and Assoc. prof. Valentin Lozanov, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of .Medical chemistry and biochemistry

**RESULTS:** Ergothioneine is a natural amino acid discovered more than 100 years ago that is exogenous for humans and is synthesized only in some species of mushrooms. In 2005, it was found that the human organism possesses a specific transporter protein (OCTN1) for ergothioneine and also stores for its accumulation. Ergothioneine has been found to be one of the most powerful rejuvenating antioxidants and also that it has a direct relation to the processes of apoptosis and oncogenesis. The chemical nature of ergothioneine (a zwitter ionic betaine thio amino acid) makes it an extremely complex object of analysis. In the course of realizing this project a systematic approach was used to develop an effective and practical method for the analysis of ergothioneine in real biological samples. This approach involved several steps: (a) extraction conditions optimization – utilization of water/methanol/methyltertbutyl ether system was selected as apparently best extraction conditions; (b). selection of chromatographic conditions and column – optimal results were obtained on iHILIC column 100 x 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m and mobile phases allowing operation under conditions of hydrophilic interactions; (c). choice of mass spectroscopic mode of operation – maximum sensitivity and precision of detection was obtained in positive mode of electrospray ionization, using parallel reaction monitoring. The following mass transitions  $[M+H]^+$  230.095 to  $MS^2$  - 186.105, 127.032 were used for quantification. A new original analytical method, characterized by a detection limit (LOD) of 1  $\mu$ g / kg and a limit of quantification (LOQ) of 5  $\mu$ g / kg for quantification of ergothioneine in biological samples was developed. The scope of the method was extended with the potential of histamine and histamine analysis. The method is also characterized by high performance as the analysis time of one sample including the sample preparation is less than 30 minutes. The practical applicability of the method was confirmed by the analysis of 23 samples of cultivated and wild growing mushrooms.

**Contract 131/2018 Investigation of rare variants of SHANK1 and SHANK2 genes and their association with bipolar disorder and schizophrenia in Bulgarian patients**

**PhD student:** Radosveta Dimitrova Bozhilova

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Dr. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci and Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2 Zdrave str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The members of *SHANK* gene family are candidate genes for psychiatric disorders, including schizophrenia and bipolar affective disorder (BAD). The products of these genes are adapter proteins in the postsynaptic density of synapses that interconnect receptors of the postsynaptic membrane. Six rare variants of the *SHANK1* and *SHANK2* genes, found in a previous study of the research team, have been tested within this project. 100 patients with BAD and Schizophrenia and 100 clinically healthy controls were studied by Sanger sequencing. The variants rs201299941 in exon 23 of *SHANK1*, rs782583508 and rs141184740 in 20 exon of *SHANK2* and rs150857128 in *SHANK2* exon 33 were not detected in the patient group and control group. The variant rs200473891 in *SHANK1* exon 22 was observed in two of the controls and was not detected in patients. The variant rs117843717 in *SHANK2* exon 30 was found heterozygous in 4 patients and 2 controls. Both variants showed no statistically significant association with BAD and schizophrenia. The results of this study helped for better elucidate the role of the studied variants in *SHANK1* and *SHANK2* in the pathogenesis of psychiatric illnesses. In addition, they gave the possibility to determine the frequencies of the investigated variants in controls from the Bulgarian population.

**Scientific publications and presentations:**

- Bozhilova R, Penchev M, Beltcheva O, et al. Rare genetic variants in SHANK1 and SHANK2 genes found in Bulgarian patients with schizophrenia and bipolar disorder, poster presentation, The European Human Genetics Conference, June 15-19 2019, Gothenburg, Sweden

**Contract 132/2018 To investigate the role of protein kinase PKC alpha in BMP4-induced to odontoblast differentiation heterogeneous cells isolated from normal human apical papilla**

**PhD student:** Assist. Prof Violeta Stefanova Dimitrova

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanyo. Mitev, PhD, DSci

**PhD consult:** Assist. Prof. Antonia Isaeva, PhD

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, str.Zdrave 2, Sofia 1431

**RESULTS:** Gene expression of PKC alpha in the subpopulations studied is phenotypically specific, with the highest CD105<sup>+</sup>/STRO-1 subpopulation protein levels, and the lowest CD 105<sup>+</sup> / STRO-1<sup>+</sup> subpopulation. The expressed isozyme is functionally active in all three subpopulations studied and its localization is strictly cytoplasmic, but its activity is phenotypically specific, with the highest activity being PKC alpha in CD105<sup>+</sup>/STRO-1 subpopulation, and the weakest activated in CD105<sup>+</sup> / STRO-1<sup>+</sup> subpopulation. Osteoinductive growth factor BMP4 suppresses the activity of PKC alpha in CD 105<sup>+</sup>/ STRO-1<sup>+</sup> and CD105<sup>-</sup>/STRO-1<sup>+</sup> subpopulations without affecting its protein expression and decreases protein

expression of PKC alpha in the CD105<sup>+</sup>/STRO-1 subpopulation, without affecting its activity, which clearly demonstrates that BMP4 transduces phenotypically-specific signaling pathways in the subpopulations studied. The presence of phosphorylation of Ser-657 from the PKC alpha structure indicates that the isozyme is functionally active and is involved in regulating the cell cycle of exponentially autocrine growing cells. Considering that PKC alpha is well established and a known active participant in the signal transduction control of cell proliferation on the one hand, and on the other hand that the cell cultures studied are autocrine exponentially growing, it can be assumed that in the three phenotypically different subpopulations, PKC alpha is a functionally significant participant in the autocrine regulation of their proliferative activity, whereas a response induced by their BMP4 treatment revealed decreased expression of PKC alpha in the CD105<sup>+</sup>/STRO-1 phenotype at baseline that which is also reported decreased levels of phosphorylation here, while the other two studied phenotype, reduced its degree of phosphorylation is due to changes in its regulation. The reported negative effect on isozyme activity could be explained by the well-proven role of BMP4 as an inducer to osteogenic / odontogenic differentiation of mesenchymal stem cell phenotypes from the histological composition of other tooth structures, namely the action of BMP4 in the treated phenotypes could be associated with the induction of the transition from proliferation to osteogenic / odontogenic differentiation. In favor of this hypothesis is the fact that PKC alpha suppresses osteoblast differentiation but supports the proliferation of osteoblast cells, suggesting that the decreased activity of the isozyme may be related to the transition to odontoblastic differentiation. The BMP4-induced inhibitory effect manifested itself with varying strengths in examined cell subpopulations, demonstrating that BMP4 was transduced there in by phenotypic-specific signaling pathways.

**Contract 133/2018 Cytotoxic effects and oxidative stress of doxorubicin, loaded in chitosan-alginate particles on H9c2 cell line**

**PhD student:** Yordan Ivanov Yordanov

**PhD supervisor:** Prof. Virginia Tzankova, PhD & Prof. Krassimira Yoncheva, PhD

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Dunav 2 Str., Sofia 1000

**RESULTS:** The resulting experimental data show that loading of doxorubicin in chitosan-alginate particles results in a decrease of its cytotoxic effects on mouse cardioblasts, compared to conventional doxorubicin in solution. At concentrations at which doxorubicin causes medium cytotoxic effects on mouse cardioblasts, not exceeding 50% cytotoxicity, chitosan-alginate loading does not change in a pronounced manner the magnitude of the cytotoxic effects. In subcytotoxic concentrations conventional doxorubicin induces prooxidant process, accompanied by a decrease in the ratio GSH:GSSG (reduced to oxidized glutathion). The application of chitosan-alginate particles alone causes weak cytotoxic effects at the highest concentrations and longer treatment times, while at lower concentrations they cause an increase in the ratio GSH:GSSG, which is an indication of an antioxidant effect. Loading of doxorubicin in chitosan-alginate particles elicits protective effects on the viability of cardioblasts at high, cytotoxic concentrations. At concentrations, causing subcytotoxic effects, loading in chitosan-alginate is accompanied by protective effects against GSH depletion, caused by doxorubicin. The observed effects are probably due to the antioxidant properties of the drug carrier used. This supposition is

based on scientific reports of the ability of antioxidants to elicit cardioprotective effects against doxorubicin caused-toxicity. Based on our research, we report that doxorubicin loading in chitosan-alginate particles has protective effects on H9c2 cells – a model of cardiomyocytes, by lowering the cytotoxicity of doxorubicin at high concentrations and improving the antioxidant status at low concentrations.

**Scientific publications and presentations:**

- Yordanov Y, Tzankova V, Aluani D, et al. Protective effects of chitosan-alginate particles, loaded with doxorubicin in vitro. 7th Congress of Pharmacy with international participation, 21-23 November 2019, Borovets, Bulgaria.

**Contract 134/2018 Expression analysis of key genes related to tumor immune surveillance in lung cancer**

**PhD student:** Veronika Jordanova Petkova

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanio Mitev, DSci and Prof. Radka Kaneva, PhD

**Organization unit:** Dept. of medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** PD-L/PD-L1 interaction is the major pathway for tumour immune surveillance. It is prerequisite for the establishment immunotherapy for cancer treatment. The aim of the present study was to analyse and compare the expression of PD-L1 and STAT3 in ADC and SCC samples in order to assess their potential role of predictive biomarkers for response to immunotherapy. Fresh frozen tissue samples from 50 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (25ADC, 25SCC) and adjacent normal tissues were examined. The expression of PD-L1 and STAT3 were evaluated by RT-qPCR. The statistical analysis was performed by SPSSv20. We found overexpression of: PD-L1 in 24% (7ADC, 5SCC), and of STAT3 in 20% (7ADC, 8SCC), of the samples. Decreased expression of PD-L1 and STAT3 was observed in 34% (11ADC, 6SCC) and 10% (7ADC, 8 SCC) of the tumours. The results suggested statistically significant correlation between PD-L1 и STAT3. ROC analysis was performed for distinguishing ADC from SCC. Only expression of STAT3 (AUC=0,672, p=0,036) showed statistically significant results independently. The expression of PD-L1 could distinguish between patients with lymph node metastasis and patients without lymph node metastasis with 75% sensitivity and 100% specificity. It is necessary to perform validation study of enlarged cohort to prove the diagnostic potential of the examined biomarkers.

**Contract 120/2019 Screening for the mutation in ARG1 gene in suspected endemic region for the metabolic disorder Argininemia (Arginase deficiency) in Bulgaria****PhD student:** Slavena Hristova Ateamin**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSc : Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSc**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, 2“Zdrave” Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Within the frame of the current scientific study, our team successfully introduced and optimized pre-selected molecular genetic methods for population screening: DNA extraction, PCR and sequencing of the targeted ARG1 gene region. The aim of the current project was to perform screening for the mutation c.329+1G>A in the ARG1 gene and to determine carrier frequency for Argininemia in newborns from Roma origin from the suspected endemic region in Bulgaria (the region of Osikovitsa village). The performed molecular genetic analysis onto 100 dried blood spots from Roma patients originating from the region of Osikovitsa village showed high carrier frequency – 1:100 (1%) of the genetic variant c.329+1G>A in the ARG1 gene compared to 100 healthy controls from Roma origin from the whole country territory. Based on the low frequency of the disease from 1:300 000 to 1:1 000 000 in the general population and the obtained results from the conducted screening we consider the region of Osikovitsa village as endemic for the metabolic disease Argininemia. Genetic diagnostics of the carrier status for the variant c.329+1G>A in the ARG1 gene performed on time will elaborate adequate medico-genetic counseling. Conducting selective screening among Roma people from this region to determine carriers of genetic defects for the disease Arginase deficiency would help to clarify the risk of it in the affected families and offer prenatal diagnostics for disease prevention.

**Scientific publications and presentations:**

- Ateamin S, Todorov T, Georgieva B, et al. Screening for a mutation in the ARG1 gene, associated with metabolic disorder Argininemia in suspected endemic region in Bulgaria. Scientific-Practical Conference “Rare Disease Day in Bulgaria”, Sofia, 28-29th Feb 2020

**Contract 127/2019 Multidisciplinary analysis among Bulgarian patients with brain tumours. Association between viral, genetic and epigenetic factors****PhD student:** Emilya Krasimirova Nikolova**PhD supervisor:** Prof. Vanyo Mitev, MD, DSci; Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSci**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry

**RESULTS:** Brain cancer is a disease with extreme molecular heterogeneity. Applying the integrated approach for additional molecular characterization might improve the brain tumour management and treatment. The aim of the current scientific project is an integrated analysis of viral, genetic and epigenetic factors in brain malignization. Brain tumour tissues and blood samples from 10 Bulgarian patients were collected for DNA and RNA isolation. miR-7



expression was analysed using TaqMan Advanced miRNA assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Copy number variations (CNV) in tumour suppressor genes and oncogenes were tested by MLPA. For detection of EBV, CMV and HSV DNA was used a commercial kit. DTPrime qPCR was used for DNA and RNA amplification. MiR-7 was significantly decreased in tumour tissues compared to normal brain ( $p=0.028$ ). Additionally, decrease in miR-7 expression correlates to deletion of tumour suppressor genes and accumulation of CNV. These results suggest the potential diagnostic and prognostic biomarker application of miR-7. The classical subtype was the most frequent glioblastoma molecular profile according to WHO classification. CNVs were detected predominantly in *PTEN*, *CDKN2A*, *EGFR*, *MDM2*, *MIR26A2-1*, *CDK4* genes. In one patient with combined PNET and GBM diagnosis an atypical deletion of *MDM2*, *MIR26A2-1* and *CDK4* oncogenes were observed. To the best of *our knowledge*, this was *the first report* of deletion of *MDM2*, *MIR26A2-1* and *CDK4* in a patient with brain tumour in the literature. These genes are typically amplified in different tumours. In our cohort no detection of EBV, CMV, HSV DNA was observed. The reported results are pilot for Bulgarian patients with brain tumours and confirm diagnostic and prognostic role of miR-7, prevalence of CNV in *PTEN*, *CDKN2A* and *EGFR* genes in gliomas and the classical GBM subtype, as well as the lack of EBV, CMV, HSV DNA in the tested samples.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Nikolova E, Mitev V, Todorova A. Copy number variations in critical cell-signalling genes with potential targeted therapeutic application. Molecular Analysis for Personalised Therapy Congress. London, UK. 07-09.11.2019. Annals of Oncology -Vol 30, Suppl 7, p. vii33.
- Nikolova E, Dimova P, Minkin K, et al. Human cytomegalovirus DNA detection in a recurrent glioblastoma multiforme tumour, but not in whole blood: a case report and discussion about the HCMV latency and therapy perspectives. J. Neurovirol. 2020.

#### **Contract 128/2019 *In vivo* study on the effects of *Ruscus aculeatus* extract (Asparagaceae) on the experimental model of osteoporosis in rats**

**PhD student:** Lidija Vele Chakuleska

**PhD supervisor:** Prof. Nikolay Danchev & Assoc. prof. Romyana Simeonova

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

**RESULTS:** The *R. aculeatus* extract (ERA) was analyzed by HPLC and contained 20% saponins, expressed as ruscogenin and neoruscogenin. The bone-protective effects of ERA administered alone and in combination with zoledronic acid (ZOL) on a postmenopausal osteoporosis, induced by ovariectomy (OVX) of rats were investigated. The effects of ERA have been compared with steroid saponin dioscin (DSC), with a ruscogenin-like structure and with some bone-protective effects. In this study, calcium levels in all OVX groups were about 85% higher ( $p<0.05$ ) and phosphorus levels were about 43% lower ( $p<0.05$ ) than the control group as early as the first week after OVX, probably due to the faster bone turnover in rats. In the groups treated with the ZOL + ERA and ZOL + DSC combinations, calcium decreased significantly by about 45% in the last week of the experiment, and phosphorus increased by 67% relative to the OVX group and practically recovered to pre-castration control levels. Alkaline and acid

phosphatase enzyme activity increased in all OVX animals, but after 45 days of administration of the tested compounds, the enzyme activity normalized, especially with the combination treatment. Radiographic findings show that castrated animals have reduced bone density in the area of the proximal femur and the outline of the cortical line is not quite clear. No radiological changes were observed in the groups treated, either alone with the studied compounds or in their combinations. For all parameters studied, the effects of ERA were commensurable with those of DSC and potentiate the effects of ZOL. For the first time, the bone-protective effect of ERA was found, and is probably due to the structural similarity of the ruscogenins with estradiol. The results indicate that ERA may be a useful source of bioactive substances for the development of effective phytoproducts to maintain adequate bone structure in menopausal osteoporosis.

**Scientific publications and presentations:**

- **Chakuleska L, Michailova R, Shkondrov A, et al.** Bone protective effects of purified extract from *Ruscus aculeatus* on ovariectomy - induced osteoporosis in rats. *Food Chem Toxicol.* 2019;132:110668

**Contract 129/2019 Study of molecular genetic markers associated with diarrheal diseases in third-generation resistant *Escherichia coli* isolated from faeces of patients and healthy carriers**

**PhD student:** Petya Borisova Stankova

**PhD supervisor:** Prof. Rumyana Markovska-Davidkova, MD, PhD, Corr. Member Ivan Mitov, MD, PhD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Microbiology, Zdrave 2 Str, Sofia 1431

**RESULTS:** 213 faecal *E. coli* isolates were studied. Their sensitivity to 9 groups of antibiotics was tested. The isolates showed high resistance to third generation cephalosporins (72-100%) and medium high to the other groups of tested antimicrobials. Their sensitivity was only good to fosfomycin (3%), nitrofurantoin (4%), colistin (0%), and to carbapenems (0.5%). The groups ESBL, AmpC and carba were determined by multiplex PCRs and nucleotide sequencing, involving 184 ESBLs, 23 plasmid AmpC producers, 1 carbapenemase producer and 5 by unknown mechanism. The ESBLs were dominated by CTX-M-15 (92/184 (50%)) enzymes, and the plasmid Ampc-DHA-1 (23/27 (85%)) was also used for MLST, with the predominant ST type being ST131, which belongs to a virulence clone followed by ST38. Phylogroups of the isolates were also demonstrated with B2 predominating and most of the isolates in this group were assigned to ST131, followed by phylotype D, which was associated with ST38. PCR was performed to detect the *eae* intimin gene, the *bfp* gene as enteropathogenicity factors, and PCR to detect the presence of Shiga toxin genes - *sxt*. Two of the isolates were positive for the *eae* gene. The others were negative, most likely extraintestinal *E. coli* rather than diarrhoeal ones. Serotyping with polyvalent and monoserum was performed to determine the exact serotype of EPEC. Forty-two of the isolates, which were determined as ST131 and phylotype 2, were positive for the first polyvalent serum for EPEC and positive for monogroup O25. The remaining 19 of ST131 were negative to all three groups of polyvalent sera. Five of the isolates were positive for a third polyvalent serum, three of which were positive for O6 monoserum, one was positive for O55 monoserum, and the other was positive for O125 monoserum.

