

## РЕЗЮМЕТА НА

### НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, ПРЕДСТАВЕНИ ЗА УЧАСТИЕ В КОНКУРСА ЗА АКАДЕМИЧНАТА ДЛЪЖНОСТ „ПРОФЕСОР”

#### I. Публикации в списания реферирани в Web of Science, SCOPUS или в списания с IF и SJR-фактор:

1. *Panteva, M. Varadinova, T., Shishkov, S. Hrisati, S., Bontchev, P. 1997. Effect of Complexes of amino acids with biometals - Influence on virus-cell interaction. Amino Acids, 13(1): 75.*

*IF = 0.806\**

*реферирана в SCOPUS*

Аминокиселините (АК-те), като естествени лиганди на биометалите, са техни основни транспортни молекули в организма, както и регулатори на хомеостазата на металите вътре в клетката. Промяната в нивата на биометалите, като цинк и мед, са тясно свързани с различни патологични процеси и в частност вирусни инфекции. Целта на настоящето изследване беше да се определи ролята на АК-те лизин, аргинин, хистидин и серин при взаимодействието между вирус Herpes simplex и клетката гостоприемник. При експерименталната постановка беше използвана клетъчна линия MDBK и вирус Herpes simplex тип 1 и 2. Използвани бяха комплекси на гореспоменатите АК с Zn(II) и Cu(II). Беше определена цитотоксичността на комплексите, влиянието им върху инфекциозността на извънклетъчните вириони както и на вирусната репликация в клетките. Експериментите са проведени при използване на MDBK и Херпес симплекс вирус типове 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2).

2. *Stankova, I., S. Shishkov, K. Kostova, A. Galabov. 2010. New Analogues of Acyclovir® - Synthesis and biological activity. Z. Naturforsch., 65: 29-33.*

*IF = 0.84, SJR=0.397*

*Цитирания – 1 (1 в списание с IF, 1 - SJR)*

Синтезирани нови естери на ацикловир с пептидомиметици бяха изследвани *in vitro* за наличие на антивирусна активност спрямо репликацията на Херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2). Установена е антивирусна активност на пептидомиметиците съдържащи оксазол и тиазол-тиазолови съединения. Естерите бяха синтезирани чрез двойката реагенти N-ethyl-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид хидрохлорид (EDC) и N,N-диметил-4-аминопиридин (DMAP) като катализатор.

3. *Kostova, K., Hinkov, A., Shishkov, S., Todorov, D., Dimitrova, M., Yordanova, Z., Kapchina-Toteva, V. 2011. Antiherpes 1 Activities of Some Medical Plants from the Lamiaceae. Antiviral Res., 90 (2): A56. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.03.106.*

*IF=4.301, SJR=1.616\**

*реферирана в Web of Science*

*Цитирания – 1 (1 в списание с SJR)*

Хлороформи, етанолови, метанолови и водни екстракти получени от нативни и *in vitro* размножавани растения *Lamium album* L. и *Leunurus cardiaca* L. успешно блокират репликацията на човешки херпесен вирус тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в клетъчна линия MDBK без видима цитотоксичност. Хлороформните екстракти показват най-висока активност. 50% -та ефективната доза (ED<sub>50</sub>) на хлороформните екстракти на

нативни растения *Leunurus cardiaca* L. са идентични – 80 mg/ml спрямо вирусите. Инхибиторния ефект на останалите екстракти са подобни или по-слаби. ЕД<sub>50</sub> на *in vitro* екстрактите от *Lamium album* L. са съответно 550 mg/ml и 467 mg/ml, съответно. При екстрактите от нативните растения – 668 mg/ml и 780 mg/ml. Вирусната репликация е потисната до над 90% при прилагане на хлороформните екстракти в максимална нетоксична концентрация (МНК). Метаноовият *in vitro* и хлороформния *in vivo* екстракт потискат екстрацеуларната форма на HSV-1 над 90% -  $\Delta\log$  4 и  $\Delta\log$  1,5 съответно.