**Scientific publications and presentations:**

- Stankova P, Markovska R, Boyanova L, Iet al. Antibiotic susceptibility of intestinal isolates suspected of producing ESBL / carbapenemase of the order Enterobacterales, isolated from hospitalized patients and healthy individuals for the period 2017-2018, Modern Medicine 64 (1) 2020

**Contract 130/2019 Comparative *in vitro* study on the hydrogen-donation and electron-transfer capacities of complexes of Ga(III) and La(III) with 5-aminoorotic acid**

**PhD student:** Lozan Traykov Todorov

**PhD supervisor:** prof. Irena Kostova, PhD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Chemistry, Dunav 2 Str., Sofia 1000

**RESULTS:** The subject of the present report is a study on the antioxidant properties of newly-synthesized complexes of lanthanum(III) and gallium (III) with 5-aminoorotic acid. The mechanisms of the potential antioxidant effect were also researched. The complexes were proven and characterized through elemental analysis, FT-IR, FT-Raman and UV-VIS spectroscopy. Solutions with varying concentrations underwent series of tests for antioxidant activity. Chemiluminometry, UV-VIS spectrometry and statistical analyses were applied. The potential mechanisms of antioxidant action – hydrogen donation (DPPH<sup>•</sup> assay) and electron transfer (ABTS<sup>•+</sup> assay) – were investigated. *In vitro* experiments, analyzing the complexes' interaction with superoxide and hypochlorite radicals were also performed. Pathological processes increase the levels of these radicals, causing oxidative stress and numerous secondary sequelae. The total free radicals' accumulation was investigated by way of MTT test. Based on the results obtained, the following conclusions were made: The lanthanum complex participates in electron exchange and hydrogen donation. The antioxidant effect is concentration-dependent. At equimolar concentrations the interaction with superoxide and hypochlorite is stronger, compared to the free ligand. The antioxidant effect toward the xanthine/xanthine oxidase system is probably impacted by interactions with the components of the system. The gallium complex participates predominantly in electron exchange. Interaction with DPPH<sup>•</sup> is probably hindered by steric factors. At equimolar concentrations its antioxidant activity is stronger, compared to the free ligand. Exception from that tendency is the total free radicals' accumulation assay in rat blood serum. Both complexes coordinate three ligands each. Their antioxidant effects are weaker compared to the free ligand at thrice the concentration. That fact, as well as the interpretation of the UV-spectra, suggests that both metal ions cause changes in the partial charges of the ligand, which changes its hydrogen-donating and electron-transfer properties, compared to the free molecule.

**Scientific publications and presentations:**

- Todorov L, Traykova M, Kostova I. Hydrogen Donation and Electron Transfer Related Antioxidant Activity of 5-aminoorotic Acid and Its Complexes With Lanthanum (III) and Gallium (III). 3<sup>rd</sup> International Conference on Bio-antioxidants “Natural bio-antioxidants as an inspiration for food science and pharmacy”. Nessebar. 17-21 Sep 2019
- Todorov L, Kostova I. In Vitro Interaction of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex With the Superoxide Radical, Yielded By Potassium Superoxide And Xanthine/Xanthine Oxidase Model Systems. VII<sup>th</sup> Congress of Pharmacy With International Participation. Borovets. 21-24 Nov 2019

- Todorov L, Traykova M, Kostova I. In Vitro Interaction of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex with Superoxide Radical, Generated by Two Model Systems. *Int J Mol Sci* . 2020 Nov 23;21(22):8862.
- Todorov L, Traykova M, Kostova I. In Vitro Interaction of 5-aminoorotic Acid and Its Lanthanum(III) Complex with Superoxide and Hypochlorite Radicals. *Der Pharma Chemica* 2020;12(7).

**Contract 131/2019 Investigation of the antiproliferative/antitumor activity in experimental model systems**

**PhD student:** Martin Zhivkov Malchev

**PhD supervisor:** Prof. Irina Nikolova, MD

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy, Dunav 2 Str, 1000 Sofia

**RESULTS:** The purpose of the study is to examine the antiproliferative activity of conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: Diclofenac, Metamizole Sodium, Meloxicam, Lornoxicam, Ketoprofen, Dexketoprofen and Paracetamol onto human tumor leukemia cultures: BV – 173 (human B cell precursor leukemia), K – 562 (human chronic myeloid leukemia in blast crisis) and NB – 4 (human acute promyelocytic leukemia). The cells were treated with serial dilutions of the studied compounds for 72 hours. Their vitality was assessed using the standard Mosmann MTT test. Nonlinear regression analysis was used to determine IC<sub>50</sub> or the concentrations that causes 50% eradication of vital cells. The data obtained was subjected to the “mean graph” analysis using the COMPARE methodology developed to screen for potential anticancer drugs. Results: The compounds studied elicited a concentration-dependent suppression of the vitality of the malignant-transformed cells. IC<sub>50</sub> values allow the ranking of compounds by relative antineoplastic activity: lornoxicam ≥ diclofenac > meloxicam > paracetamol > metamizole > dexketoprofen ≥ ketoprofen, with 50% inhibition of BV-173 cells is achieved on average at almost twice the lower concentrations compared to NB – 4 or K – 562 cells. Using the “mean graph” analysis, a mathematical model was created with a diagram generated from the compound’s IC<sub>50</sub> values. The diagram for each cell line shows the difference in chemosensitivity. The lowest coefficient values were observed with paracetamol. Metamizole and meloxicam showed high and very high correlations with all true NSAIDs, but not with paracetamol. High correlation was observed between lornoxicam and meloxicam, while there was a moderate to high correlation between lornoxicam and ketoprofen. Diclofenac had moderate to high correlations with all NSAIDs, excluding ketoprofen and paracetamol. Dexketoprofen and ketoprofen showed high correlation. The antineoplastic activity was most pronounced with lornoxicam and diclofenac. The remaining compounds exert antineoplastic activity at high micromolar concentrations. Despite the homogeneous pharmacodynamics, their chemosensitivity differs.

**Contract 135/2019 Investigation of rare variants in genes coding ion channels and their association with bipolar affective disorder and schizophrenia in Bulgarian patients**

**PhD student:** Radosveta Dimitrova Bozhilova

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci and Assoc. Prof. Radka Kaneva, PhD

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Molecular Medicine Center, 2 Zdrave str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Voltage-dependent ion channels are important mediators of physiological functions in the central nervous system. Activation of these channels affects various processes in the nervous tissue, including the release of neurotransmitters, neuronal excitability, neuroplasticity. In recent years, a growing number of studies have found that ion channel variants have been linked to the pathogenesis of psychiatric illness. Mutations in genes encoding ion channels are associated with a number of psychiatric illnesses, including autism, bipolar disorder, schizophrenia and mental retardation. In the present project, 5 rare variants in the genes *CACNA1C*, *CACNA1S*, *SCN3A*, *SCN9A* and *SCN1B*, found in a previous study of the research team, were studied. For the presence of the variants, 100 patients with ADHD and schizophrenia and 100 clinically healthy controls were tested by direct Sanger sequencing. Only variant rs369438564 in exon 44 of the *CACNA1C* gene was detected in one of the patients. The remaining variants were not found in the sample of 100 patients and 100 controls. As a result of the study of a total of 282 patients with ADHD and 153 with schizophrenia, the frequency of the studied variants was determined: rs369438564 with a frequency of 0.013; rs150590855 with frequency (0.006), rs147678484 with frequency (0.009), rs182650126 with frequency 0.009; and rs782583508 with a frequency (0.025). This confirms that the rare variants studied in genes encoding voltage-dependent ion channels are likely to contribute to the predisposition and development of bipolar disorder and schizophrenia. The results of this study support a more accurate determination of the frequencies of the studied variants among patients with psychiatric diseases and healthy controls of the Bulgarian population.

**Contract 137/2019 Effects of *Amanita muscaria* extract on isolated brain synaptosomes, neuroblastoma cell line *SH-SY5Y*, and activity of human recombinant MAOB enzyme (hMAOB)**

**PhD student:** Maria Ventsislavova Voynova

**PhD supervisor:** Assoc. prof. Magdalena Kondeva-Burdina, PhD & Prof. Iliana Manova, PhD

**Organization unit:** Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology; Dunav 2 Str., Sofia 1000

**RESULTS:** This study investigate the *in vitro* effects of *Amanita muscaria* extract (AME) on sub-cellular (isolated brain synaptosomes) and cellular (neuroblastoma cell line *SH-SY5Y*) levels, as well as its effects on the activity of human recombinant MAOB enzyme (hMAOB). On cell line *SH-SY5Y*, administered alone, AME didn't show statistically significant neurotoxic effect at the exam concentrations, compared to the control (non-treated cells). In a model of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, the extract revealed statistically significant neuroprotective effect by preservation the cell viability and decrease LDH leakage, compared to the control (toxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). On isolated brain synaptosomes, administered alone, AME also didn't show statistically significant neurotoxic effect at the exam parameters, compared to the control (non-treated synaptosomes). In a model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress, only the highest concentration revealed statistically significant neuroprotective effect, by preservation the synaptosomal viability and level of reduced glutathione, compared to the control (toxic 6-

hydroxydopamine). The AME didn't influence the activity of human recombinant MAOB enzyme (hMAOB). These neuroprotective effects of AME, might be due to possible scavenging of reactive oxygen species or preservation the level of cellular protector – reduced glutathione.

**Scientific publications and presentations:**

- Kondeva-Burdina M, Voynova M, Shkondrov A, et al. Effects of *Amanita muscaria* extract on different *in vitro* neurotoxicity models at sub-cellular and cellular levels. Food Chem Toxicol. 2019;132:110687

**Contract 139/2019 Investigation of the changes in the chemical and physical properties of multi-force orthodontic archwires during clinical use. Evaluation of patient's discomfort**

**PhD student:** Mirella Valerieva Gueorguieva

**PhD supervisor:** Prof. Laura Andreeva- Gurgurieva

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Dental Medicine, Dept. of Orthodontics.

**RESULTS:** The purpose of our research is to determine whether the oral cavity environment affects the physical and chemical properties of the archwires. Two types of multi-force orthodontic archwires were examined: Tritanium® by AO® and Bio-active® by GC® with a cross-sectional size of 0.016 x 0.022 inches Each archwire was divided into three segments (front, middle and distal). Following methods were used: • Nanoindentation, which establishes the hardness in the relevant areas of the archwires and its change after clinical use. • LIBS provides information on the chemical composition of the alloy used for the composition of the archwires • X-ray structural analysis (XRD), determines the archwires' phase at room temperature. The nanoindentation proved that in the anterior region the modulus of elasticity and tensile strength were the smallest, but increased in the middle region and the largest in the posterior. After 6 weeks of stay in the oral cavity there was a decrease in the tested values. This gave us reason to offer a protocol for optimal stay of the archwires in the oral cavity. The results of LIBS analysis of new BIO-ACTIVE® archwires along the entire length showed the presence of the main elements of nickel-titanium alloy - Ni, Ti, as well as traces of Fe and Cr. LIBS analysis on unused Tritanium® archwires reported content of Ni and Ti elements only. The performed XRD in the three segments shows that all are in the austenitic phase at room temperature with a cubic structure with parameters  $a = b = c = 3.1323$ ,  $\beta = 90^\circ$ , for all segments. Conclusions: Multi-force orthodontic archwires release variable forces in different segments, but after clinical use for 6 weeks, there is a decrease in mechanical properties. A general conclusion from the LIBS for the two orthodontic archwires is that they are made of Ni-Ti alloy. From the X-ray structural analysis we made the following conclusion for both types of archwires: at room temperature they are in the austenitic phase, which means that they do not have the property of "two-way shape memory effect, but superelasticity.

**Contract 140/2019 Screening of flavonoids from *Gypsophila glomerata* Pall ex M.B. (Caryophyllaceae) for *in vitro* modulation of cholinesterase and caspase activity**

**PhD student:** Bozhana Ivailova Dimitrova

**PhD supervisor:** Assoc. Prof. Romyana Simeonova, PhD & Assoc. Prof. Reneta Gevrenova, PhD

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, 2 Dunav St., 1000 Sofia,

**RESULTS:** Enzymes caspases and acetylcholinesterase are key enzymes in the process apoptosis. The work aimed at investigating the potential *in vitro* modulatory activity towards effector and initiator caspases, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of *C, O*-glycosylflavonoids from the aerial parts of *Gypsophila glomerata* Pall ex M.B. (Caryophyllaceae). Methanol-aqueous extract was characterized by ultra high-performance liquid chromatography – diode array (UHPLC-DAD) and ultra high-performance liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). By the means of Flash chromatography and semi-preparative HPLC were isolated 8 compounds (> 95% purity). They were characterized by an HRMS-based strategy for annotation of *C*- and *C, O*- flavonoid glycosides. Compounds were assessed as 2''-*O*-pentosyl-6-*C*-hexosyl derivatives of luteolin, methylfluteolin and apigenin; in 5 flavonoids pentose moiety was mono- or diacetylated. Crude extract and isolated compounds revealed moderate non-specific and concentration-dependent inhibitory activity towards acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *C, O*-flavon glycosides were screened against caspases 1, 3 and 8; 4 compounds with promising inhibitory activity on effector caspases were selected. Crude extract and tested flavonoids did not affect inflammatory and initiator caspases. The kinetic curves of the enzyme reactions for caspase 3 and 7 in the presence of equimolar concentration of the selected compounds were constructed. They demonstrated high inhibitory activity towards effector caspases 3 and 7, being more pronounced on caspase 3. Inhibitory activity of 2''-*O*-pentosyl-6-*C*-hexosyl-luteolin on caspase 3 was in the same order as that of irreversible caspase inhibitor Z-VAD-FMC. 2''-*O*-pentosyl-6-*C*-hexosyl-apigenin and 2''-*O*-(acetylpentosyl)-6-*C*-hexosyl-luteolin/methylfluteolin revealed high non-specific inhibitory activity on caspase 3 and 7. 2''-*O*-pentosyl-6-*C*-hexosyl-luteolin showed notable specific activity towards caspase 3. The obtained results bring insight into the impact of particular group flavonoids – *C*-glycosides with *O*-glycosylation in the sugar moiety on the key enzymes modulation in the apoptosis as caspases and cholinesterases.

**Scientific publications and presentations:**

- Sugareva P, Lozanova V, Dimitrova B, et al. Selective caspase inhibitors from *Gypsophila glomerata* Pall. Ex M.B. (Caryophyllaceae). 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation. Borovetz, Bulgaria. 21-24.11.2019

**Contract 141/2019 Monitoring of clinical and histopathological parameters, including AR (CAG) n and VDR (AT) n genetic markers in connection with increased predisposition and aggressive clinical course of the disease prostate cancer after radical laparoscopic prostatectomy in Bulgarian patients**

**PhD student:** D-r Georgi Margaritov Ivanov

**PhD supervisor:** Assoc. Prof. Krassimir Yanev MD & Assoc. Prof. Marincho Georgiev MD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine Dept. of Urology

**RESULTS:** In the period from 05.2019 to 02.2020, radical laparoscopic prostatectomy for prostate cancer was performed in 30 patients at the Urology Clinic of Alexandrovska Hospital. 10 patients were selected for further analysis. The aim of the study was to monitor the relationship of allelic variants of AR(CAG)n and VDR(AT)n to increased predisposition and aggressive clinical behavior of prostate cancer in Bulgarian patients after radical laparoscopic

prostatectomy. Patients were divided into two groups according to their histological Gleason score (GS) - moderate risk group (GS = 7), n = 6 (60%); and high risk group (GS > / = 8), n = 4 (40%). Selected indicators were noted and documented: patient age, prostate-specific antigen (PSA) at diagnosis, Gleason score from prostate biopsy, and Gleason score from post-prostatectomy histologic material, histological features of the material (eg, perineural invasion, lymphovascular invasion etc), capsule invasion of the carcinoma and spread in the seminal vesicles. PCR analysis of allelic variants of *AR*(CAG)<sub>n</sub> and *VDR*(AT)<sub>n</sub> was performed. Risk variants of *AR*(CAG)<sub>n</sub> (</ = 22 replicates) were identified in 30% of patients. For *VDR*(AT)<sub>n</sub> patients were divided into three groups: low risk - 10% (SS genotype); moderate risk - 60% (SL genotype); high risk - 30% (LL genotype). Correlation of the indicated clinical and histological features of the disease with the risk allelic variants of the two genetic markers in the patient group showed that: in patients with *AR*(CAG)<sub>n</sub> </ = 22 replicates and patients with risk genotypes SL and LL of *VDR*(AT)<sub>n</sub> there is higher PSA at diagnosis, higher GS values from prostate biopsy and from histological material after radical prostatectomy, higher incidence of histological features associated with aggressive disease, higher risk of involvement of seminal vesicles. Patients with SL and LL genotypes of *VDR*(AT)<sub>n</sub> have also demonstrated a significant tendency for pathological upstaging of the disease.

**Contract 142/ 2019 Study of the polymorphism rs2736340 in the FAM167A-BLK region as a factor for the development of dermatomyositis in adult patients**

**PhD student:** Joana Vladimirova Pozharashka, MD

**PhD supervisor:** Assoc Prof. Lyubomir Dourmishev, MD, PhD

**Organization unit:** Dept.of Dermatology and Venereology, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** BLK (B Lymphoid Tyrosine Kinase) is a member of the Scr-tyrosine kinase family. The research on BLK deficient mice shows that BLK influences the development and proliferation of both B- and T-lymphocytes. Changes in its expression are associated with the occurrence of several autoimmune diseases. The aim of the present study is to assess if the polymorphism rs2736340 in the FAM167A-BLK region represents a risk factor for the development of dermatomyositis in adult bulgarian patients. Altogether, 47 patients(16 males and 31 females) with dermatomyositis and 99 healthy controls (26 males and 73 females) were analyzed by real-time PCR. The genotype and allele distribution demonstrated a lack of statistical difference between patients and controls. No association with the clinical parameters was found. No difference between patients with dermatomyositis and those with paraneoplastic dermatomyositis was observed (p=0.5, 1.3,0.3-5.5). The polymorphism FAM167A-BLK rs2736340 does not play a role in the occurrence and the development of dermatomyositis in bulgarian patients.

**Contract 144/2019 TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer**

**PhD student:** Veronika Yordanova Petkova

**PhD supervisor:** Acad. Prof. Vanyo Mitev, MD, PhD, DSci & Prof. Radka Kaneva, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry



**RESULTS:** *TP53* is one of the most important and most frequently-mutated gene human cancers. It is involved in regulation of a wide range of cancer-associated pathways, such as DNA damage repair, metabolism, cell cycle, apoptosis, angiogenesis, immune response and metastasis. The aim of the present study is to analyze the spectrum of *TP53* mutations occurring in non-small cell lung cancer patients and their role in carcinogenesis and disease progression. The full coding sequence of the *TP53* gene in DNA samples from 24 non-small cell lung cancer patients – 12 adenocarcinoma (ADC) and 12 squamous cell carcinoma (SCC) were analyzed by Sanger sequencing. The majority of mutations are found in the DNA binding domain of the p53 protein encoded by exons 5 – 8. In SCC samples all mutations are missense mutations that alter an amino acid in the p53 protein and affect protein configuration. The single nucleotide substitution C>A/G>T, which mutational signatures associated with tobacco smoking, is observed. In ADC samples are detected 5 missense mutations and two small deletions - one single nucleotide deletion and one 7 nucleotide deletion. As a result of the deletions, the reading frame is shifted and a truncated protein is translated. In one patient with ADC and one patient with SCC two different mutations were detected in the *TP53* gene. Due to the small number of studied patients, no statistically significant association of the mutations in the TP53 gene and the type of NSLC was found, as well as with other clinicopathological characteristics. The results of the current study could help to understanding the mechanisms of this disease. It is necessary to perform validation study of enlarged cohort to prove the diagnostic potential of the examined biomarker. It is necessary to understand the relationship between mutations in TP53 and other mutations in tumor tissue.

**Contract 145/2019 In vitro assessment of the possible protective effect of Astragalus saponins (*A. membranaceus*, *A. glycyphyllos*, etc.) in the model of biotoxin induced toxicity**

**PhD student:** Viktoria Bozhidarova Ilieva

**PhD supervisor:** Assoc. Prof Magdalena Kondeva-Burdina & Prof. Tzveta Georgieva, MD, PhD

**Organization unit:** Faculty of Pharmacy, Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology

**RESULTS:** In real-time PCR has been introduced as a fast, specific and sensitive method for the qualitative and semi-quantitative control of cyanotoxins in water bodies. The method for cyanobacteria and for toxic species *Microcistis* has been developed. Cyanobacterial DNA is found in the water basins of Vaya, Durankulak, Mandra and Pchelina. Samples from the Iskar Dam, a source of drinking water for the city of Sofia, are negative for both indicators. On neuroblastoma cell line SH-SY5Y, anatoxin-a, administered alone, did not show a statistically significant neurotoxic effect. For this reason, we have applied anatoxin-a to isolated brain synaptosomes. On this fraction, anatoxin-a revealed statistically significant neurotoxicity, most prominent at concentration 500 µM. Both exam saponins revealed statistically significant neuroprotective effects in a model of anatoxin-a-induced neurotoxicity on isolated brain synaptosomes. But saponin S1, isolated from *Astragalus glycyphyllos*, showed stronger statistically significant neuroprotective effect, compared to the effect of saponin S2, isolated from *Astragalus glycyphylloides*.

**Scientific publications and presentations:**

- Ilieva V, Kondeva-Burdina M, Georgieva T, et al. Poster presentation. In vitro toxicity assessment of toxic cyanobacteria as an emerging environmental risk in Europe. 55<sup>th</sup> Congress of the European societies of toxicology EUROTOX 2019, 9-11 Sep 2019, Helsinki, Finland
- Ilieva V, Shkondrov A, Aluani D, et al. Early detection of toxic cyanobacteria in Bulgarian dam water and *in vitro* evaluation of the effect of saponins from *Astragalus glycyphyllos* and *A. glycyphylloides*, in cyanotoxin (anatoxin- $\alpha$ )-induced neurotoxicity. Revista Brasileira de Farmacognosia (Braz J Pharmacog) 2020;30:202-213.

**Contract 146/2019 In silico analysis of immunogenic proteins with bacterial origin**

**PhD student:** Nevena Emilova Zaharieva

**PhD supervisor:** Prof. Irini Doytchinova-Tsekova, DSci & Assoc. Prof. Ivan Dimitrov, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Pharmacy, Dept. of Chemistry

**RESULTS:** The identification of protective immunogens is the most important and vigorous initial step in the long-lasting and expensive process of vaccine design and development. The machine learning (ML) methods are very effective in data mining and in the analysis of big data as the microbial proteomes. They are able to reduce significantly the experimental work for discovering of novel vaccine candidates. Here, we apply six supervised ML methods (partial least squares-based discriminant analysis, k nearest neighbours (kNN), random forest, support vector machines, random subspace method (RSM) and extreme gradient boosting) on a set of 317 known bacterial immunogens and 317 bacterial non-immunogens and derive models for immunogenicity prediction. The models are validated by internal cross-validation in 10 groups from the training set and by external test set. All of them show good predictive ability but the xgboost model displays the most prominent ability to identify immunogens by recognizing 84% of the known immunogens in the test set. The combined RSM-kNN model is the best in the recognition of non-immunogens identifying 91% of them in the test set.

**Scientific publications and presentations:**

- Dimitrov I, Zaharieva N, Doytchinova I. Immunogenicity prediction by machine learning methods. Vaccines (Basel). 2020 Nov 30;8(4):709.
- Zaharieva N, Doytchinova I, Dimitrov I. Immunogenicity Prediction of Bacterial Proteins by Machine Learning Algorithms. High performance computing – Bulgaria 2019, Bulgaria, Sep 2-6, 2019, Borovets.
- Zaharieva N, Doytchinova I, Dimitrov I. Immunogenicity Prediction of Bacterial Proteins by Random Forest Algorithm, oral presentation. 7<sup>th</sup> Congress of pharmacy with international participation, Nov 21-24, 2019, Borovets

**Contract 147/2019 Fractionation of aquos – alcoholic extract from *Clinopodium vulgare* L., based on biological examination**

**PhD student:** Gazela Mohamed Nasar-Eddin

**PhD supervisor:** Prof. Nikolai Danchev, MD, PhD & Assoc. prof. Rumiana Simeonova PhD

**Organization unit:** Dept. of Pharmacology, Pharmacotherapy & Toxicology, 2 Dunav Str., 1000 Sofia

**RESULTS:** *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae) was used in the traditional Bulgarian medicine for treatment of wounds, diabetes and gastric ulcers. The project aimed at fractionation of aqueous-methanol extract of the plant, based on biological analyses. Antioxidant capacity of studied extract and fractions were tested using DPPH, ABTS and FRAP methods. Enzyme inhibitory activity against lipid peroxidase, acetylcholinesterase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase was also investigated. Rosmarinic acid was used as positive control. Phytochemical analysis of the extract and the most active fraction were performed by ultra-high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The fraction CV3 demonstrated the highest radical scavenging activity with IC<sub>50</sub> values of 0.02 mg/ml (DPPH) and 0.0002 mg/ml (ABTS), as well as the strongest ferric reducing potential (FRAP) of 0.89 mM TE/mg dw. The crude aqueous-methanol extract of *C. vulgare* also showed high activity with IC<sub>50</sub> values of 0.05 mg/ml (DPPH), 0.04 mg/ml (ABTS) and 0.89 mM TE/mg dw (FRAP). Moreover, CV3 demonstrated moderate  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory potential. In addition, based on accurate masses, MS/MS and comparison with standards, 7 flavonoids, 2 caffeic acid monomers, 7 caffeic acid dimers, 8 caffeic acid trimers and 2 caffeic acid tetramers were tentatively elucidated in aqueous-methanol extract. Rosmarinic acid was the major compound in the crude extract. A major component in the fraction CV3 is clinopodic acid O, followed by salvianolic acid A and its isomers and rosmarinic acid. The flavonoids naringenin-O-hexuronide and isoquercitrin have also been identified. In conclusion, the studied extract and fractions from *C. vulgare* contained a variety of phenylpropanoids with antioxidant and enzyme inhibitory potential. The obtained UHPLC-HRMS profile revealed *C. vulgare* as a new rich source of water soluble caffeic acid oligomers.

**Scientific publications and presentations:**

- Nasar-Eddin G, Simeonova R, Zheleva-Dimitrova D, et al. Phenylpropanoids from *Clinopodium vulgare* with antioxidant activity. 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 Jun 2019
- Nasar-Eddin G, Simeonova R, Zheleva D, et al. *Clinopodium vulgare* and its major constituent rosmarinic acid, protect against scopolamine-induced oxidative stress in rat brain. 7th Congress of Pharmacy with international participation. Borovets, Bulgaria. 21-24 Nov2019

**Contract 120/2018 Investigation of cardio-metabolic risk markers in patients with type 1 diabetes with and without metabolic syndrome****PhD student:** Mina Stefanova Serdarova-Evtimova**PhD supervisor:** Prof Tsvetalina Tankova, MD, DSci**Organization unit:** Dept. of Endocrinology, 2 Zdrave St., 1431 Sofia

**RESULTS:** the aim of the study was to evaluate a broad lipid profile, serum osteopontin and markers of endothelial dysfunction – endothelin-1, sE-selectin and VEGF-A in patients with type 1 diabetes (T1D) with and without metabolic syndrome (MetS) and to compare the levels of these parameters to individuals with normal glucose tolerance (NGT) with and without MetS. 96 subjects were recruited in the current cross-sectional study and divided into 4 groups: 24 subjects with T1D and MetS, 24 subjects with T1D without MetS, 24 subjects with normal glucose tolerance (NGT) with MetS and 24 subjects with NGT without MetS. Anthropometric parameters and arterial blood pressure were estimated and biochemical parameters: fasting glucose, HbA1c, broad lipid profile – total, HDL- and LDL-cholesterol, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoprotein A1, apolipoprotein B100, uric acid, creatinine, liver transaminases, endothelin-1, sE-selectin and VEGF-A, osteopontin and hsCRP were investigated in all patients. Albumin/creatinine ratio (ACR) was estimated in a first morning urine void. Body composition analysis was performed by bioimpedance method with InBody 720 (BIOSPACE). Tissue accumulation of advanced glycated end products (AGEs) was assessed with AGE Reader apparatus. Higher levels of fasting plasma glucose, arterial pressure, HDL-cholesterol and triglycerides were estimated in the groups with MetS. ACR and AGEs are significantly higher in the group of T1D patients with MetS compared to NGT. In the groups with T1D uric acid levels appear to be significantly lower, and HDL-cholesterol levels - higher than in the corresponding to MetS groups with NGT. ApolipoproteinA1, lipoprotein (a), osteopontin and endothelin-1 mark patients with T1D at high risk independent from MetS presence. Hyperglycemia is independent risk factor for endothelial dysfunction and low-grade inflammation in T1D. ApolipoproteinA1, lipoprotein (a), endothelin-1 and osteopontin are related to higher cardiovascular risk in patients with T1D with and without MetS.

**Scientific publications and presentations:**

- Serdarova M, Dimova R, Chakarova N, et al. Relationship between cardiac autonomic neuropathy and cardio-metabolic risk profile in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2021;174:108721.

**Contract 121/2018 Evaluation of procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in diabetic foot****PhD student:** Ani Stefanova Todorova**PhD supervisor:** Tsvetalina Tankova, Prof., DSci**Organization unit:** Dept. of Endocrinology, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** The aim of this study is to compare the efficacy of procalcitonin (PCT) and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) as diagnostic biomarkers in patients with diabetes and mild to moderate diabetic foot infections. A total of 119 patients (102 with Type 2 diabetes and 17 with Type 1 diabetes), of mean age  $60.29 \pm 10.05$  years, divided into three groups - diabetic foot ulcer (DFU) with active infection (IDFU group,  $n=41$ ), DFU without clinical signs of infection (Non-IDFU group,  $n=35$ ), and a control group with diabetes without DFU ( $n=43$ ). Infection severity was graded according to IWGDF guideline - Non-IDFU group as Grade 1, IDFU group as Grade 2 ( $n=22$ ) and Grade 3 ( $n=19$ ). Serum hsCRP was assessed by immunoturbidimetric method and PCT by ECLIA method. Levels of WBC were assessed using Medonic haematology analyser and ESR by Westergren method. Serum hsCRP, WBC count and ESR were significantly higher in IDFU group as compared to Non-IDFU and Control group, whereas PCT levels did not differ between the groups. hsCRP presented with higher sensitivity (80%) and specificity (79%), AUC 0.856, in comparison to PCT (sensitivity 63%; specificity 62%, AUC 0.617) for the presence of IDFU, as well as in Grade 3 subgroup (84% sensitivity and specificity, AUC 0.911). The combined model of both markers did not present with better accuracy than using hsCRP alone. In conclusion, hsCRP appears to be a better diagnostic biomarker than PCT in the diagnosis of moderate foot ulcer infection. Both markers fail to distinguish mild infection. PCT is not effective as a prognostic marker in diabetic foot infections.

**Scientific publications and presentations:**

- Todorova A, Dimova R, Chakarova N, et al. Comparative evaluation of the diagnostic value of procalcitonin and hsCRP for the presence of mild to moderate diabetic foot infections. *Int J Low Extrem Wounds*. 2021 Apr 28;15347346211011849.

**Contract 123/2018 Gene expression analysis of selected genes and comparison with the serum levels of their products in Bulgarian patients with benign thyroid nodules and with papillary thyroid cancer**

**PhD student:** Inna Dimitrova Dimitrova

**PhD supervisor:** Prof. Roussanka Kovatcheva, PhD and Prof. Radina Ivanova, DSci

**Organization unit:** Dept. of Endocrinology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** the aim was to investigate gene expression levels of TIMP1 and CHI3L1 in cytological material from fine-needle biopsy (FNB) and to compare with the serum levels of their gene products – tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and YKL-40, in patients with benign thyroid nodules and papillary thyroid cancer (PTC). Eighty patients were enrolled, 40 patients with cytologically benign thyroid nodules and 40 patients with PTC. In half of them (20 patients with benign thyroid nodules and 20 patients with PTC) gene expression analysis of TIMP1 and CHI3L1 was performed in cytological material from routine FNBs using real time PCR. Serum levels of gene products (TIMP-1 и YKL-40) were investigated in all 80 patients enrolled in the study. There was no sex and age difference between patients with benign thyroid nodules and patients with PTC (female:male=9:1,  $40.75 \pm 11.0$  years in benign nodule group vs.  $40.50 \pm 11.7$  years in PTC group). Gene expression levels of TIMP1 and CHI3L1 were both higher in PTC group than in the group of benign nodules ( $p < 0.001$  for TIMP1;  $p < 0.018$  for CHI3L1). Serum TIMP-1 level was higher in patients with PTC than in patients with benign nodules ( $93.6 \pm 23.4$  ng/ml vs.  $82.9 \pm 19.9$  ng/ml,  $p = 0.033$ ). YKL-40 did not differ between the study groups ( $85.8 \pm 54.3$  ng/ml in benign nodule group vs.  $85.4 \pm 38.0$  in PTC group). We found

no correlation between gene expression of TIMP1 and CHI3L1 and serum levels of their protein products (TIMP-1 and YKL-40). Differential expression of TIMP1 and CHI3L1 in PTC implies that these genes have a role in its pathogenesis. We found no correlation between gene expression of TIMP1 and CHI3L1 and serum levels of their protein products which might be due to the impact of the post-transcriptional mechanisms on protein synthesis and also the complexity of the peripheral blood.

**Contract 125/2018 Perioperative hemodynamic control optimisation during laparoscopic adrenalectomy**

**PhD student:** Gergana Ruseva Ivanova

**PhD supervisor:** Ass. Prof. Margarita Atanasova, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Anaesthesiology and Intensive Care, G Sofiyski 1 Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Laparoscopic adrenalectomy is the main treatment of adrenal gland tumors. Perioperative hemodynamic management is complicated, because adrenal hormones are essential for blood pressure control. The aim of the study is optimization of hemodynamic control during mini-invasive adrenalectomy by using invasive blood pressure monitoring. Systolic and diastolic blood pressures are measured on dependent arm through transducer inserted in radial artery after its cannulation. Oscillometric method is used for non-invasive blood pressure measurement on independent arm. Both invasive and non-invasive blood pressure measurements are compared in five essential moment in perioperative period – immediately after induction of anaesthesia, after lateral positioning of the patient on the operating table, after initiation of retroperitoneum, tumor or gland manipulation and after clamping vena centralis. No significant difference in the usefulness of the data obtained through invasive and non-invasive measurement during surgeries due to nonproducing adenomas, recurrent adenomas, Cushing adenomas, Conn adenomas and metastatic tumors was revealed by the study results and performed statistical analysis. When laparoscopic adrenalectomy is performed due to pheochromocytoma invasive blood pressure measurement has a great advantage over non-invasive blood pressure measurement regarding hemodynamic control and therapeutic approach optimization. Obtained data lead to the following conclusion: non-invasive blood pressure measurement is informative enough for adequate hemodynamic control during laparoscopic adrenalectomy due to nonproducing adenomas, recurrent adenomas, Cushing adenomas, Conn adenomas and metastatic tumors; there is no need of invasive blood pressure measurement as part of a standard hemodynamic monitoring in specified pathologies; invasive blood pressure measurement must be included in the standard hemodynamic monitoring in perioperative period of laparoscopic adrenalectomy due to pheochromocytoma. The revealed results and conclusions are based on an investigation of only 20 (twenty) patients, which requires further research for results conformation.

**Scientific publications and presentations:**

- Ivanova G, Atanasova M, Tsoneva D, et al. Optimization of hemodynamic control during laparoscopic adrenalectomy. Surgery. 2019;1

**Contract 126/2018 Immunoglobulin and antibody profile in patients with TAO - potential for predicting the effectiveness of therapy**

**PhD student:** Mariya Asenova Stoyanova

**PhD supervisor:** Rusanka Kovacheva-Georgieva

**Organization unit:** Dept. of Endocrinology, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** The aim was to assess the correlation between the levels of some immunoglobulins and antibodies and the clinical aspects of thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) and to explore their potential for predicting glucocorticoid therapy effectiveness. The study included 120 patients with Graves' Disease (GD), mean age 50 years, women - 87%, divided into 3 groups: GD without TAO/ mild TAO/ moderate-to-severe TAO; 40 healthy controls. All subjects had their ANA, IgE and IgG4 levels measured by ELISA. Information on TRAb, TAT and TPO levels was taken from the medical records. TRAb dynamics was evaluated in patients indicated for systemic GC therapy (n = 42). There was no significant difference in terms of age and gender between the four studied groups. TRAb did not differ in patients with GD with and without TAO, and between the different forms of TAO. The percentage of TPO and TAT-positiveness was significantly higher among patients with GD without TAO compared to TAO patients (70% vs 46.3% for TPO; 60% vs 31.3% for TAT). There was significantly higher percentage of ANA-positiveness in TAO patients compared to GD without TAO and healthy controls (36% vs. 20% vs. 2.5%). Elevated IgE titers were significantly more common in GD with and without TAO compared to healthy controls (13.3% vs. 2.5%). IgG4 >2500 ng/ml was observed in only six patients - five with TAO (four with moderate-to-severe form) and one with GD without TAO. We found more pronounced relative decrease in TRAb (64% vs 40%,  $p < 0.05$ ) and significantly lower percentage of positive ANA among patients with full response to GC therapy. TRAb relative decrease and ANA could be used to predict the response to GCs. ANA and IgG4 are probably involved in the pathogenesis of some TAO subtypes.

**Contract 127/2018 New methods for kidney function evaluation in patients with chronic viral hepatitis and different stages of chronic kidney disease**

**PhD student:** Mariya Dimitrova Petkova

**PhD supervisor:** Prof. Krasimir Antonov and Prof. Emil Dimitrov

**Organization unit:** Dept. of Internal medicine, G Sofiiski 1 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** We assume correlation between stage of chronic kidney disease and values of NGAL in Bulgarian patients, suffering from chronic viral hepatitis C. Our goal was to evaluate the severity of kidney failure with check up of NGAL serum concentration (known marker of acute kidney failure) in Bulgarian patients with chronic viral hepatitis C. After eradication of HCV-infection we observed improvement of kidney function in patients with various stages of chronic kidney disease (CKD), which correlates with decrease of serum NGAL value. NGAL concentration in blood is related with the severity of kidney disease. In advanced stages of CKD we observed statistically significant increase in NGAL. There is strong reverse correlation of glomerular filtration rate (1 year after SVR) and NGAL in serum. Tests of acute liver inflammation - ASAT, APRI in 1 year follow up after successful therapy correlate with GFR ( $p = 0.02$ ,  $r_s = 889$ , Pearson), which shows link between improvement of liver and kidney function. In favor of that statement we proved strong positive correlation between serum albumin values (indicator of liver function and protein synthesis) with GFR increase ( $p = 0.03$ , при  $r_s =$

846, Pearson). Serum Bilirubin also correlates with GFR improvement in follow up ,  $p=0.05$ , but low  $r_s = 286$ , Pearson. We established statistically significant improvement of liver function in all patients :  $p<0.001$ , and  $r_s>>571$ .