4. Todorov, D., M. Dimitrova, K. Shishkova, J. Yordanova, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov. 2013. Comparative anti-herpes effects of the chloroform *in vitro* and *in vivo* extracts derived from *Lamium album* L. Bulg. J. Agricultural Sci., 19 (2): 190-193.

SJR=0.162

реферирана в SCOPUS

Цитирания – 2 (2 в списание с IF, 2 - SCOPUS, 2 - SJR)

*Lamium album* L. е ценно медицинско растение, притежаващо спазмолитична, противовъзпалителна, антибиотична и бактериостатична активност. В нашето изследване хлороформни екстракти, получени по соксклетна методика от *in vivo* и *in vitro* култивирани растения бяха проучени за антивирусна активност. Екстрактите потискат значимо репликацията на herpes simplex virus тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в клетъчна култура MDBK без видима цитотоксичност. Екстрактите показват силен антивирусен ефект. 50% инхибиторните концентрации (ИК<sub>50</sub>) на хлороформния *in vitro* екстракт (CS) са съответно - 552 mg/mL<sup>-1</sup> и 487 mg/mL<sup>-1</sup>. ИК<sub>50</sub> на хлороформния *in vivo* екстракт (CES) са съответно - 668 mg/mL<sup>-1</sup> и 780 mg/mL<sup>-1</sup>. При прилагане и на двата хлороформни екстракта в максимална нетоксична концентрация (МНК) вирусната репликация се потиска над 90%. Предвид получените данни може да се предположи, че екстрактите, изолирани от растения, които са събирани от природата, имат по-силен инхибиторен ефект в сравнение с лабораторно култивираните такива. Хлороформният *in vivo* екстракт (CES) показва силна вирусцидна активност. При приложението в МНК той инактивира екстрацеуларната форма на HSV-1 след 5 минути на контакт над 90% ( $\Delta\log$  1,5).

5. Moyankova, D., A. Hinkov, D. Moyankova, S. Shishkov, D. Djilianov. 2014. Inhibitory effect of extracts from *Haberlea rhodopensis* Friv. against Herpes simplex virus. Compt. Rend. l'Acad. Bulg. Sci., 67 (10): 1369-1376.

IF = 0.284, SJR=0.205

реферирана в SCOPUS

Цитирания – 1 (1 в списание с IF, 1 - SCOPUS, 1 - SJR)

*Haberlea rhodopensis* Friv. (Gesneriaceae) е рядък вид, ендемичен за Балканите. Тя принадлежи към т. нар. група на „възкръсващите“ растения, способна да издържи големи периоди на пълно изсушаване. Беше изследвана активността на тотален метанолов, етанолов и воден екстракти от свежи и въздушно изсушени листа на *H. Rhodopensis* Friv., както и неполярните и полярни фракции на метаноловия екстракт срещу вирус Herpes simplex тип1 и 2. Токсичността (максимална нетоксична концентрация и цитотоксична концентрация 50%) беше определена спрямо клетъчна линия MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) чрез колориметричен МТТ тест. Същият беше модифицирани и използван за скрининг на съединения за анти-HSV активност в MDBK клетки. Като най-активен беше определен тоталният метанолов екстракт от сухи листа (MeDry) – 61% протекция спрямо HSV-1 (F) и 60% протекция спрямо HSV-

2 (ВА). Тестът, изследващ въздействието на екстрактите върху извънклетъчните вириони, не показва промяна в титъра на третираният вирус спрямо контролния. Полярни и неполярни фракции на метаноловия екстракт от суха листата протектират клетките в по-ниска степен в сравнение с тоталния екстракт. Би могло да се предположи, че комплексът от всички съединения в тоталния метанолов екстракт от *H. rhodopensis* действат синергично срещу човешкия херпесен вирус. Изследваното растение може да се разглежда като източник на биологично активни молекули с антивирусно действие.

6. *Shishkova K., I. Tsekov, R. Popov, S. Shishkov, Z. Kalvatchev. 2014. PCR Systems for Detection of Novel Elusive Human Pathogens Torque Teno Viruses (TTVs) in Bulgaria. Compt. Rend. l'Acad. Bulg. Sci., 67 (8):1175-1186.*

*IF = 0.284, SJR=0.205  
реферирана в SCOPUS*

ТТ вирусът е новооткрит агент, който инфектира хора. Първоначално открити при пациент (с инициалите Т. Т.) с посттрансфузионен хепатит. От тогава до днес се открива както в здрави, така и в болни индивиди. Целта на нашата работа беше да се приложи ефективна ТТV PCR система за детекция на тези вируси, за да се анализира и докаже присъствието им в биологични проби сред пациенти с: хепатит, мозъчен тумор, респираторни заболявания, случаи с неустановена патология, бъбречна трансплантация и доброволни кръводарители в България. Най-чувствителните от PCR системите бяха използвани, като се доказва, че разпространението на ТТ вируси е най-слабо (6,17%) при доброволни кръводарители, 62,74% при пациенти с респираторни заболявания, 65,2 % при пациентите с хепатит, 62,96% при случаи с неустановена патология, 66,66% при пациенти с мозъчен тумор и 64,28% при пациенти с бъбречна трансплантация.

Това е първият доклад, показващ разпространението на ТТ вирусите в България.

7. *Todorov, D., A. Hinkov, K. Shishkova, S. Shishkov. 2014. Antiviral potential of Bulgarian medicinal plants. Phytochem. Rev., 13 (2): 525-538. DOI: 10.1007/s11101-014-9357-1.*

*IF = 2.894, SJR=0.923  
реферирана в SCOPUS, Web of Science  
Цитирания – 7 (5 в списание с IF, 5 - SCOPUS, 6 - SJR)*

Медицинските растения са широко използвани за третиране на голям набор от инфекциозни и неинфекциозни заболявания. Българската флора включва над 4300 растителни вида, над 500 от които са редки или ендемични за страната или Балканския регион. Целта на настоящата работа е да се обобщят изследванията на антивирусната активност на българските медицински растения от последните три десетилетия. Разгледана е също и активността на различни екстракти получени от лабораторно отглеждани растения. В статията е разгледан фитохимичния състав и неговото въздействие върху конкретни етапи от вирусния жизнен цикъл. Обзора обхваща семействата Amaryllidaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Onagraceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae and Rhodophyta. Специално внимание е обърнато и на вирусите като важни човешки патогени.

8. *Todorov, D., K. Shishkova, D. Dragolova, A. Hinkov, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov. 2015. Antiviral activity of medicinal plant *Nepeta nuda*. Biotechnol. Equipment, 29 (Suppl. 1): 39-S43. DOI:10.1080/13102818.2015.1047215.*

*IF =0.379, JR=0.173  
реферирана в SCOPUS, Web of Science*

**Цитирания – 3 (1 в списание с IF, 1 - SCOPUS, 1 - SJR)**

*Nepeta nuda* subsp. *nuda* L. е медицинско растение, известно с различните си лечебните си свойства. В публикацията са представени резултатите от експериментите, изследващи антивирусната активност на четири извлека, получени чрез екстракция с метанол и хлороформ на растения култивирани *in vivo* и *in vitro*. При определяне на токсичността беше използвана клетъчна линия Madin\_Darby bovine kidney (MDBK). Беше определена максимално поносимата концентрация (МТС) и цитотоксична концентрация (CC<sub>50</sub>) и на четирите екстракта. Беше изследвана активността на екстрактите спрямо репликацията на вирус Herpes simplex тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в клетъчна линия MDBK. Беше определена инхибиторна концентрация 50% (IC<sub>50</sub>) и селективният индекс (SI) на екстрактите срещу двата вирусни типа. Метаноловият екстракт, получен от нативното растение, показва най-висока активност. Стойностите за IC<sub>50</sub> за двата вирусни типа са близки - 320 mg/mL спрямо HSV-1 (SI=4,94) и 510 mg/mL спрямо HSV-2 (SI=3,1). Приложен в МТС екстрактът инхибира вирусната репликация с повече от 95% както при HSV-1, така и при HSV-2. Вирусоцидният ефект бе изследван чрез определяне на титъра на третираните извънклетъчните инфекциозни вириони. И четирите екстракта от *N. nuda* инактивират извънклетъчната форма на HSV-2. Най-силно инактивиращо действие показва хлороформният екстракт от нативното растение (повече от 99% вирусна инактивация). Екстрактите слабо повлияват навлизането на вируса в клетката гостоприемник като най-активен при този тест отново беше хлороформният екстракт (повече от 90%).