**Contract 128/2018 Immunomodulatory effect exerted by soluble factors produced by human mesenchymal stem cells on Thelper lymphocytes, obtained from peripheral venous blood from patients with rheumatoid arthritis**

**PhD student:** Georgi Hristov Vasilev

**PhD supervisor:** Prof. Dobroslav Kyurkchiev, DSci

**Organization unit:** Dept. of Clinical Immunology, bul. Iv. Geshov 15, Sofia 1431

**RESULTS:** Peripheral mononuclear cells were obtained from 15 patients with rheumatoid arthritis. Thereafter  $1.10^6$  PBMC from each RA patient were cultured with AT-MCK conditioned medium from adipose tissue mesenchymal stem cells (AT-MSC) and  $1.10^6$  PBMC with cell culturing medium (DMEM F12, supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics and antimycotics). Cell cultures were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified, 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere for up to 72h. After incubation period, the cells were analyzed by flow cytometry, the cell culture media were tested using ELISA for the presence of IL-6, PGE<sub>2</sub>, VEGF-A and IL-17A. In the conditioned media of adipose tissue mesenchymal stem cells (AT-MSC), all of the cytokines tested were detected in concentrations, respectively: IL-6 (250  $\mu\text{g/ml}$ , Min-Max 210-290  $\mu\text{g/ml}$ ), VEGF-A (3069  $\mu\text{g/ml}$  , Min-Max 2499-3639  $\text{pg/ml}$ ), PGE<sub>2</sub> (249  $\text{pg/ml}$ , Min-Max 200-298  $\text{pg/ml}$ ), IL-17A (2  $\text{pg/ml}$ , Min-Max 2.1-2.9  $\text{pg/ml}$ .). Under the influence of AT-MSC media, we observed a significant decrease in IL-17A levels: 4.2  $\text{pg/ml}$  (IQR 3.1-6.1  $\text{pg/ml}$ .) vs 2.3  $\text{pg/ml}$  (IQR 0.75-5.42  $\text{pg/ml}$ ),  $p = 0.021$ ).

**Scientific publications and presentations:**

- Vassilev G, Ivanova M, Ivanova- Todorova E, et al. Secretory Factors Present In AT-MCK Conditioned Medium Exert Immunosuppressive Effect On T Helper Cells In Rheumatoid Arthritis In Vitro. VII Int Workshop “Autoimmunity in 2019: The good and the bad news”. Pleven, Hotel Balkan, Bulgaria, 10-11 April, 2019.
- Vasilev G, Ivanova M, Ivanova-Todorova E et al. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate th17 and increase tper. Cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. Rheumatol Int (2019) 39: 819-26.

**Contract 135/2018 Frequency and spectrum of PIK3CA-mutations in Bulgarian patients with breast cancer**

**PhD student:** Slavyana Slavcheva Usheva

**PhD supervisor:** Assoc. Prof. Theophil Sedloev, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Surgery, Byalo more Str 8, Sofia 1527

**RESULTS:** In the era of personalized medicine genetic factors gather more attention, as they are considered to be the most responsible ones for the processes of initiation, prognosis and therapeutic resistance in all types of oncological disease. An important intracellular signal pathway, determining the tumor cell growth in breast cancer (BC) is phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/Akt/mammalian, which appears to be a target for genome aberrations - mutations,



amplifications and rearrangements. The PIK3CA-oncogene takes a central part in it. Its mutations are with frequency about 30 % in BC, affecting exon 9 and 20 the most and they come second after the TP53-mutations. In the current study a molecular genetic analysis was conducted in 50 patients with histologically and immunohistochemically verified through tru-cut biopsy BC with middle age 56 years (34-82), treated at the Department of Surgery, UMBAL “Tzaritza Joanna – ISUL”, Medical University of Sofia. 30 % of the patients were diagnosed with a multifocal carcinoma. The patients were separated in 3 groups based on their receptor status: the group of triple-negative - n=18 (36%), the group of ER<sup>+</sup>/HER2 tumors with negative nodal status - n=16 (32%) and the group of ER<sup>+</sup>/HER2 tumors with positive nodal status - n=16. DNA was extracted from the tumor tissue with the help of QIAamp DNA Mini Kit from Qiagen. After the methodical preparation a direct sequencing of exons 9 and 20 was performed. A somatic variant of PIK3CA-mutation was detected in 18% of all cases was with pathogenic effect on the development of the disease. With the highest frequency was the variant c.3140A>G, p.Glu545Gly (H1047R) in exon 20, followed by c.1634A>G, p.Glu545Gly in exon 9. In summary this means 6 mutations in exon 20 and 3 in exon 9. These initial results demonstrate high frequency of PIK3CA-mutations in Bulgarian population of patients and confirms its role in the epithelial carcinogenesis in BC. These mutations are not exclusive for a specific subgroup of BC, which means that they affect different signal pathways from ER, PR and HER2.

### **Contract 136/2018 Genetic markers for progression of non-alcoholic fatty liver disease in patients with chronic hepatitis C**

**PhD student,** Donika Krasimirova Krasteva, MD

**PhD supervisor:** Prof. Assen Aleksiev, MD, PhD, and Prof. Radina Ivanova, MD, PhD, Dsci

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 15 Akad. Ivan Geshov Bul., 1431 Sofia

**RESULTS:** It is known that subjects with PNPLA3 rs738409[G] gene variation are predisposed to developing and progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma concomitant to metabolic, alcoholic or viral liver injury. The aim of this study was to determine whether the presence of the PNPLA3 rs738409[G] gene variation in patients with HCV genotype 1 infection, with or without concomitant NAFLD, can contribute to increased risk of progression of the liver disease. We included 62 patients in the study (20 men, 42 women, mean age 52.65±11.83 y, from 26 to 80 y.o.), with chronic hepatitis C infection, who received interferon-free DAA therapy at the Clinic of Gastroenterology, University hospital “St. Ivan Rilski”. The subjects were divided in two groups depending on the presence of histologically confirmed steatosis by liver biopsy. Each patient was tested for PNPLA3 mutation using genetic analysis. We assessed steatosis and fibrosis stage two years after successful HCV eradication and their interaction with PNPLA3 mutation using non-invasive surrogate biomarkers. The frequency of the PNPLA3 rs738409[G] gene variation in HCV patients is up to 42%, with equal numbers of homo- and heterozygote carriers. The presence of concomitant NAFLD in HCV patients is associated with a tendency of higher frequency of gene mutation than these without steatosis. There is no direct interaction between PNPLA3 mutation and metabolic disorders in HCV patients. We established that obesity and metabolic syndrome correlated with NAFLD. Successful eradication of HCV infection improves liver function and stage of fibrosis independently of concomitant non-alcoholic steatosis and PNPLA3 mutation.

**Contract 148/2018 Creating a biobank of patients for a clinical genetic study of miRNA expression profile in coronary atherosclerosis**

**PhD student:** Mihail Borislavov Ganey, MD

**PhD supervisor:** Corr. memb. Prof. Draga Toncheva, PhD, DSci and Assoc. prof. Savina Hadjidekova, PhD

**Organization unit:** Dept. of Medical Genetics, 2 Zdrave Str.,1431 Sofia

**RESULTS:** The project tasks were fulfilled. • Blood samples were collected from 35 patients with coronary atherosclerosis and 15 healthy subjects. Total RNA was isolated from all blood samples, with plasma RNA isolation kit. Qualitative and quantitative control of isolated RNA was performed. Preferential reverse transcription of micro RNA into the cDNA was performed. The quality and quantity of the cDNA was determined according to the manufacturer's protocol and recorded in an electronic dossier created for this purpose. Encoding and description of all samples were performed. Techniques for RNA isolation and conversion to cDNA were optimized. A patient and control database was created; access is restricted only to members of the research team. The created biobank will be a basis for future studies of micro RNA expression profiles associated with the regulation of the activity of genes involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

**Contract 121/2019 Hepatokines and their relationship with non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese and prediabetic patients****PhD student:** Vera Nacheva Karamfilova**PhD supervisor:** Prof. Zdravko Kamenov MD, PhD, DSci & Prof. Ludmila Vladimirova, MD, PhD, DSci**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** In the study were included 82 patients with ultrasound established liver steatosis, aged 50,22±10,86 years, divided into 2 groups – group 1 with obesity without glycemetic disturbances (n=46), and group 2 with obesity and prediabetes (n=36). We found significantly higher levels of fibroblast growth factor-21 (FGF-21) in the group with NAFLD, obesity and prediabetes compared to the group with NAFLD, obesity and without glycemetic disturbances (450.98±264.82 vs. 360.60±298.09 pg/ml, p=0.010). FGF-21 is also increased in subjects with NAFLD and metabolic syndrome, as well as in those with NAFLD, insulin resistance and dyslipidemia, compared with patients with obesity and NAFLD without metabolic syndrome, dyslipidemia and insulin resistance (p<0.01, p=0.020 и p= 0.04, respectively). FGF-21 correlates with VLDL, TG, GGT, blood sugar at 60 min and 120 min from OGTT. No correlation was found between FGF-21 and micro- and macroangiopathy indices, as well as with the fibrosis velocities examined. At levels of FGF-21 ≥ 320 pg/ml, as opposed to those at lower levels, the risk of developing glycemetic disturbances is approximately 4.2 times higher (p=0.002). At FGF-21 levels ≥ 270 pg / ml, the risk of developing metabolic syndrome is about 4 times higher than in patients with lower levels (p = 0.006) and at ≥ 260 pg / ml the occurrence of insulin resistance is about 3.2 times higher than that of patients with lower levels (p = 0.024). No correlation was found between Fetuin A, Angiopoietin-associated growth factor, and SHBG with carbohydrate disturbances, metabolic syndrome, and insulin resistance, as well as with fibrotic rates studied. There was a weak correlation between Fetuin A and the ankle-brachial index (p=0.221).

**Contract 122/2019 Investigation of MICA and MICB allelic polymorphism in longevity****PhD student:** Bushra Nabil Al Hadra**PhD supervisor:** prof. Milena Ivanova-Shivarova, PhD**Organization unit:** Dept. of Clinical Immunology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The longevity process is associated with genes that regulate immunological functions, and the polymorphism of these genes can influence the processes of "successful aging" by modulating an individual's response to age-associated diseases. In this study for the first time were investigated the MICA and MICB allelic polymorphisms by applying next-generation sequencing (NGS) and were identified extended HLA profiles in healthy, longevity members from the Bulgarian populations. A positive association with longevity was found for MICB\*002:01 (PC=0.00055), which has been described as protective for autoimmune diseases. There were no statistically significant differences in the allele frequencies for MICA. Analysis of the HLA-B-MICA haplotype distribution revealed the presence of three haplotypes with

statistically significant increased frequencies in healthy elderly: B\*35-MICA\*016 (P =0.02), B\*57-MICA\*017 (P = 0.049) and B\*08-MICB\*002: 01 (P = 0.04). Two of these haplotypes were observed again with statistically significant increased frequency as a part of three locus haplotypes HLA-A-B-MICA, where four positive associations with longevity were established: A\*02:01-B\*57:01-MICA\*017 (P=0.01), A\*01:01-B\*35:02-MICA\*016 (P=0.039), A\*01:01-B\*15:17-MICA\*008:01 (P=0.039), A\*01:01-B\*38:01-MICA\*002:01 (P=0.039). Analysis of the MIC-DRB1 haplotype distribution in elderly identifies a positive association for the following haplotypes: MICA\*008:01-DRB1\*11:04 (P =0.0005), MICA\*008:01-DRB1\*13:01 (P = 0.04) and MICB\*002:01-DRB1\*03:01 (P =0.02). These data are consistent with our previous results on classic HLA genes distribution in the elderly, extending the knowledge of HLA association with life expectancy by including the non-classical MIC genes. Interesting is the observation for HLA-B\*35:02-MICA\*016, for which a positive association with longevity was detected in several different haplotype analyzes. The HLA-B\*35:02 part of the haplotype is described as protective for hematological neoplasia, while the typical for MICA\*016 allele transmembrane polymorphism STR-A5 is described as protective for carcinomas in Caucasoids. Our data is in agreement with the hypothesis that longevity might be determined by the selection of HLA alleles and haplotypes conferring protection against life-threatening diseases. The identification of population-specific immunogenetic biomarkers associated with life expectancy and resistance to age-associated diseases would contribute to the development of strategies for the recovery of the immune system and the prevention of replicative aging.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Bushra N. Al Hadra, Tsvetelin I. Lukanov, Lidya D. Tsitselkova, Illina M. Todorova, Antoaneta R. Nedialkova, Elissaveta Naumova, Milena I. Ivanova. Evaluation of new sequencing technology. 34th European immunogenetics and histocompatibility conference. 26-29.04.2020 Glasgow, Scotland.

#### **Contract 123/2019 The role of adipokines in the diabetic foot**

**PhD student:** Tsvetan Vladimirov Gatev

**PhD supervisor:** Prof. Zdravko Kamenov, PhD, DSci & Assoc. prof. Dobrin Vassilev, PhD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia.

**RESULTS:** Diabetic foot is an advanced complication of diabetes mellitus, which is associated with severe invalidization and high mortality rate among affected people. Many factors are involved in its pathogenesis and not all of them are fully elucidated. The **aim** of this study is to determine the influence of the analyzed adipocytokines, some neurological and vascular factors on the evolution of the diabetic foot. Eighty (80) patients with diabetes (type 1 and 2) were included in this study, who were divided into two groups – without (n=44) and with diabetic foot (n=36). The standard antropometric measurements and body composition analysis with device based on bioelectrical impedance method were made. The plasma levels of the adipokines – Chemerin, Visfatin and Retinol binding protein-4 were tested using ELISA method. The neurological factors were assessed with Neuropathy disability score (NDS), Biothesiometer Vibration perception threshold, sudomotor evaluation with Sudoscan and the questionnaires – MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument) and NSS (Neuropathy Symptom Score). The vascular factor were assessed with ankle/brachial index (ABI) calculation and ultrasound measurement of the intima media thickness (IMT) of the common carotid artery. It was found

that the plasma levels of Chemerin are significantly lower among people with diabetic foot, compared to the other group. The population with diabetic foot had higher NDS, vibration perception threshold and MNSI score, lower ABI, as well as lower Sudoscan conductance in hands and feet and higher sudomotor asymmetry in the feet. These methods have proved with good discriminative and predictive value for diabetic foot. Lower levels of Chemerin, in combination with the above-mentioned neurological and vascular factors, might be included with different aspects in the pathogenesis of the diabetic foot. Further trials are needed to elucidate the potential mechanisms, underlying the observed associations.

**Scientific publications and presentations:**

- Gatev T, Vassilev D, Poromanski I et al. Adipocytokines (Chemerin, Visfatin and Retinol Binding Protein 4) and diabetic foot. 19<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology 24-28 Feb 2021

**Contract 124/2019** New markers for assessing beta-cell function as well as cardiovascular risk in patients with obesity and normal carbohydrate metabolism and those with prediabetes

**PhD student:** Iveta Slavyanova Nedeva

**PhD supervisor:** Prof. Zdravko Kamenov MD, PhD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Changes in the endothelium are known to be the first step in the cascade of pathophysiological processes associated with the development of atherosclerotic plaque. New biomarkers are constantly being discovered showing a close correlation with vascular endothelium and beta-cell function, and their relationship with the various stages of impaired glucose homeostasis in obese patients is of particular interest. Our study included 163 patients with a mean age of  $52.45 \pm 11.27$  years, divided into four groups - group 1- healthy controls (n = 42), group 2 with obesity without carbohydrate disorders (n = 40), group 3 with prediabetes (n = 42), group 4 with newly diagnosed diabetes mellitus (n = 39). We found that serum levels of Neopterin were significantly higher in obese and prediabetic patients, compared with healthy controls, as well as in subjects with newly diagnosed diabetes mellitus. Its levels correlate positively with BMI, waist circumference, waist to hip ratio, waist to stature ratio, fasting blood sugar and serum triglycerides. Neopterin levels  $\geq 0.47$  increase by 2.7 times the risk of developing carbohydrate disorders, and those  $\geq 0.56$  by about 6 times the risk of obesity. There were no statistically significant differences in Secretagoin levels among healthy controls and patients with obesity and carbohydrate disorders. There was no correlation between the marker and the laboratory and instrumental examined parameters. The only slightly positive correlation was found with the thickness of intima-media.

**Scientific publications and presentations:**

- Nedeva I, Gateva A, Assyov Y, et al. Neopterin in the Evolution from Obesity to Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Metab Syndr Relat Disord.* 2021;19(4).

**Contract 126/2019** Genetic disorders in bulgarian patient with cardiomyopathy

**PhD student,** Monika Ivanova Shumkova

**PhD supervisor:** Assoc. Prof. Dobrin Vasilev, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The current study included four patients with dilated cardiomyopathy. The secondary form of the disease was ruled out. Patients are men between 40-50 years old. We used a New-Generation Sequencing technics with TruSight Cardio Sequencing Panel, which includes a total of 207 genes associated with cardiovascular disease. We registered mutations in genes that are associated with dilative cardiomyopathy. In two of the patients, different missense mutations are reported in the titin gene. The study of patients revealed two new mutations, not described in the literature, in titin and ABCC9 genes. Mutations in the titin gene were registered in patient 1 - two heterozygous variants - TTN: c.98716G>A (p.Val3290Ile) and TTN: c.72766A>G (p.Asn24256Asp), mutation in the actinin gene - c.1040C>T (p.Thr347Met) and a mutation in the gene for the alpha subunit of voltage-gated sodium channels (SCN10A) - c.3674T>C (p.Ile1225Thr). In patient №2, two mutations were found in the titin gene - c.54703C>T (p.Arg18235Cys) and c.47090G>C (p.Arg15697Pro), which is a new mutation not described yet. There is also a mutation in the gene for the protein filamin C - c.5071G>A (p.Asp1691Asn). Mutations in the desmin protein gene, c.407T>A (p.Leu136His), were identified from the screening of patient №3. In the fourth patient, a new splice mutation, not described in the literature, in the ABCC9 protein gene was detected: c.3567-5T>C. These mutations are rare, defined as variants with uncertain clinical significance. The secondary reason for dilative cardiomyopathy was ruled out. Mutations are with low frequency in the population and these genes are strongly associated with cardiomyopathies. All that gives us a reason to assume that these mutations are involved in the pathogenesis of the disease. We can see the genotype-phenotype correlations. Detection of a hereditary component of the disease and subsequent screening of relatives can help identify first-line relatives at risk

**Scientific publications and presentations:**

- Shumkova M, Vassilev D, Karamfilov K. Left ventricular noncompaction with a dilative phenotype and novel genetic mutations. *Kardiol Pol.* 2021;79(6):716-7.