9. Todorov, D., D. Pavlova, A. Hinkov, K. Shishkova, D. Dragolova, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov. 2015. Effect of extracts derived from *Teucrium chamaedrys* L. on Herpes simplex virus type 2. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 68 (12): 1519-1526.

**IF = 0.233, SJR=0.205**  
**реферирана в SCOPUS**

*Teucrium chamaedrys* L. (Подъбиче) е широко разпространен вид от род *Teucrium* (Lamiaceae) намиращ се в дивата флора на България, както и в някои страни в централна и южна Европа. Това медицинско растение се използва традиционно в България и други балкански държави под формата на чай и някои медицински техники. В настоящето изследване хлороформни и метанолови екстракти, получени по соксклетна методика, както и метанолови екстракти, получени чрез термостатно сушене, са изследвани за антивирусна активност. Два от изследваните екстракти инхибират значимо репликацията на Herpes simplex virus тип 2 (HSV-2) в клетъчна линия MDBK без видима цитотоксичност. 50% ефективната концентрация (ЕК<sub>50</sub>) на хлороформния екстракт е 350 mg/ml. Вирусната репликация е потисната с над 82%, когато екстракта се прилага в максимална нетоксична концентрация (МНК). Метаноловият термостатен екстракт показва слаб антивирусен ефект (ЕК<sub>50</sub>=680 mg/ml). Екстрактите, приложени в МНК, инактивират екстрацеуларния вирус и въздействат върху вирусната адсорбция и навлизане на HSV-2. За първи път е наблюдавана антихерпесна активност на тотални екстракти от *Teucrium chamaedrys*.

10. Zahmanov, G., K. Alipieva, P. Denev, D. Todorov, A. Hinkov, S. Shishkov, S. Simova, M.I. Georgiev. 2015. Flavonoid glycosides profiling in dwarf elder fruits (*Sambucus ebulus* L.) and evaluation of their antioxidant and anti-herpes simplex activities. *Industrial Crops and Products*, 63: 58–64. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.10.053.

**IF = 3.449, SJR=1.049**  
**реферирана в SCOPUS**

**Цитирания – 5 (2 в списание с IF, 2 - SCOPUS, 3 - SJR)**

Тревистият бъз (*Sambucus ebulus* L.) е добре познато лечебно растение, използвано от векове в народната медицина на Балканския полуостров. За *S. ebulus* са установени противовъзпалителни, антинеопластични и антимикробни свойства, стимулиращ ефект при зарастването на рани, антиоксидантно и противоязвено действие. В публикацията е представен разработен от нас метод за изолиране на отделни съединения чрез използването на различни хроматографски техники, а определянето на химичната им структура ставаше чрез 1D и 2D ЯМР. Бяха определени пет флевоноидни гликозида: кверцетин-3-О-ламинарибозид [1], изорамнетин-3-Оламинарибозид [2], кверцетин-3-О-рутинозид [3], изорамнетин-3-О-рутинозид [4], изорамнетин-3-О-гликозид [5]. Съединения 1 и 2 са установени за първи път в рода *Sambucus*. Няколко тритерпена – урсолева, олеанолева и маслинова киселини – варираха при идентифицирането им с GC-MS анализ. Определената анти-Herpes simplex тип 1 вирусна активност и установената антиоксидантна такава (в ORACFL и HORACFL) показва, че плодовете на тревистия бъз могат да служат като мощен източник на ценни молекули за различни цели.

11. Ivanova, S., P. Genova-Kalou, S. Voleva, S. Angelova, B. Marinov, S. Shishkov. 2016. *Infectious Agents and Miscarriage in Bulgaria. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, 25 (1): 1-10.

**IF = 0.269**

Редица инфекциозни агенти са свързани със спонтанен аборт и други неблагоприятни последици от бременността, като раждане на мъртъв плод и преждевременно раждане. Целта на настоящото изследване е да се определи влиянието и разпространението на вирусни агенти (парвовирус В19, рubeола, CMV и аденовируси) и *Chlamydia trachomatis* в етиологията на спонтанен аборт през първия и втория триместър на бременността. Общо 62 серумни проби от жени с аборт (n = 32) и контролна група от здрави жени (n = 30) за периода януари 2015 - юни 2016 г. бяха тествани чрез ELISA (детекция на специфични IgM/IgG антитела) и PCR методи (доказване на специфичен геномен регион). Възможната роля на В19V, Ch. trachomatis и аденовируси за спонтанен аборт са открити при 6/32 (18,75%) чрез ELISA и при 7/32 (21,87%) чрез PCR методи. Серопревалентността на протективни IgG антитела в най-голямо количество са доказани срещу рubeола 25/32 (78,12%), а в най-малко количество - срещу аденовируси (1/32, 6,25%). Всички тествани здрави жени в контролната група имат отрицателен резултат за остра инфекция за петте изпитани инфекциозни агента. Детайлното проучване на тези, целящо обогатяването на диагностичната палитра на тези инфекциозни патогени, е необходимо за разбирането на точните механизми, които са в основата на спонтанните аборти причинени от тези патогени. Това може да доведе до ефективно лечение и превенция.

12. Voleva, S., A. Pavlova, P. Genova-Kalu, V. Manolov, B. Marinov, St. Shishkov. 2017. *Infectious agents during prignancy – preliminary study. Probl. Inf. Parasit. Dis.*, 45 (2): 90-98.

**SJR=0.114**

Целта е да се определи честотата на инфекциозни заболявания причинени от инфекциозни агенти по време на бременност. Материал и методи: В настоящото изследване са включени 38 серумни проби от жени с патологична бременност. Пробите са събрани в първата половина на 2017 година. Приложени са следните методи: серологични – индиректен ензимен имунометод (EIA) – тест за детекция на

специфични IgM антитела за морбили, рubeола, парвовирус В19, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia trachomatis* и молекулярни методи – екстракция и детекция на инфекциозна нуклеинова киселина чрез PCR метод последван от визуализация на продуктите в 2% агарозен гел. Резултати: През първата половина на 2017 година бяха изследвани общо 38 серумни проби от жени с патологична бременност чрез ензим-свързан имуносорбентен анализ и молекулярни методи. Специфично реагиращи В19- IgM антитела бяха открити в 3/38 (7.89%) от пациентите. Позитивни IgM резултати за *Chlamydia trachomatis* и *Coxiella burnetii* бяха регистрирани в 3/38 (7.89%) и 2/38 (5.26%) съответно. Серопревалентността на специфични В19-IgG антитела в изследваната група бе изчислена като 55.26%. Позитивни IgG резултати за *Chlamydia trachomatis* и съответно за *Coxiella burnetii* бяха установени в 9/38 (23.68%) и 2/38 (5/26%) от случаите. Всички изследвани проби бяха негативни за акутни инфекции от морбили и рubeола и имаха протективен имунитет. Заключение: Комбинираните лабораторни методи за детекция на остри инфекции (откриване на IgM /IgG антитела и нуклеинови киселини) са от голямо значение за поставянето на коректни диагнози и за мониторинга на случаите на патологична бременност. Сред изследваните случаи не доминират акутни инфекции причинени от вирус В19, *Chlamydia trachomatis* и *Coxiella burnetii*, а акутни инфекции от морбили и рubeола не бяха регистрирани.