**Contract 132/2019 Subclinical forms of Cushing's syndrome detection among patients with adrenal incidentalomas using steroid profile measuring with LC-MS**

**PhD student:** Aneliya Boydeva Nankova

**PhD supervisor:** Assoc. Prof. Atanaska Elenkova, PhD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Dept. of Endocrinology

**RESULTS:** There are data that some of the seemingly non-secreting adrenal incidentalomas actually have mild autonomous overproduction of steroid hormones. The liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method makes it possible to determine the level of steroid hormones much more precisely, which would largely avoid difficulties in diagnosing subclinical forms of adrenal gland diseases. Our goal was to compare two methods (routine screening tests for hypercortisolism - free urinary cortisol, midnight serum cortisol and cortisol after 1 mg Dexamethasone suppression test, measured by RIA to steroid profile determined by LC-MS) regarding their sensitivity to detect subclinical forms of hypercortisolism in patients with adrenal incidentalomas. According to our results the average value of free urinary cortisol (determined by LC-MS) was higher in patients with adrenal incidentalomas assessed as non-secreting with the routine screening tests, compared to healthy controls. The average DHEAS value

(determined by LC-MS) was lower in patients with adrenal incidentalomas assessed as non-secreting using routine screening tests compared to healthy controls. This result supports possible autonomic cortisol secretion in view of the hypothesis that oversecretion of cortisol by the negative feedback mechanism leads to suppression of ACTH and, accordingly, lack of stimulation of adrenal androgen synthesis, in particular DHEAS. The latter is considered to be an inhibitor of 11 $\beta$ HSD 1, which increases the risk of metabolic complications due to hypercortisolism. Accordingly, cortisone levels in our cohort of patients with adrenal incidentalomas were lower than those in our healthy controls. Undoubtedly, an integral assessment of the steroid profile allows faster and more accurate measurement of hormones, which otherwise don't exist in the diagnostic plan. However through their systematic measurement new correlations could be found in the different forms of hypercortisolism.

**Scientific publications and presentations:**

- Nankova A. Assessment of therapeutic approach and quality of life in patients with Cushing's syndrome. PhD Thesis, Sofia, 2021.

**Contract 136/2019 Dynamics of values of tissue inhibitors of metalloproteinases and alfa-2 macroglobulin as potential markers of regression of liver fibrosis in case of advanced liver disease**

**PhD student:** Christo Penthev Pentchev

**PhD supervisor:** prof. Krasimir Antonov, DSci

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine Dept. of Internal Diseases

**RESULTS:** We assume a correlation between the stage of liver disease and the value of TIMP-1 and alfa-2 macroglobulin, as well as correlation between the values of TIMP-1 and alfa-2 macroglobulin before the treatment, and 6 months and more after eradication of chronic hepatitis C infection. The aim is to prove that TIMP-1 and alfa-2 macroglobulin are potential surrogate markers of fibrosis and fibrinolysis. Materials and methods: We defined the values of TIMP-1 and alfa-2 macroglobulin twice – before initiation of treatment with DAA, and at least 6 months after successful treatment of chronic HCV by ELISA. The values of TIMP-1 and alfa-2 macroglobulin were significantly higher in patients with decompensated cirrhosis than in the other groups. There was no dynamics in their values at the initiation and in the period after treatment. Further investigation and combination of TIMP-1 and alfa-2 macroglobulin with other markers is needed to evaluate fibrosis and fibrinolysis.

**Contract 138/2019 Examining the genetic similarity between laryngeal carcinoma and neck metastasis**

**PhD student:** dr Venelin Marinov Marinov

**PhD supervisor:** assoc prof. Yulian Rangachev

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine Dept. of E.N.T., Bialo More 8 Str, 1527 Sofia

**RESULTS:** The aim was to exam the genetic similarity between tissues collected from tumor core, periphery and metastatic lymph node from the head and neck area. Thorough anamnesis according to oncological guidelines, pathohistological verification, genetic analysis based on

DNA examination. In 14 sets of tissue samples from tumor center (T1) and tumor periphery (T2) exists a correlation of the mutations examined in the central and peripheral part. In 3 patients we discovered differences in the mutations discovered in the central part of the tumor and the peripheral part. In all patients with mutations in the metastatic lymph nodes is discovered a congruence between the mutations found in them and the ones in the primary tumor (central and peripheral part). In one patient aberrations are discovered in the peripheral part of the tumor, who are missing in the central part of the tumor. In another patient no aberrations are uncovered in his tumor primary site (central and peripheral parts of the tumor) and lymph nodes for the examined genes- TP53, PIK3CA. No mutations in the tissue samples from metastatic lymph nodes are discovered, that are not present in the tumor center and/or periphery. In 26 of the examined patients, no mutations are discovered in the biopsied lymph nodes. More mutations are discovered in tumor center and periphery in relation to the lymph nodes. Only 6 of the examined patients have the same mutations in the lymph nodes compared to the tumor center and periphery. No mutations present just in the metastatic lymph nodes who are missing in the tumor primary site have been discovered. We can conclude that the hypothesis of genetic similarity between primary tumor and metastatic lymph node can be rejected.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Marinov V, Kaneva R, Stancheva G, et. al. Specific aspects of researching the oncogenesis and metastasizing potential of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oto Rhino Laringology International Bulletin* 3 / 2020
- Marinov V, Rangachev Y, Petkova V et al. Expression of TP53 and PIK3CA in patients with laryngeal squamous cell carcinoma and neck metastases - 91. *JAHRESVERSAMMLUNG Deutsche Gesellscha für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Bonn, Mi woch, 20. Mai bis Samstag, 23. May 2020*

#### **Contract 125/2019 Study of the patient's role in health technology assessment by applying a grounded theory (Grounded theory)**

**PhD student:** Klaudia Ivaylova Georgieva

**PhD supervisor:** Prof. Antonia Yanakieva, PhD

**Organization unit:** Dept. of Health Technology Assessment, Sofia, 8 Byalo More Str.

**RESULTS:** The study aims to examine the patient's attitudes to participate in HTA and the level of knowledge of the process. The study is based on qualitative data processing through the NVivo software, collected during interviews with patients hospitalized in various hospitals in Bulgaria. A questionnaire was used contains 10 open-ended questions. The research methodology follows grounded theory (Grounded Theory), a systematic method in social sciences. The results show ignorance of the HTA process by patients in our country, a low level of competence in HTA methods, but a desire to share opinions and personal experiences. Patients have a positive attitude and willingness to train, participate in conferences and round tables, and meet with HTA institutions' representatives. The interpretation of the conducted interviews led to several conclusions regarding the patient's possible personal motives to be involved in the HTA process. Among them are reducing the side effects of therapies with various health technologies, hope for better control of the disease, or to help other people. Patients have certain expectations in their possible participation in HTA related to the acquired benefits associated with their health



condition. They expect to share knowledge and experience with other patients and experts to help them deal with the disease. They would be involved in the process to learn more about a given health technology related to their health condition and also to be able to help apply health technology to their loved ones. These expected benefits and willingness to share experiences determine patients' positive attitude in Bulgaria to participate in HTA.

**Scientific publications and presentations:**

- Georgieva K., Yanakieva A., Stoimenov V., Research the contribution of patient participation in the evaluation of health technologies in Bulgaria, J Health Policy & Management, 81;13-4

**Contract 133/2019** Health care as a factor in the prevention of complications in patients with hypertension

**PhD student:** Lyubomir Hristov Marinov

**PhD supervisor:** Assoc Prof. Alexandrina Vodenicharova & Assoc Prof. Pavlinka Dobrilova

**Organization unit:** Faculty of Public Health Dept. of Health policy and management

**RESULTS:** A survey was conducted of nurses and patients in seven hospitals in the country, identifying problems with the organization and provision of health care by nurses with an emphasis on medico-pedagogical and medico-social nursing functions. An analytical approach has been developed to determine the care needs of patients with hypertension. A methodology for practical application of nursing care planning in chronically ill patients, in particular arterial hypertension, is presented. A methodological approach has been developed to assess and analyze the quality of care. An organizational approach is proposed that will improve the performance of the nurse in the provision of health care in two main aspects: the medico-pedagogical and medico-social nursing functions, and will increase the efficiency and quality of care for each patient.

**Scientific publications and presentations:**

- Marinov L. Study of the activities of nurses in the provision of health care in patients with arterial hypertension Proceedings of the Third Scientific Conference with International Participation "Medical and Social Aspects of Health Care", Vratsa Print

**Contract 143/2019** Organizational aspects of healthcare in patients with ischemic stroke

**PhD student:** Margarita Dimitrova Lalovska

**PhD supervisor:** Prof. Todor Cherkezov, MD & Assoc. Prof. Pavlinka Dobrilova, MD

**Organization unit:** Faculty of Public Health Dept. of "Health Policy and Management"

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Public Health Dept. of "Health Care"

**RESULTS:** A survey was conducted of nurses and patients in five multidisciplinary hospitals for active treatment and two rehabilitation hospitals in northwestern Bulgaria, identifying problems in the organization and provision of health care by nurses in patients with ischemic stroke. An approach has been developed to identify the care needs of patients with ischemic stroke, to increase their satisfaction with the healthcare offered, and to improve their quality of life. A methodology for nursing care planning has been provided, which guarantees continuous, quality and adequate health care needs, in line with the individual approach of the patient. A help

and self-help program for patients with stroke has been developed that will increase the efficiency and quality of health care in patients with ischemic stroke.

**Scientific publications and presentations:**

- Lalovska M, Dobrilova P, Improving quality of life in patients with stroke. *Nursing* 2020;52(2):8-11
- Lalovska M, Health care - a need in patients with stroke; *Medico - social aspects of health care*, edited by Tihomira Zlatanova, Pavlinka Dobrilova, Ralitsa Zlatanova - Velikova, Galya Yankova, Medical University - Sofia Central Medical Library, 2019,75-79.
- Lalovska M, Dobrilova P, Analysis of the needs for medical care in patients with ischemic stroke. *East Siberian Opex Academy*. 2020; 37.

## **COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2018"**

### **Contract 207/2018 Microinvasive approach in pediatric dentistry by using a dental operating microscope**

**Research team:** Assoc. prof. Natalia Christova Grancharova, PhD

- Prof. Maya Rashkova PhD
- Nadezhda Georgieva Mitova, PhD
- Krasimir Hristov, MD
- Ralitsa Bogovska-Gigova, MD
- Zornitsa Lasarova, MD
- Hristina Tankova-Zlateva, MD

**Organization unit:** Department of Pediatric dentistry, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Treatment with minimal intervention is a new philosophy in the modern dentistry. New diagnostic and magnifying tools are needed to facilitate the detection of diseases in the initial phase, which allows for treatment with minimal loss of structures. The use of dental operating microscope (DOM) in paediatric dentistry has its own specificity due to the characteristics of the child as a patient and the management of his or her behaviour using this new technology. The aim of the project is to explore new possibilities for the application of DOM in paediatric cariology and endodontics with minimal intervention. Clinical methods for the diagnosis of 146 children (176 permanent and 100 primary molars) and digital analysis of photographs for micromorphology of occlusal fissures were used in the implementation of the project. Based on the results obtained the following conclusions and contributions from the project can be made: The number of diagnosed early carious lesions on occlusal surfaces increases by 7% when DOM is used. Magnifying techniques allow more accurate differential diagnosis between deep fissure and early occlusal carious lesions in the newly erupted permanent molars. They allow precise differential diagnosis between deep dentinal caries and asymptomatic closed pulpitis in the primary dentition. DOM contributes to a more detailed and precise diagnosis of the size of carious lesions. It enables the observation of a greater variety of colours and shades of carious dentin, which provides better precision in determining the progress of the caries process; The use of DOM enables accurate diagnosis and decision making in the biological treatment of asymptomatic closed pulpitis in primary teeth. This is a prerequisite for successful treatment outcome, as well as for more accurate assessment and control of excavation during treatment. The use of DOM facilitates the identification of important anatomical features in the pulp chamber of the primary teeth, relevant for the endodontic treatment. DOM allows the study of the occlusal anatomy of the children's molars with magnification and photographic documentation in clinical conditions. Using these possibilities, we have found that the pits and fissures of the newly erupted permanent molars occupy up to 1/5 of the area of their occlusal surface. This is an essential part of the enamel surface for the development of a carious lesion right after their eruption.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Hristov Kr, Mitova N, Gateva N. Dental operating microscope and minimally invasive approach in pediatric dentistry - review. Problems of dental medicine, 2019;44(2):22-27.

- Hristov Kr, Mitova N, Gateva N et al. Investigation of the morphology of the pulp chamber in the lower second primary molars using a dental microscope, Problems of Dental Medicine.
- Hristov Kr, Mitova N, Gateva N. Magnification tools in dental practice - review. Problems of Dental Medicine.
- Bogovska-Gigova R, Kosturkov D, Rashkova M et al. Characterization of occlusal surfaces of first permanent molars in childhood. Problems of Dental Medicine.
- Rashkova M, Gigova R, Tankova H et al. Application of contemporary magnifying methods in the diagnostics of occlusal carious lesions on first permanent molars in children. Folia Medica, 2019;62(3):585-91.
- Rashkova M, Gateva N, Mitova N et al. Using a dental operating microscope in the diagnosis of asymptomatic pulpitis in primary teeth. Journal of IMAB 2020;26(1).
- Rashkova M, Mitova N, Lazarova Z et al. Using a dental operating microscope in the treatment of reversible pulpitis in primary teeth. Cumhuriyet Dental Journal. 2021;23(1)

**Contract 208/2018    Optimisation of ultrasound diagnostics for students from the Medical College**

**Research team:** Assoc. Prof. Valeri Stefanov Tchakarski, MD, PhD,

- Assoc. Prof. Dimitar Yovchev, MD, PhD
- Assist. Prof. Petranca Gagova, MD, PhD
- Nevenka Boninska
- Binnaz Asanova, PhD student

**Organization unit:** Medical College „Yordanka Filaretova“, Y Filaretova 3 Str., 1606 Sofia

**RESULTS:** The results of the students' questionnaires on the problems of theoretical and practical training in ultrasound diagnostics show the need to change the existing model for the acquisition of knowledge and skills. The ability to put into practice the theoretically acquired knowledge through the use of an ultrasound diagnostic apparatus in training showed an increase in the motivation and activity of the trainees, improved the effect of the training and allowed the teacher to improve his teaching quality. This was evidenced by the comparative analysis made in the selected group for further practical training, the results of which after its completion showed a positive change. An ultrasound diagnostic training program was created and tested. The developed program for optimization of ultrasound diagnostics includes the following stages: theoretical preparation, control of theoretical preparation, visual presentation of ultrasound equipment by the trainer, demonstrating the capabilities of the apparatus, the basic positions of the transducer and practical ways of conducting the ultrasound examination. Following the demonstration, the student's control will be followed by the student's exercise of the technique and a final stage - assessment, which involves the student's assessment. Preliminary test slips were used to evaluate the results obtained after further training on ultrasound apparatus. The students believe that training in ultrasound diagnostics has led to a significant increase in their theoretical knowledge and practical skills. Student satisfaction is much greater than training in a practical classroom than in a classroom. Within the project, the teaching team structures the content, the visual materials on the relevant topics for the practical classes and the exam fiches. The established program for practical training of students from the Medical College of Medical University - Sofia can be used as a basis for postgraduate training of qualified personnel, which

through their expanded competences and activities will lead to economic and market utility, by optimizing and supporting the work process in health and medical establishments.

**Scientific publications and presentations:**

- Gagova P. A generalized perspective on the location of the X-ray laboratory assistant in ultrasound diagnostics, eighteenth BAR congress, Varna, 26-28.09.2019
- Gagova P, Tzvetkova T, Boninska N. Are students interested in and theoretical knowledge of X-ray laboratories in the field of ultrasound diagnostics. Collection of publications from 8<sup>th</sup> scientific session of MC-Varna, Varna Medical Forum, vol 8, 2019, ann 3
- Gagova P, Tchacarski V, Boninska N et al. Quality of training in ultrasound diagnostics in students of X-ray laboratories - evaluation of the educational content and organization of the teaching process. Collection of publications from Seventeenth national научна scientific for students and teachers, Pleven, 24-25.10.2019
- Boninska N, Gagova P, Mircheva Tz et al. Physical principles and features of ultrasound diagnostics. Collection of publications from Seventeenth national научна scientific for students and teachers, Pleven, 24-25.10.2019, pp.57-63
- Asanova B, Gagova P. Motivation in the education process. XXII international conference The power of Knowledge, Kavala, Greece, 11-13.10.2019

## **COMPETITION "BUILDING INFRASTRUCTURE FOR RESEARCH IN MU - SOFIA' 2019"**

### **Contract 236/2019 Microinvasive diagnosis and treatment of dental caries and endodontic diseases**

**Research team:** Prof. Radosveta Ivanova Vassileva, DMD, PhD

- Assist. Prof. Alexander Bonchev
- Assist. Prof. Viktoria Petrova-Pashova

**Organization unit:** Department of Conservative Dentistry, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia,

**RESULTS:** The aim of the present study is to evaluate the early diagnosis of dental caries and the effect of remineralizing therapy by means quantitative light-induced fluorescence (QLF) and increasing the success of endodontic treatment using a dental microscope. The QLF study was performed on 30 extracted molars. An artificial carious lesion was created on the buccal half of each tooth using 0.1 M lactic acid gel. The lesions were treated with two different remineralizing agents—self-assembling peptide P11-4 and polydiamineethylmetacrylate (PDMAEMA)/Carbomer/CaP and the teeth were stored in artificial saliva solution for seven days. The obtained results showed that lactic acid solution (0.1 M, pH=4.5) applied for 6 days on enamel is able to create artificial carious lesions. As a result the emitted fluorescence is reduced which can be registered by QLF. The application of both remineralizing agents led to an increase in the intensity of the emitted fluorescence, which is associated with the remineralization of the enamel lesion. The results were confirmed by Raman spectroscopy and SEM. This defines QLF as a reliable method for early caries diagnosis and monitoring of the remineralization therapy. The study to determine the number of root canals was performed on 50 extracted upper and lower molars. Fifty standard endodontic cavities were prepared. Initially, without the use of a magnification devise, the available root canals were located and counted. Then, using a 16x magnification dental microscope, the same tooth specimens were re-located and the root canals counted. The obtained results proved that the use of magnification devise in the conducted experiment - dental operating microscope, statistically increases the success of establishing root canals in molars. This gives grounds for recommending the use of the dental microscope as an integral part of modern endodontic treatment.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Bonchev A, Vasileva R, Dyulgerova E, et al. Self-assembling Peptide P11-4: A Biomimetic Agent for Enamel Remineralization. *Int J Pept Res Ther* 2020;32(19).
- Petrova V, Vassileva R, Yantcheva S. Radix entomolaris: a case report. *Medinform* 2020
- Bonchev A, Vasileva R, Dyulgerova E. Polymer controlled system for remineralization of demineralized enamel – an in vitro study. Jubilee Annual Assembly of IMAB, 18-21 Oct 2020, Varna, Bulgaria

## COMPETITION „STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT”

### STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2018

**Contract 209/2018** Investigation of the most common bacterial and viral pathogens implicated in female reproductive failure on menstrual blood as a target biologic sample

**Research team:** Acad Prof Vanyo Ivanov Mitev, MD, DSci

- Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSci
- Assist. Prof. Bilyana Georgieva, PhD
- Assist. Prof. Anita Kavrakova, PhD
- Kremena Mesechkova, PhD student
- Assist. Prof Ani Miteva

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** Aim of the current work was to investigate the impact of bacterial (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, *Mycomplasma hominis/genitalium*, *Gardnerella vaginalis*) and viral (*HSV1*, *HSV2*, *EBV*, *CMV*, *VZV*, *HHV6*, *HHV7*, *HHV8*) pathogens, as a potential cause of reproductive failure in women by analysis of menstrual blood. We analysed DNA extracted from menstrual blood samples of 48 probands selected on the bases of history of infertility – recurrent spontaneous abortions, difficulties in natural contraception, physiological obstruction in the genythal tract, unsuccessful assistant reproduction procedures, autoimmune diseases, etc. We used DNA extraction, Real-time qPCR, agarose gel-electrophoresis. In 64,6% of all tested menstrual blood samples of infertile women bacterial and/or viral pathogens were detected. In 41,4% of all tested menstrual blood samples we found bacterial, while in 37,5% - viral pathogens. *Ureaplasma parvum* and *Gardnerella vaginalis* were detected in 58,3% and respectively in 54,2% of the positive for bacterial pathogens samples. *EBV*, *HHV7* and *HHV6* were detected in 38,9%, 55,6%, and respectively in 11,1% of the positive for viral pathogens samples. Bacterial and viral co-infection was found in 22,6% of all tested women. *Chlamydia trachomatis*, *Mycomplasma hominis/genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *HSV1*, *HSV2*, *CMV*, *VZV* and *HHV8*, were not detected in the menstrual blood samples. Our study offers new approach for diagnostics of infections in the upper female genital tract by analysis of menstrual blood. The opportunity to detect asymptomatic bacterial and viral infections in female upper genital tract contributes to reveal the cause for sterility. It is of a great significance to diagnose not only an active, but also asymptomatic subclinical viral infections, which often are due to secondary viral reactivation after hormonal stimulation. That new diagnostic approach helps to clarify the infectious etiology of reproductive failure and it is of a great importance for applying an adequate therapy.