13. Chayrov R., E. Stylos, M. Chatziathanasiadou, K. Chuchkov, A. Tencheva, A. Kostagianni, T. Milkova, A. Angelova, A. Galabov, S. Shishkov, D. Todorov, A. Tzakos, I. Stankova. 2018. Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation. *Amino Acids*. DOI: 10.1007/s00726-018-2590-y.

IF<sub>2017</sub> = 3.173, SJR<sub>2017</sub> = 1.135  
реферирана в SCOPUS

Разработката на прекурсори на базата на жлъчни киселини е успешна стратегия за подобряване на фармацевтичния профил на лекарства, чрез използване на транспортерите на жлъчната киселина. Група от 3 прекурсора - естери на противохерпесното лекарство Ацикловир (АЦВ) с жлъчните киселини – холиева, хенодезоксихолиева и дезоксихолиева бяха синтезирани и изследвани заедно с валацикловир за тяхната *in vitro* активност спрямо Herpes simplex virus тип 1 и тип 2 (HSV-1, HSV-2). *In vitro* антивирусната активност на прекурсорите беше изследвана и срещу Епщайн-Бар вирус (EBV). За установяване на биологичния профил на ацикловирните прекурсори бяха изследвани за стабилност в плазма, използвайки HPLC, съчетана с тандемна масова спектрометрия, *in vitro* цитотоксичност и инхибиторни експерименти. Постановките за определяне на антивирусната активност демонстрират по-добра антивирусна активност проявена от АЦВ-холат в сравнение с чистата форма на АЦВ срещу HSV-1 и осемкратно повишаване на активността спрямо HSV-2. АЦВ-хенодезоксихолат проявява шесткратно повишаване на антивирусната активност спрямо HSV-2 в сравнение с АЦВ. По отношение на EBV, най-висока активност проявява АЦВ-хенодезоксихолата. Най-висока стабилност в човешка плазма се проявява от АЦВ-дезоксихолат в сравнение с другите два прекурсора. Тези резултати показват, че закачането на жлъчни киселини към структурата на АЦВ може да доведе до нови прекурсори с повишена антивирусна активност.

14. Voleva, S, V. Manolov, S. Angelova, V. Vasilev, Z. Gramatikova, I. Bogov, B. Marinov, S. Shishkov. 2018. Parvovirus B19 changes iron homeostasis during pathological pregnancy. *Clin. Pract.*, 15 (1): 481-487.

*SJR*<sub>2017</sub>=0.189

Цел: Вирусните инфекции по време на бременност са една от основните причини за тежките усложнения и смъртност при майката и плода. Инфекциите са свързани със значителни промени в хомеостазата на желязото. Пост-инфекциозният анемичен синдром се характеризира с ниско серумно желязо и повишен хепцидин, който акумулира желязо в ендотелната макрофагна система. Изследването има за цел да установи участието на парвовирус В19 в развитието на анемичен синдром по време на патологична бременност. Методи: Бяха изследвани 52 бременни жени с анемия, диагностицирани и хоспитализирани в Университетска акушеро - гинекологична болница "Майчин дом". Проведени са серологични (индиректни ензим-свързани имуносорбентни тестове (ELISA)) тестове и молекулярен (В19V-полимерна верижна реакция (PCR)) тест. При анемични бременни жени се оценяват параметрите на хомеостазата на желязото с методите CLIA, ELISA и Ferrozine. За статистическа оценка на резултатите изследователите използваха SPSS 13.0 (IBM). Корелациите и значимостта бяха оценени от насрещен теста на Student и от Pearson's correlation. Резултати: 8/52 (15,4%) от пациентите са показали наличие на В19V-IgM антитела. В19-IgG антитела са открити при 21/52 (40,4%) жени. Положителен PCR сигнал беше определен при всички пациенти с положителен В19V-IgM и 1 пациент с анемия и положителен резултат за В19V-IgG. При две бременни и позитивни жени за остра вирусна В19V инфекция анемията е класифицирана като дефицит на желязо, основана на ниска серумна концентрация на хепцидин  $2,19 \pm 0,5 \mu\text{g/l}$  в сравнение с  $20,4 \pm 2,9 \mu\text{g/l}$  бременни жени без В19V инфекция ( $P < 0,001$ ). При други остри В19V инфектирани жени, ние открихме статистически повишени серумни концентрации на хепцидин ( $61,9 \pm 6,2 \mu\text{g/l}$ ),  $P < 0,001$ . Заключение: Поради трансплацентарния път на предаване на парвовирус В19 инфекция в комбинация с афинитета на В19V към хемопоеични клетъчни системи, количественото определяне на серумни нива на хепцидин би допринесло за етиологично изясняване на анемията и предотвратяване на неадекватна желязна добавка при бременни жени.