**Scientific publications and presentations:**

- Mesechkova K, Kavrakova A, Georgieva B, et al. Bacterial and viral pathogens implicated in female reproductive failure investigated on menstrual blood. 30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, France, 18-21 April, 2020.

**Contract 210/2018 Investigation of the microsatellite *AR(CAG)n* and Poly A 3'UTR *VDR* markers as genetic risk factors in prostate carcinoma and association with aggressive clinical profile**

**Research team:** Assist Prof. Bilyana Georgieva Georgieva, PhD

- Acad Prof Vanyo Mitev, MD, DSci
- Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSci
- Assist. Prof. Anita Kavrakova, PhD,
- Assist. Prof Ani Miteva

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry

**RESULTS:** Our aim was to investigate the role of *AR(CAG)n* and *VDR* PolyA 3'UTR variants as genetic risk factors for prostate cancer (PCa) development and aggressive profile. Mutations in the *AR* and *VDR* genes (encoding the androgen receptor and the vitamin D receptor, respectively) ensure selective advantage of the metastatic subtype PCa, remaining it active even after androgen deprivation therapy. We analysed 57 DNA/RNA specimens of PCa patients. We used PCR, Real-time qPCR, fragment analysis, agarose gel electrophoresis. In 42 % of the tested patients we detected shorter *AR(CAG)n* lengths (e.g.,  $\leq 20$  repeats), which is associated with high risk of developing PCa. That result is much higher than the data reported in control samples (*AR(CAG)n*  $\leq 20$  in 27%). The shortest *AR(CAG)n* 16/17/19 alleles we found in the most aggressive cases with advanced castrate-resistant PCa, metastases and recurrence. The detected PolyA 3'UTR *VDR* alleles and the corresponding allele frequencies are: short alleles SS 17/17; SL 17/23; SL 17/24; SL 17/25 - 36% and long alleles LL 23/23; SL 17/23 - 26%; LL 24/24; SL 17/24 - 36%; SL 17/25 – 2%. The following distribution of *VDR* alleles in our PCa cases was observed: SS 12%; SL 47%; LL 41%. In the control samples the following alleles were reported: SS 20%; SL 43%; LL 36%. In the group of PCa patients with longest homozygous 23, 24, 25 *VDR* alleles the clinical manifestation was biochemical relapse and castrate-resistant PCa. In all studied patients we detected increased *RCA3* tumor specific expression and ratio PCA3/PSA x 1000 above 30. Both *AR(CAG)n* and *VDR* PolyA 3'UTR microsatellite markers have independent role as genetic risk factors for PCa development. The shortest *AR(CAG)n* and longest *VDR* PolyA 3'UTR alleles contribute to the development of aggressive and advanced tumors with bad prognosis.

**Scientific publications and presentations:**

- Kavrakova A, Georgieva B, Mitev V, et al. Microsatellite *AR* and *VDR* markers as genetic risk factors in association with Prostate cancer and aggressive profile. 10<sup>th</sup> European Multidisciplinary Congress on Urological Cancers – EMUC 2018, 8-11 Nov 2018, Amsterdam, The Netherlands;



**Contract 211/2018 Influence of ketogenic diet on the thermoprofile of the brain proteome in a model of chronic epileptic seizures**

**Research team:** Prof Boris Gotsev Tenchov, PhD, DSci

- Assoc. Prof. Pavlina Gateva, PhD
- Assist. Prof. Lubomir Traikov, PhD
- Assist. Prof. Silviya Abarova, PhD
- Assist. Prof. Zafer Sabit
- Kalina Kamenova
- Stella Zaharinova, student

**Organization unit:** Dept. of Medical Physics and Biophysics2 Zdrave St., Sofia 1431

**RESULTS:** The present study provided a number of new, original results about the effects of kindling and ketogenic diet on the denaturation profiles of brain supernatants and blood plasma of mice. These results contain fundamental scientific contributions and open up new opportunities for applications of the developed experimental model to investigate the molecular mechanisms of pathological processes in kindling-induced epilepsy. The most significant new fundamental result is the establishment of clearly displayed opposite effects of kindling and ketogenic diet on the low-temperature exothermic transitions in the brain supernatant thermograms. These effects well correlated with the observed metabolic effects on body weight, blood glucose and ketone body levels, as well as with protein oxidative stress (AOPP) levels in the brain proteome. These opposite effects are very clearly manifested in the behavior of two prominent exothermic transitions at  $\sim 20^{\circ}\text{C}$  and  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ , revealed by deconvolution of the brain supernatant thermograms, and demonstrate a compensation of the kindling effect by the ketogenic diet. The comparative characterization of the results obtained for blood plasma samples from the control group and from the groups of animals subjected to kindling and/or ketogenic diet revealed significant changes in the profile of albumin whose denaturation transition was shifted to lower temperatures by the ketogenic diet, while upon kindling it was shifted to higher temperatures that are in the range of the globulin transitions in the denaturation profiles. These results demonstrate a significant potential of the differential scanning calorimetry (DSC) as a diagnostic method for disease detection and for evaluating the effect of administered therapies (ketodiet in this study). The present work provides a basis for evaluating the potential of the developed approach for eventual applications for diagnosis and monitoring of epilepsy in humans by analyzing DSC thermograms of blood plasma samples taken from the patients.

**Scientific publications and presentations:**

- Andreeva-Gateva P, Bakalov D, Sabit Z, et al. Effects of ketogenic diet on corneal kindling mouse model. *Acta Medica Bulgarica* 2020;47(2):7-11.
- Koynova R, Tenchov B. "Microcalorimetry of proteins – a new approach for investigating the molecular mechanism of diseases" Proceedings of the National Scientific Conference "75 Year Anniversary of the Union of Scientists of Bulgaria – advancing science and education" 2019

**Contract 212/2018 Screening for non-invasive candidate biomarkers for the diagnosis of endometriosis using mirna expression profiling**

**Research team:** Assist Prof. Rada Georgieva Staneva-Tsvetkova, MD, PhD

- Prof. Savina Hadzhidekova, MD, PhD

- Assist. Prof. Vesela Karamisheva, MD, PhD
- Corr. Member of BAS. Draga Miteva, MD, DSci
- Assist. Prof. Victoria Spasova, PhD student
- Assist. Prof. Olga Antonova, MD, PhD
- Slayyana Yaneva-Staykova, PhD student
- Assist. Prof. Mihail Ganev, MD, PhD student
- Zora Hammoudeh, PhD

**Organization unit:** Department of Medical Genetics, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Endometriosis is chronic gynaecological disease, whose diagnosis requires surgical procedure. The aim of our study was to determine miRNA expression alterations in plasma and tissue of endometriosis patients, that have the potential to serve as diagnostic and staging biomarkers. 15 patients with stage I and II endometriosis, 15 patients with stage III and IV endometriosis and 15 healthy controls were enrolled in the study. RNA was extracted from plasma with miRNeasy Serum/Plasma Kit and from tissue with miRNeasy MiniKit. 6 RNA pool samples were created – 3 plasma RNA and 3 tissue RNA for: 1)early endometriosis, 2)advanced endometriosis and 3)healthy controls. Each pool sample was subjected to reverse transcription by miScript II RT Kit. For the expression analysis of 84 miRNA in plasma samples the miScript miRNA PCR Array Human Serum & Plasma was used and for the tissue samples - Human miFinder miRNA PCR Array. The quantitative PCR analysis was performed on Applied Biosystems™7500. Data was processed by Qiagen's GeneGlobe Data analysis centre software. Analysis of the miRNA expression levels of plasma samples revealed 33 miRNAs with significantly higher expression levels in early stage endometriosis and 49 miRNAs in late stage endometriosis compared to healthy controls. Of the 24 common miRNAs among the two patient groups miR-106a-5p/miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-16-5p showed over 10-fold higher expression in late stages compared to the early stages. This nominates these 3 miRNAs as potential biomarkers for diagnosis and progression of endometriosis. Analysis of the miRNA expression levels of tissue samples revealed 3 miRNAs with significantly lower expression levels in early stage endometriosis and 10 miRNAs in late stage endometriosis compared to healthy controls. MiR-200c-3p and miR-196b-5p showed 5-4,9-fold lower expression in late stages compared to the early stages. This nominates these 3 miRNAs as potential biomarkers for staging of endometriosis.

**Contract 213/2018 Role of haptoglobin polymorphizm on iron metabolism in healthy volunteers from Bulgarian popuylation**

**Research team:** Assoc. Prof. Savina Petrova Hadjidekova, MD, PhD

- Assist. Prof. Victor Manolov, MD, PhD
- Assist. Prof. Radoslava Grozdanova, PhD - NCIPD
- Prof. Ognyan Georgiev, MD, PhD
- Corr. Member of BAS Prof. Latchezar Traykov, MD, DSci
- Prof. Kamen Tzatchev, MD, PhD, DSci
- Prof. Iulia Petrova, MD, PhD, DSci
- Prof. Boris Bogov, MD, PhD
- Assoc. Prof. Evgeniy Hadjiev, MD, DSci -

- Assoc. Prof. Vencislava Pencheva-Genova, MD, PhD
- Assist. Prof. Gergana Cvetkova, MD
- Assist. Prof. Georgi Angov, MD, PhD
- Assist. Iren Petrova-Ivanova, MD
- Prof. Maria Nikolova, MD, PhD - NCIPD
- Assist. Prof. Marieta Karadjova, MD, PhD
- Todor Agelov Kunchev, MD, PhD student
- Assist. Victoria Spasova, MD

**Organization unit:** MU - Sofia, Faculty of Medicine, Department of Medical genetics

**RESULTS:** During this project 217 healthy volunteers were included for haptoglobin phenotype and its role in iron metabolism through hepcidin levels evaluation. In all included participants intima-media thickness (IMT), ankle-brachium index (ABI), and blood pressure were measured, body-mass index (BMI) were calculated. Biological specimen (venous blood) was taken in order to evaluate total red blood cells count, erythrocyte indices – MCV, MCH and MCHC, haemoglobin, haematocrit, high sensitive CRP, serum iron and TIBC, serum transferrin, ferritin, haptoglobin, CRP, LDH, CPK, ASAT, ALAT, creatinine, glucose, lipid profile (total and HDL, LDL-cholesterol, triglycerides), hepcidin, TNF- $\alpha$ , IL-6 and haptoglobin phenotype. Correlation dependence between measured parameters was established and reference values for hepcidin for Bulgarian population were updated. Included volunteers were separated into two age borders – a) from 18 to 50 years old and b) above age of 50. The distribution was as follows: males – total number 103, below age of 50 - 59 (57.3%), females – total number 114, below age of 50 - 69 (60.5%). In 195 (89.9%) volunteers was found haptoglobin phenotype 2-2; in males – 92 (89.3%), in females – 103 (90.4%). With haptoglobin phenotype 2-1 were 6 males (5.8%) and 7 females (6.1%); with phenotype 1-1 – males 5 (4.9%) and females 4 (3.5%), respectively. Average serum hepcidin concentration in males (in both age groups and three haptoglobin phenotypes) was  $21.0 \pm 4.9$   $\mu\text{g/L}$ . Average serum hepcidin concentration in females (in both age groups and three haptoglobin phenotypes) was  $14.3 \pm 5.1$   $\mu\text{g/L}$ . Average serum hepcidin levels in males with haptoglobin phenotype 2-2 is  $22.6 \pm 5.4$   $\mu\text{g/L}$ . Average serum hepcidin levels in females with haptoglobin phenotype 2-2 is  $16.6 \pm 5.6$   $\mu\text{g/L}$ . Serum hepcidin in included healthy volunteers with haptoglobin phenotype 2-1 shows average level  $21.3 \pm 4.9$   $\mu\text{g/L}$  for males and  $13.3 \pm 4.7$   $\mu\text{g/L}$  for females. Average serum hepcidin concentrations in included volunteers with haptoglobin phenotype 1-1 were  $19.1 \pm 4.4$   $\mu\text{g/L}$  for males and  $12.1 \pm 4.9$   $\mu\text{g/L}$  for females. Different serum hepcidin levels depend on haptoglobin phenotype in healthy volunteers led to update in hepcidin reference range for Bulgarian population. Haptoglobin phenotype 2-2 is connected to increased oxidative stress for human organism with higher frequency of socially significant diseases occurrence and progress. During comparison of some analyses and markers for systematic and intravascular inflammation (high sensitive CRP, TNF- $\alpha$ , IL-), development of oxidative stress in organism through iron metabolism changes (serum haptoglobin) and early atherosclerotic changes occurrence (IMT, ABI) we establish increased dependency connected to haptoglobin phenotype in healthy volunteers. During performance of our project we found higher serum levels of total and LDL-cholesterols and triglycerides, and lower HDL-lipoproteins in healthy volunteers with haptoglobin phenotype 2-2 compared to other types ( $r=0.893$ ,  $P<0.005$  – average values for four parameters). Higher values for eGFR were found in healthy volunteers with haptoglobin phenotype 2-2 compared to types 2-1 and 1-1 ( $r=0.971$ ,  $P<0.001$ ). We established higher serum iron and ferritin concentrations in healthy volunteers with haptoglobin phenotype 2-2 compared to other types ( $r=0.854$  and  $r=0.903$ , respectively,  $P<0.005$ ). In our

project we found higher serum levels in fasting glucose in healthy volunteers with haptoglobin phenotype 2-2 compared to types 2-1 and 1-1 ( $r=0.771$ ,  $P<0.005$ ). During performance of our project we established dependence and differences on hepcidin expression to haptoglobin phenotype. After applying of specific statistical methods for assignation of reference limits in  $n=195$  we updated reference values for serum hepcidin for Bulgarian population. In haptoglobin phenotype 2-2 we found reference area of  $4.19 - 37.89 \mu\text{g/l}$ .

**Scientific publications and presentations:**

- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Haptoglobin phenotype changes IMT in atherosclerosis. International Congress on Neurology and Brain Disorders (ICNBD-2019). 16.09.-18.09.2019, London, UK
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Oxidative stress and haptoglobin polymorphism. XII<sup>th</sup> National Conference in Clinical Laboratory. 04.10.-06.10.2019, Aheloy, Bulgaria
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Changed iron homeostasis due to haptoglobin polymorphism. 7th World Intracranial Hemorrhage Conference (WICH 2019). 19.05.-21.05.2019, Granada, Spain
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Polymorphism of haptoglobin may cause oxidative stress. 28th Euro-Global Neurologists Meeting (Neurologists Congress 2019). 13.06.-14.06.2019, Barcelona, Spain
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Oxidative stress caused by haptoglobin polymorphism. International Conference on Neurology and Brain Disorders. 22.07.-24.07.2019, Rome, Italy
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Haptoglobin polymorphism may cause atherosclerotic changes. 27<sup>th</sup> Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Congress and 30<sup>th</sup> National Biochemistry Congress (NBC) of TBS. 27.10.-31.10.2019, Antalya, Turkey
- Manolov V, Hadjidekova S, Vasilev V, et al. Oxidative stress and haptoglobin type 2-2. World Congress & Expo on Advanced Nursing and Healthcare. 11.11.-12.11.2019, Rome, Italy
- Manolov V, Hadjidekova S, Grozdanova R, et al. Haptoglobin polymorphism changes iron homeostasis regulator hepcidin. Global Summit on Neurology and Psychiatry. 28.11.-29.11.2019, Paris, France

**Contract 214/2018 Comparison of molecular-genetics and Immunohistochemistry methods for tumor microsatellite instability in patients with colorectal cancer**

**Research team:** Prof. Albena Parvanova Todorova-Georgieva, DSc

- Yanka Dangulova
- Assoc. Prof. Biliana Georgieva, PhD
- Prof. Zhasmina Milanova - Military Medical Academy of Sofia

**Organization unit:** Department “Medical Chemistry and Biochemistry”, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** Colorectal cancer is one of the most common oncological disease. Detection of Microsatellite instability (MSI) is clinically important as it is associated with the survival rate

and the treatment with 5-FU. The idea of this project is to implement the Short Tandem Repeats (STRs) markers for detection of MSI and to expand the number of mono-, di- and tetranucleotide STRs that are used in the lab, as this can support the oncologist with additional information about MSI status, which sometimes can't be detecting using classical immunohistochemistry method for MSI detection. Forty patients were selected for this project (26 at Stage II and 14 with methastasis). The selected STRs were selected based on the information about their instability caused by MMR DNA repair system dysfunction. The concordance between STR based method for MSI detection and the classical one was 80 %, which is similar to the data given by other authors (83-85%). It is interesting that in all but one samples, when low or high level of MSI is detected atleast one of the 2 mononucleotide STR markers BAT25 and BAT26 are showing MSI, so obviously their sensitivity is higher compare to the di- and tetranucleotide STRs that we used. The scientific team successfully implement the STR based testing for MSI determination. Based on the results we showed that relatively high concordance between this method and the immunohistochemistry based one. Nevertheless, we recommend that STR based methods for MSI detection should be implement in addition (and not instead) to the immunohistochemistry, as well as the number of used mononucleotide STR markers should be increased, because of their better sensitivity.

### **Contract 215/2018 In vitro modeling of the human epidermis for basic and applied investigations**

**Research team:** Assoc. prof. Maria Dimitrova Dragneva, PhD

- Assist Prof Nikolay Ishkitiev, PhD
- Assist Prof Silviya Kalenderova-Valkova, PhD
- Assist Prof Vessela Lozanova, PhD
- Marina Miteva, PhD student

**Organization unit:** Dept. Of Chemistry and Biochemistry, Zdrave 2 Str., Sofia 1431

**RESULTS:** With the current project we were aiming to make *in vitro* model systems, resembling human stratified epidermis and skin and to analyze the possibilities these models to be used in studying the processes, happening during the program of differentiation in the cornified epidermis, as well as the interactions between keratinocytes and fibroblasts in the formation of the skin and in model systems of skin pathologies. We successfully isolated normal keratinocytes and fibroblasts. With a systemic approach developed by the research team we separated the epidermal stem cells. The next step in our investigations turned out to be an obstacle, which we could not overcome with the available consumables, bought with the project funding. We tried to model dermis by polymerizing human collagen. Unfortunately, the collagen we used and which, according to the manufacturer's protocol should have polymerized in 15 to 30 minutes, could not form a gel during that time. Only after incubation of more than 12 hours the collagen turned into a gel, but for that time the fibroblasts sedimented at the bottom of the culture plate. They could not survive and populate the collagen gel. After one more such experiment with no success the collagen solution finished and as the project funding was over, we had to find an alternative approach. For this purpose, we decided to prepare collagen from human skin, which we were expecting to take from the Clinics of plastic and restorative and esthetic surgery of Alexandrovska Hospital. It was a huge disappointment that the epidemics rules end the planned operations in the clinic and we could not continue with our experimental

work. Until this moment we keep trying and we are expecting to resume our project work. We contacted also the Department of maxillofacial surgery of Alexandrovska Hospital, so that we could receive the necessary biological material. The chemicals and consumables which were bought with the funding of the project are being kept carefully until we are ready to use them and finish the experiments, set in the project.

**Contract 216/2018 Investigation of genotype-phenotype correlations among patients with syndrome of dystonia-tremor- variant of ataxia-teleangiectasia, due to mutation P.V2716A in *ATM* gene**

**Research team:** Assoc. prof. Teodora Chamova, MD, PhD

- Prof. Ivailo Tournev, MD, PhD, DSci
- Ani Taneva, MD, PhD student
- Tihomir Todorov, PhD
- Assist. Prof Marin Penkov, MD, PhD

**Organization unit:** Dept of Neurology, 1 G Sofiiski Str., Sofia 1431

**RESULTS:** The aim of the study is to evaluate the clinical and mutational spectrum of the Bulgarian patients with variant of AT. To assess the frequency of the most common mutation p.V2716A in *ATM* in the region of the towns Dospat and Sunica, where this disorder is very frequent. The study group consisted of 28 affected. The underwent neurological, neuroophthalmologic and neuropsychologic assessments, evaluation of alfafetoprotein in serum (AFP), nerve conduction studies (NCS) and brain magnetic resonance imaging (MRI). The presence of immune deficiency was evaluated in 5/28. In order to test the hypothesis for endemic region for *ATM*, we screened 100 newborns from Dospat and Sarnica for . p.V2716A in *ATM*. The mean age at onset was 8.3 years  $\pm$  9.3 years, with a broad variation between 14 days and 40 years. The main clinical features encompassed dystonia, chorea, static and postural tremor, affecting predominantly the neck and the upper limbs, dysarthria and dysphagia with slow progression with age. Mild ataxia of stance and gait was present in 5/28, while in 4/28 dilated conjunctival vessels were observed. No cognitive impairment was present in our group. In 4/17 mild axonal polyneuropathy of lower limbs was present. Brain MRI was normal in all the tested individuals, except 1, where cerebellar atrophy was found. AFT was elevated in all the 13 tested. The immunological assessment revealed increased ANA in 5/5 and absolute lymphopenia in 3/5, without history of prior frequent infections. Whole exome sequencing (WES) revealed that 24/28 were homozygous for p.V2716A, while the rest 4 were compound heterozygous, shearing the following mutations as a second one p.Lys119 or c.4909+1G. A frequency of 1% of p.V2716A in *ATM* gene was found during the neonatal screening. The mutations in *ATM* gene are causing a broad spectrum of clinical features. The patients with dystonia and chorea, especially from Dospat and Sarnica region with a clinical onset in childhood and increased AFT, event without ataxia or teleangiectasia, should be tested for AT.

**Scientific publications and presentations:**

- Chamova T, Tournev I. Clinical and genetic variability of ataxia teleangiectasia (Louis Bar disease). *Bulgarian Neurology*. 2019; 1:17-21.
- Chamova T, Todorov T, Kancheva D, et al. Clinical and genic spectrum of the Bulgarian patients with variant of ataxia-leleangiectasia. Conference "Day of rare diseases", Sofia 28-29.02.2020.

**Contract 217/2018 Clinical-genetic spectrum of limb-girdle muscular dystrophies in Bulgaria**

**Research team:** Prof. Ivailo Lyudmilov Tournev, MD, PhD, DSci

- Assoc. prof. Teodora Chamova, MD, PhD
- Ani Taneva, MD
- Tihomir Todorov, PhD
- Marin Penkov, MD, PhD

**Organization unit:** Dept of Neurology, 1 Sveti Georgi Sofiiski str., Sofia 1431

**RESULTS:** the aim of the study was to evaluate the clinical-genetic and genetic-epidemiological spectrum of these hereditary neuromuscular diseases, which would contribute to the systematization of available clinical information, the improvement of care and follow-up of these patients, their referral for genetic counseling and gene therapy, scientific studies and international collaboration. The study included 72 patients with proximal muscle weakness in the lower limbs. Clinical examination, including neurological status, functional scales for muscle strength testing, electromyographic examination, genealogical and molecular genetic methods were performed of all patients. MRI/ CT of muscles of the lower limbs and pelvic girdle of 22 people were performed. The clinical spectrum is broad in terms of age at onset and rate of progression. Initial manifestations include proximal muscle weakness in the lower limbs, followed by involvement of the upper limbs such as LGMD 2C, 2A, 2Z, or the distal leg muscles at 2G, *TARDPB1* mutation. In MYH7-related myopathy, the onset is from the distal muscles of the lower limbs with subsequent involvement of the proximal ones. Achilles tendon shortening and scapular winging are often observed. The EMG study reports myogenic damage in all patients. Cardiac and respiratory function are preserved in most patients. MRI examination of muscles describes characteristic findings in the separate groups. Creating and evaluating correlations between the clinical findings and MRI descriptions of the muscle of patients with limb-limb muscular dystrophy contributes to the easier genetic diagnosis of these patients and the establishment of more detailed clinical-genetic correlations. Specific MRI patterns of muscle involvement in patients with LGMD contribute to direct genetic testing for a concrete form. Muscle MRI becomes one of the main diagnostic methods in the general algorithm for the diagnosis of LGMD.

**Scientific publications and presentations:**

- Taneva A, Chamova T, Bichev S, et al. Limb-girdle muscular dystrophy 2G in the religious minority of Bulgarian muslims, homozygous for c.75G>A, p.Trp25X mutation. *Bulgarian Neurology* 2019; 2:71-76.
- Taneva A, Chamova T, Tournev I. Clinico-genetic correlations of LGMD subgroups in Bulgaria. Conference "Day of rare diseases", Sofia 28-29.02.2020.
- Taneva A, Chamova T, Tournev I. Clinico-genetic and epidemiological study of LGMD2C (gamma-sarcoglycanopathy) with C283Y mutation in Bulgaria. Conference "Day of rare diseases", Sofia 28-29.02.2020.

**Contract 218/2018 New biomarkers for endothelial dysfunction in patients with disorders of carbohydrate metabolism**

**Research team:** Prof. Zdravko Asenov Kamenov, MD, PhD, DSci

- Antoaneta Gateva, MD, PhD
- Iveta Nedeva, MD
- Vera Karamfilova, MD
- Yavor Asyov, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Internal Medicine , 1 George Sofiiski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The study included 163 patients with a mean age of  $52.5 \pm 11.3$  years, divided into four groups- group 1- healthy controls (n = 42), group 2 with obesity without carbohydrate disorders (n = 40), group 3 with prediabetes (n = 42), group 4 with newly diagnosed diabetes mellitus (n = 39). We found that serum endocan levels were significantly higher in obese and prediabetic patients compared to healthy controls. Correlates positively with the waist to hip ratio and negatively with HDL levels. Serum Netrin-1 has lower levels in patients with obesity, prediabetes and diabetes compared to healthy controls. There is a statistically significant proportional relationship between its levels, the risk of autonomic neuropathy, and body mass index. It is negatively correlated with liver parameters and triglycerides and has a good predictive effect on the risk of a carbohydrate disorder. A statistically significant difference was reported between podocalyxin levels in patients with and without impaired carbohydrate metabolism. It was positively correlated with BMI, waist circumference and some indicators of micro and macrovascular complications (thickness of intima-media; ankle-armpit index and risk of developing autonomic neuropathy). There were no statistically significant differences in the levels of Kiseptin between healthy controls and patients with obesity and carbohydrate metabolism disorders. There was no correlation between the marker and the studied indicators for macro and microvascular complications.

**Scientific publications and presentations:**

- Nedeva I, Gateva A, Assyov Y, et al. Relationship between circulating netrin-1 levels, obesity, prediabetes and newly diagnosed type 2. Arch Physiol Biochem. 2020; 1-6.

**Contract 219/2018 Neuropsychological, cerebrospinal and neuroimaging markers in early diagnosis of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases**

**Research team:** Acad. prof. Latchezar Dinchev Traykov, MD, PhD, DSc

- Assoc.Prof. Mehrabian - Spasova, MD, PhD, DSci
- Assoc.Prof. Margarita Raycheva, PhD
- Mariya Petrova, MD, PhD
- Silvia Skelina, MD, PhD
- Todor Kunchev, MD, PhD
- Diyana Belezhanska, MD

**Organization unit:** Dept. of Neurology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The main objective of this study is to identify sensitive and specific neuropsychological, CSF and neuroimaging markers for early diagnosis/differential diagnosis of Alzheimer's disease and common diseases. Differential diagnosis of various forms of Alzheimer's disease (AD) and variants of frontotemporal dementia (FTD) are often challenging due to overlapping clinical symptoms. We investigated the levels of phospho181-tau (p-tau),



total-tau (t-tau) and amyloid  $\beta$  1-42 (A $\beta$ 42) in the CSF of n = 55 patients with Frontotemporal Dementia (FTD) and Alzheimer's Disease. Patients with FTD are divided into two subgroups - behavioral variant (bv-FTD, n = 21) and primary progressive aphasia (PPA, n = 10). The group of patients with AD includes typical (n = 13) and atypical forms (n = 11). The diagnoses are based on the revised criteria for AD, bv-FTD and PPA. Neuroimaging and detailed neuropsychological examination, including tools for assessing neuropsychiatric, emotional and cognitive status, were also conducted in patients. The amyloid levels of amyloid  $\beta$ 42 are significantly lower in the typical and atypical forms of AD compared to PPA and bv-FTD, while the levels of t-tau and p-tau are, respectively, significantly higher. The ratio between the CSF t-tau /amyloid  $\beta$ 42 is significantly low in the different variants of FTD compared to AD. In the subgroups, the ratio of CSF t-tau/amyloid  $\beta$ 42 was significantly higher in patients with PPA compared to those with bv-FTD. The biomarker profile of AD with early onset is very similar to the typical and atypical forms of AD, while in the different variants of FTD specific biomarker profile has not been established. Visual MRI scales show that the levels of tau in CSF correlate significantly with cortical atrophy. After CSF biomarkers analysis, a change in diagnosis occurred in 21% of patients, based on the correlation between the clinical picture of the disease, neuroimaging, detailed neuropsychological profile and the results of the CSF study.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Belezhanska D, Popivanov I, Stoyanova K, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease and Frontotemporal dementia. XVIII National neurological congress. Golden sands. 16-19.05.2019.
- Belezhanska D, Popivanov I, Stoyanova K, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Early onset dementia. WPA thematic congress. Ohrid. 15-18.05.2019.

#### **Contract 220/2018 Complex assessment of the characteristics of the glucose profile in prediabetes**

**Research team:** Prof Tsvetalina Ivanova Tankova, MD, DSci

- Ass. Prof. Greta Grozeva-Damyanova, MD, PhD
- Ass. Prof. Nevena Chakarova, MD, PhD
- Ass. Prof. Roumyana Dimova-Draganova, MD, PhD
- Ani Tododrova, MD – PhD student
- Mina Serdarove, MD – PhD student
- Polina Tsarkova, MD – PhD student

**Organization unit:** Department of Endocrinology, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of the study is to assess glucose variability in subjects with prediabetes. 107 subjects (24 males and 83 females, mean age  $49.7 \pm 11.5$  years, mean BMI  $30.4 \pm 6.3$  kg/m<sup>2</sup>), divided into 2 groups according to glucose tolerance: 43 with normal glucose tolerance (NGT) and 64 subjects with prediabetes the latter group being subdivided into 24 subjects with impaired fasting glucose (IFG), 24 with impaired glucose tolerance (IGT) and 16 with the combination of IFG+IGT, were enrolled. Glucose tolerance was assessed by OGTT with serum glucose measured by hexokinase method. HbA1c was assessed immunoturbidimetrically. CGM was performed with professional sensor FreeStyle LibrePro. Glucose variability indices SD ( $p < 0.0001$ ), CV ( $p < 0.0001$ ), CONGA1 ( $p = 0.014$ ), L-index ( $p < 0.0001$ ), J-index ( $p < 0.0001$ ), HBGI ( $p < 0.0001$ ), GRADE ( $p = 0.019$ ) and MAGE ( $p < 0.0001$ ), HbA1c level ( $p = 0.020$ ) and mean

interstitial glucose ( $p=0.006$ ) are significantly higher in prediabetes compared to NGT. Time in range is significantly decreased ( $p<0.0001$ ) and time above range ( $p<0.0001$ ) is significantly increased in prediabetes compared to NGT. No significant difference is found between IFG and IFG+IGT in glucose variability indices, mean glucose and HbA1c ( $p>0.05$ ). IGT group presents with significantly decreased levels of HbA1c ( $p=0.020$ ), mean glucose ( $p=0.011$ ), CONGA ( $p=0.011$ ), J-index ( $p=0.023$ ), LBGI ( $p=0.036$ ) and M-value ( $p=0.047$ ) compared to IFG+IGT and significantly decreased mean glucose ( $p<0.0001$ ), CONGA ( $p<0.0001$ ), L-index ( $p=0.016$ ) J-index ( $p=0.001$ ), LBGI ( $p=0.001$ ), M-value ( $p=0.001$ ) and MAG ( $p<0.0001$ ) compared to IFG. There is a significant increase in both mean glucose concentration and glucose variability in prediabetes. Glucose variability seems to be different in the separate prediabetes categories. The assessment of glucose variability in prediabetes probably has additional role in the evaluation of glucose homeostasis at these early stages of dysglycemia.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Dimova R, Chakarova N, Grozeva G, et al. Evaluation of the relationship between cardiac autonomic function and glucose variability and HOMA-IR in prediabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2020;17(5): 1479164120958619.

#### **Contract 221/2018 Investigation of Mitochondrial DNA in Patients with Schizophrenia**

**Research team:** Assist Prof Elena Mihailova Ivanova-Genova, MD, PhD

- Prof. Vihra Milanova, MD, DSci
- Assoc. Prof. Snejina Kandilarova, PhD
- Aisel Chitakova, MD
- Tzetelin Lukanov, PhD

**Organization unit:** Dept. of Psychiatry and Medical Psychology, 1 St. G Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** Oxidative phosphorylation in mitochondria is the major source of aerobic energy for the functioning of neurons, and the key genes are located in mitochondrial DNA (mtDNA). A number of mitochondrial deficits have been established in schizophrenia but the efforts to identify the genetic markers in mtDNA predisposing to the disease are limited at present. The aim of the present pilot study was to search for pathogenic mutations or variants potentially associated with development of schizophrenia. The study involved 37 patients (27 males and 10 females) with schizophrenia and the results were compared with those of 23 unrelated healthy controls (7 males and 16 females). The Illumina MiSeq® System was used as a sequencing platform. The bioinformation data were processed using mtDNA Variant Processor, mtDNA Variant Analyser (Illumina), mtDNA-Server. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) was used to evaluate the mental status of the patients with schizophrenia; D. Goldberg's General Health Questionnaire (GHQ) with normative threshold for the Bulgarian population of  $\leq 11$  points was used in the screening of the healthy controls' mental status. The results obtained by the NGS platform revealed presence of a total of 338 variants in the patients and 237 variants in the healthy people (single nucleotide variants, point mutations, deletions). Two pathogenic mutations were found in the patients, m.11778 A>G and m.4115 T>C, respectively, the latter being a newly identified one. The polymorphic variant m.1811A>G (MT-RNR2) was observed in 30% of the patients (1811G,  $P=0.07$ ) but not in the healthy people studied. The establishment of two definitively pathogenic mutations (one associated with Leber's

hereditary optic neuropathy (LHON) and the other a newly established one in a conserved region of the NADH dehydrogenase 1 gene) in 19 patients with schizophrenia is a significant proof of a limited bioenergetic flexibility of mitochondrial oxidative phosphorylation. The polymorphic variant found at position 1811 participates in the encoding of the 16S ribosomal RNA and is a promising potential biomarker of the disease.

**Scientific publications and presentations:**

- Ivanova E, Mihailova S, Chitakova A, et al. Study of Mitochondrial DNA in Schizophrenic Patients, General Medicine, 1/2020
- Ivanova E, Mihailova S, Chitakova A, et al. Potential implication of genetic variations in mitochondrial genome for schizophrenia development (poster presentation), Tenth international medical congress, Clinical & Translation Medicine. Challenges in the Healthcare Systems - 21 century. Values & Principles, Sofia, 5-8 September 2019, 48-49.

**Contract 222/2018 Phytopharmacological potential of plants from Asteraceae family assessed by chemical and biological profiling**

**Research team:** Assoc. Prof. Reneta Slavova Gevrenova, PhD

- Assoc. Prof. Dimitrina Zheleva-Dimitrova, PhD
- Assist. Prof. Vessela Balabanova-Bozushka, PhD
- Assoc. Prof. Niko Benbassat, PhD
- Assoc. Prof. Paraskev Nedyalkov, PhD
- Assoc. Prof. Yulian Voynikov, PhD
- Bozana Dimitrova, PhD student
- Alexandra Ivanova Petrova, student
- Sofia Alkiviadis Nusikuru, student

**Organization unit:** Dept. of Pharmacognosy, 2 Dunav str. 1000 Sofia

**RESULTS:** The main approaches in the modern phytopharmaceutical paradigm are in-depth chemical and biological profiling along with bioinformatics methods. The project aimed at phytochemical and biological profiling of 8 plant species representative for 5 tribes from Asteraceae family: *Telekia speciosa*, *Cirsium appendiculatum*, *Senecio nemorensis*, and *Tanacetum macrophyllum*, spread in Bulgaria, and Turkish endemic *Centaurea patula*, *C. urvielli* subsp. *hayekiana*, *C. kotschy* var. *persica*, *C. drabifolia* subsp. *detonsa*. Metabolic profiling and targeted metabolic analyses were performed by HPLC-UV, liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and gas chromatography – high resolution mass spectrometry (GC-HRMS). Studied extracts were tested for radical scavenging activity, ferric and cupric reducing abilities, metal chelating activity, phosphomolibdenum assay, total polyphenol and flavonoid content. Enzyme inhibitory activity against acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and tyrosinase was assayed. LC - Orbitrap MS strategy for identification and putative elucidation was developed for more than 150 secondary metabolites including 10 hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, 13 phenylethanoid glycosides, 36 acylquinic acids, 19 flavons and flavonols, 23 methoxylated flavonoids, 35 sesquiterpenes, 8 monoterpenes, 2 fatty acids, 1 fatty alcohol and 6 pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides. *T. speciosa* roots and flower heads were characterized with phenylethanoid glycosides; *T. macrophyllum* flower heads – with a variety of diacylquinic acids and sesquiterpenes lactones; *C. appendiculatum* roots and flower heads – with methoxylated

flavones. For the first time the phytochemical profiling of the studied *Centaurea* species was assayed. *T. macrophyllum* flower heads and roots и *C. appendiculatum* roots displayed the highest antioxidant potential. *C. appendiculatum* roots showed the most prominent acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and tyrosinase inhibitory activity. *C. appendiculatum* and *T. speciosa* roots, and *T. macrophyllum* flower heads appeared to be multifunctional agents with impact on oxidative stress and inhibitory activity on key enzymes. Taxa are plant-leaders and worth investigating in the following studies. The project has theoretical and applied scientific values.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R et al. A comparative assessment of the LC-MS profiles and cluster analysis of four *Centaurea* species from Turkey. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;20:101189.
- Balabanova V, Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Benbassa Nt, Gevrenova R. A view on biological activity of selected Asteraceae species grown on Vitosha Mt. (Bulgaria). 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 Jun 2019.
- Voynikov Y, Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Balabanova V, Nedyalkov P, Gevrenova R. UHPLC-HRMS profilings of selected Asteraceae species grown on Vitosha Mt. (Bulgaria). 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 Jun 2019.
- Zheleva-Dimitrova D, Zengin G, Balabanova V, Nedyalkov P, Gevrenova R. UHPLC-HRMS profilings of Bulgarian and Turkish endemic species from Asteraceae. 4<sup>th</sup> International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf. Albena, Bulgaria, 29 May - 01 Jun 2019.
- Balabanova V, Zengin G, Zheleva-Dimitrova D, Benbassat N, Gevrenova R. Phytochemical and biological insight into *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. and *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. & Kit) Schultz Bip. (Asteraceae). 7th Congress of Pharmacy with international participation. Borovets, Bulgaria. 21-24 Nov 2019.

#### **Contract 223/2018 Investigation of biological and molecular characteristics of pericoronal follicular tissues and cysts in vitro**

**Research team:** Assoc. Prof. Pavel Kirilov Stanimirov, PhD, MD, DDS

- Assist. Prof. Zornitsa Mihaylova, PhD, DDS
- Assist. Prof. Nikolay Ishkitiev, PhD, PhD, DDS
- Marina Miteva, student
- Assoc. Prof. Maria Dragneva, PhD
- Assist. Prof. Silvia Kalenderova-Valkova, PhD,
- Assist. Prof. Evgeniy Petkov, PhD, MD, DDS

**Organization unit:** Dept. of Dental Oral and Maxillofacial Surgery, 1431 G. Sofiyski str. 1

**RESULTS:** Dental follicle is a loose connective tissue that surrounds the developing germ prior tooth eruption. Stem cells of pericoronal follicular tissues can be isolated and cultivated in appropriate conditions. The aim of this study is to isolate pericoronal dental follicular stem cells (pDFSCs) and to reveal their ability of mesenchymal and epithelial markers expression, as well as to differentiate into various cell types. DFSCs were isolated and seeded at standard cell culture

conditions. Cell morphology and expression of stem cell specific and tissue specific markers were determined via fluorescent microscopy. Osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation capacity of the isolated cells was stimulated. For this purpose cells were seeded for 10 days with dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate for osteogenic, Dexamethasone, IBMX and Insulin for adipogenic and dexamethasone, ascorbic acid and TGF- $\beta$ 1 for chondrogenic differentiation. Stem cell differentiation ability was detected via immunofluorescence, Alizarin red, Oil red and Alcian blue staining. The isolated cells reveal positive fluorescent expression for both, mesenchymal and epithelial markers. pDFSCs were expressing stem cell markers and were capable in appropriate conditions to differentiate into various cell types, including osteoblasts, chondroblasts and adipocytes. There is a pool of stem cells with specific phenotypes in the dental follicle capable of multilineage differentiation. Dental Follicle may present yet another promising pool for Human Adult Stem cells.

**Scientific publications and presentations:**

- Ishkitiev N, Miteva M, Mihaylova Z, et al. Dental Follicle: a Source of Stem Cells, poster, 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), June 2019, Vancouver, Canada.

## **STIMULATION OF SCIENTIFIC RESEARCH IN AREAS OF EXCELLENT ACHIEVEMENT 2019**

### **Contract 237/2019 Application of PRF (Platelet rich fibrin) in surgical periodontal therapy**

**Research team:** Assoc. Prof. Antoaneta Miteva Mlachkova, MD, PhD

- Assist. prof. Velitchka Dosseva - Panova, MD, PhD
- Assist. prof. Hristina Maynalovska, MD
- Assist. prof. Zdravka Pashova-Taseva, MD, PhD student
- Prof. Hristina Popova, MD, PhD
- Ivan Ivanov, MD, PhD student

**Organization unit:** Department of Periodontology, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** In the current project participated 20 patients diagnosed with moderate to severe periodontitis. The diagnosis was established with clinical (probing pocket depth, clinical attachment level) and radiographic methods. The radiographic assessment displayed sites with vertical bone loss and intraosseous bone defects. The patient were divided into 2 groups. The first group was treated with surgical approach combined with both PRF and bone substitute material. The second group – with surgical approach combined only with bone substitute. The aim of the current research is to evaluate the effects of the two surgical protocols in the treatment of periodontitis when vertical bone defects are present. The obtained results can be evaluated by the gain of clinical attachment level. It is a result of development of new attachment, reattachment, which is achieved by reconstruction of the lost due to the periodontal disease connective tissue attachment to the root surface. According to the project researchers, the main goals of the regenerative periodontal therapy are achieved: Regeneration of new cementum; Regeneration of new periodontal ligament; Regeneration of new bone. The results demonstrate significant new bone formation in all patients – 2.48 mm (average). Comparing the two groups there is statistical significant difference in the evaluated parameters. In the first group, which is treated with Cerabone + PRF the depth of the residual bone defect is 0.56 mm, while in the second group, treated only with Cerabone - 1.64 mm. In the first group the bone fill is 4.05 mm. In the second – 2.54 mm. The radiographic angle of the treated bone defects was  $\approx 30^\circ$  ( average  $29.34^\circ$ ). In the group treated only with Cerabone the average angle is  $26.82^\circ$ . In the other group, Cerabone+PRF –  $30.89^\circ$ . It draws the conclusion that the radiographic angle between  $30^\circ$  and  $33^\circ$  is most suitable for optimal bone regeneration. In the current research the following statistical significant differences considering the sex of the patients are established: Periodontal pocket depth; Clinical attachment gain; Radiographic depth of the bone defect prior and after surgery; Ratio bone loss/age of the patient; FMPS; BoP. Between the two evaluated groups the following statistical significance ( $p < 0.05$ ) was established: Periodontal pocket depth; Clinical attachment gain; Bone gain. Between the two evaluated groups the following statistical significance ( $p < 0.01$ ) was established: Radiographic depth of the bone defect prior and after surgery and bone fill measured in mm.

**Scientific publications and presentations:**

- Maynalovska H, Popova C, Mlachkova A. Radiographic evaluation of bone filling in intrabony periodontal defects with Cerabone® as a bone replacement graft: case series. Journal of IMAB – 2022;22(2)

**Contract 238/2019 Monitoring the clearance of high-risk types of human papillomavirus infection in women with cervical areas of koilocytes and/or the presence of low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix**

**Research team:** Assist. Prof. Bilyana Georgieva Georgieva, PhD

- Prof. Albena Todorova-Georgieva, DSci
- Anita Kavrakova, PhD
- Kremena Mesechkova, PhD-student
- Yanka Dangulova,

**Organization unit:** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical University Sofia, Bulgaria

**RESULTS:** The aim is to monitor the efficacy of clearance of high-risk human papillomavirus (HPV) infection in women with cervical areas of koilocytes and/or low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix (ASC and LSIL). Current screening methods as DNA analysis for High-risk HPV genotyping and liquid-based cytology (TBC) were applied. The most commonly detected high-risk HPV in the group of ASC were: 16 type (8/25 = 32%); 18 type (6/25 = 24%); 31 type (5/25 = 20%). High-risk types 33, 35 and 56 were distributed with an equivalent percentage 33, 35, 56/25 = 8%. We detected 3 patients with co-infection of 16/31 type HPV (12%) and 2 with co-infection of 16/31/35 type HPV (8%). The most commonly detected high-risk HPV in the group of LSIL were: 16 type (5/10 = 50%); type 18 (3/10 = 30%), while types 31 and 56 were detected with an equivalent prevalence rate of 33,56/10 = 10%. We detected 3 patients with co-infection of 16/31, 16/18 and 16/56 types. The prevalence rate of each variant of co-infection in this subgroup was 10%. The next therapeutic approaches were used in the ASC and LSIL groups of HPV infected patients: Isoprinosine, Coriolus, Isoprinosine + Cordyceps as adjuvant and palliative monitoring. After the performed treatments in both cytological groups almost complete clearing of HPV in ~ 70% and a cytological regression to improvement or normal condition were observed. HPV 16 was observed as a persistent high-risk type, considered to have the highest oncogenic potential and a dominant role by long-term infection in patients with co-infection. In these cases there is no cytological positive change. The applied therapeutic approaches showed similar results in terms of the clearance period of high-risk HPV types with the highest efficacy reported for Coriolus. HPV 16 showed the highest resistance to various treatments.

**Contract 239/2019 The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms in anticoagulant therapy management in postoperative period after cardiac surgery**

**Research team:** Assoc. Prof. Milena Georgieva Velizarova, MD, PhD

- Prof. Dobrin Svinarov, MD, PhD, DSci
- Assist. Prof. Julieta Hristova-Dimitrova, MD, PhD
- Assist. Prof. Filip Abedinov, MD, PhD

**Organization unit:** Dept. of Clinical Laboratory, 1 St. George Sofiyski Str., 1431 Sofia.

**RESULTS:** Cardiac surgery is associated with an inflammatory response promoting a hypercoagulable state, which requires successful postoperative anticoagulation. Our aim was to investigate the influence of genotype variants at two loci on acenocoumarol response after cardiac surgery. 200 post-op patients given acenocoumarol thromboprophylaxis were reviewed for international normalized ratio (INR) values on the first five days of acenocoumarol treatment. Genotyping for VKORC1 1639G>A and CYP2C9\*2&\*3 polymorphisms was done by RT-PCR. Significant differences among genotypes in INR on the 1<sup>st</sup>, the 3<sup>rd</sup> and the 5<sup>th</sup> day after therapy beginning were assessed. Median age at surgery was 63.9±10.8 years; 66.5% were male. Median BMI was 28.6±5.4 kg/m<sup>2</sup>. Genotype distribution for VKORC1 and CYP2C9 was G/G\*1/\*1–24.5%, G/G\*1/\*2–9.5%, G/G\*1/\*3–7%, A/G\*1/\*1–27%, A/G\*1/\*2–10%, A/A\*1/\*1–9.5% and A/A\*1/\*2–5%. Comparison of INR revealed no significant differences among genotypic groups on days one (p =0.51) and five (p =0.67). Differences in INR were detectable by day three (p = 0.02). Normal responders were more likely to be subtherapeutic with INR<1.5 (p<0.05) compared to those with mutant genotype. Genotypes A/G\*1/\*1, A/G\*1/\*2, A/A\*1/\*1 and A/A\*1/\*2 are associated with a higher incidence of "hyperreactive" results (INR> 3.5) and a higher risk of bleeding. The comparison of normal responders (n = 82) to the collective cohort of hyperresponders (n =103) revealed that the former group had both a significantly lower INR on the third day of acenocoumarol treatment. Presence of a mutant allele of VKORC1 1639G>A and CYP2C9 \*2 and \*3 increased the odds of requiring a lower mean dosage of acenocoumarol. Wild-type patients at both loci had yet to reach therapeutic INR or being subtherapeutic by day three more frequently than those with mutation variants.

**Contract 240/2019 Development of a targeted panel-based genetic test for identification of mutations leading to inherited eye diseases**

**Research team:** Prof. Radka Petrova Kaneva, PhD

- Prof. Sylvia Cherninkova, MD, PhD, DSci
- Prof. Ivailo Tournev, MD, PhD, DSci
- Kunka Kamenarova, PhD
- Daniela Pencheva, PhD
- Kalina Mihova, MSc
- Radosveta Bozhilova, MSc
- Felitsiya Shakola, PhD
- Veronika Petkova, MSc
- Acad. Prof. Vanio Mitev, MD, PhD, DSci

**Organization unit:** Dept. of Medical Chemistry and Biochemistry, Molecular Medicine Center

**RESULTS:** Inherited retinal diseases (IRD) are a heterogeneous group of diseases that mainly affect the retina; more than 300 genes have been linked to the disease and more than 20 different clinical phenotypes have been described. This heterogeneity at both the clinical and genetic levels complicates the identification of causative mutations. Therefore, a detailed genetic characterization is important for genetic counselling and decisions regarding treatment. The purpose of our study was to identify mutation spectrum of a Bulgarian cohort of 16 unrelated patients with different IRDs. In this study, we developed a method based on targeted next generation sequencing (NGS) that we applied to 149 IRD-associated genes in our and the



common population, 59 disease-associated intronic regions, and three mitochondrial genes (0.6 Mb genomic region). A systematic filtering approach coupled with copy number variation analysis was used to identify likely disease-causing variants, subsequently confirmed by Sanger sequencing and co-segregation analysis when possible. A total of 16 pathogenic mutations, 4 of which were first described in this study (25%), were found in 81% of IRD patients (13/16). Mutations in 9 of the most frequent IRD genes, *ABCA4*, *PRPH2*, *USH2A*, *BEST1*, *GUCA1B*, *RPI*, *RGR*, *CDHR1* and *RHO*, ranged from 100% for macular degeneration cases, 57% for Retinitis pigmentosa cases, 100% for syndromic cases (Usher syndrome), and 100% for cone-rod dystrophy cases. In three male patients (19%) with Retinitis pigmentosa genetic cause of the retinopathy was not found, may be because of uncovered region in a main gene for the X-linked form of the disease, *RPGR*. Furthermore, interfamilial phenotypic variability was suggested in one case (affected by *GUCA1B*-retinopathy). In summary, our results demonstrate the usefulness of targeted NGS approach based on frequently mutated and population-specific loci as a comprehensive and successful genetic diagnostic tool for IRDs with further impact on patients counseling and management.

#### **Scientific publications and presentations:**

- Mermeklieva E, Kamenarova K, Mihova K, et al. A rare case of RGR/CDHR1 haplotype indentified in Bulgarian patient with cone-rod dystrophy, *Ophthalmic Genetics* 2021:1-6.

#### **Contract 241/2019 Investigation of the changes in the thermodynamic parameters in the blood plasma of patients with breast cancer during the course of treatment with chemotherapy and radiotherapy**

**Research team:** Assist. Prof. Silviya Marcheva Abarova, PhD

- Prof. Boris Tenchov, PhD
- Assist. Prof. Borislava Mircheva, PhD
- Prof. Petranka Kaneva-Troyanova, MD, PhD
- Assist. Prof. Nadia Nakova, MD
- Iliya Gabrovski, MD
- Assist. Prof. Iva Valkova, PhD
- Stella Zaharinova – student

**Organization unit:** Dept. of Medical Physics and Biophysics, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia

**RESULTS:** The aim of this project was to determine the conformational changes which have occurred in the main plasma proteins in patients with breast cancer who have undergone chemo- and radiotherapy compared to the control group of healthy individuals. This research could give an additional important information concerning the effect of both therapeutic methods on the development of the disease and the result of the treatment. Another fundamental aim of the project was to investigate the processes of interaction between human serum albumin (main plasma protein and drug transporter) with drugs used in the course of treatment of breast cancer. This included studying the structure characteristics of the protein and the type of interaction after binding to the drug which could play an important role to the therapeutic effect of the drug. According to our team this is a very intriguing research problem with huge contribution to the clinical oncology. From the conducted studies using DSC, fluorescent and UV-Vis absorption spectroscopy we received the following results: DSC thermoprofiles of the plasma proteome of patients with breast cancer differ from the of the control group (healthy individuals). The

thermograms of patients on adjuvant chemotherapy as well as those with combined chemo- and radiotherapy is shown a change in the temperature of denaturation, extended peaks of albumin and immunoglobulins and presence of additional high-temperature peaks. Epirubicin forms a stable complex with the plasma protein, which is due to the non-spontaneous hydrophobic interactions between the protein and the ligand which lead to partial immobilization of the plasma protein. High concentrations of Epirubicin lead to dramatic increase of post-denaturation aggregation of HSA. The chemotherapeutic Pertuzumab forms stable complexes with the plasma proteins albumin and fibrinogen by a static type of interaction which leads to significant conformational changes around the binding site and substantial changes in the thermostability of the plasma proteins.

**Scientific publications and presentations:**

- Abarova S, Papageorgiu A, Ivanov Y. et al. Warfarin replaces dexamethasone in drug complexes with human serum albumin. A fluorescence spectroscopy study. Bulgarian Chemical Communications. 2020; 52 (3): 404-408.
- Abarova S, Antonova B, Stoichkova K. et al. Spectroscopic and thermodynamic characterization of the chemotherapy drug Epirubicin interaction with human serum albumin. Bulgarian Chemical Communications
- Zaharinoва S, Abarova S, Nakova N. et al. Biophysical methods for studying the interaction of plasma proteins with chemotherapeutics for the treatment of breast cancer. 48th National Conference on Physics Education. Sofia. 2-4 Oct 2020.
- Antonova B, Abarova S, Zaharinoва S, et.al. Binding studies of cisplatin accord chemotherapy drug with blood plasma proteins, a microcalorimetry and spectroscopy study. XIII National medical physics and biomedical engineering conference: NMPEC-2020, Sofia. November 2-13 2020.
- Nakova N, Troyanova P, Gabrovski I, et.al. Interaction of a monoclonal antibody drug, Pertuzumab, with human serum albumin (HSA): application of spectroscopic and thermoanalytical techniques. XIII National medical physics and biomedical engineering conference: NMPEC-2020, Sofia. 2-13 Nov 2020.