15. Angelova, P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, D. Todorov, K. Shishkova, D. Dragolova, S. Shishkov, V. Kapchina-Toteva. 2018. *Antiherpes virus activity of extracts from Artemisia chamaemelifolia Vill. Compt. Rend. l'Acad. Bulg. Sci., (in press).*

*IF*<sub>2017</sub> = 0.251; *SJR*<sub>2017</sub> = 0.21

Human alphaherpesvirus (HHV) тип 2 е инфекциозен агент причиняващ генитален херпес. В публикацията са представени резултатите от изследването на ефекта на воден и хлороформен соксклет екстракти, получени от надземните части на растението *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (Asteraceae), спрямо репликацията на HHV тип 2 щам ВА (чувствителен към Acyclovir) и щам DD (резистентен на Acyclovir). При антивирусните тестове с водния екстракт се постига ~ 70% протекция на клетъчния монослой (и за двата използвани щам) съгласно модифицираният МТТ тест и се инхибира производството на инфекциозно вирусно потомство ~ 80% за щам ВА и ~ 70% за щам DD. Ефектът е дозозависим. Водният екстракт проявява слаба вирусцидна активност приложен в максимална нетоксична концентрация. Хлороформеният соксклет екстракт не повлиява репликацията на двата използвани щам, както и инфекциозността на извънклетъчните вириони.

\*Постерен доклад, публикуван в реферирано и индексирано издание

**II. Публикации в списания/сборници, които не са реферирани в Web of Science, SCOPUS или в списания с IF и SJR-фактор:**

*II. А. Публикации в списания/сборници, които не са реферирани, но цитирани в списания реферирани в Web of Science, SCOPUS или в списания с IF и SJR-фактор:*

16. Stankova, I., T. Dzimbova, **S. Shishkov**, D. Todorov, A. Galabov. 2011. *Esters of acyclovir with peptidomimetics - synthesis and antiviral activity. Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Sci. Conference "Mathematics and natural science" June, 8-11, 2011, Blagoevgrad, Bulgaria, 1: 227 - 231.*

*Цитирания – 1 (1 в списания с IF, 1 - SJR)*

*(Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59: 2011, IF: 1.592)*

Бяха конструирани и изследвани за антивирусна активност *in vitro* срещу herpes simplex virus тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) естери на противохерпесното лекарство аикловир с пептидомиметици. Естерите са синтезирани от аминокиселините валин, глицин, аланин и левкин съдържащи тиазолов пръстен и ацикловир. N-етил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид хидрохлорид (EDC) послужи като сдвояващ реагент при синтезата. Вос-аланин-тиазол-4-yl-ацикловир показва средна активност срещу HSV-2. Останалите естери бяха значително по-слабо активни.

17. Denkova, R., H. Strinska, Z. Denkova, G. Dobrev, D. Todorov, K. Mladenova, **S. Shishkov**. 2014. *Study on the adhesion of Lactobacillus plantarum strains with probiotic properties to MDCK. J. Food and Environment Safety, 13 (3): 214-217.*

*Цитирания – 1 (1 в списания с IF, 1 - SJR)*

*(Food Science and Technology: 2018, IF<sub>2017</sub>: 2.329)*

Едно от изискванията за пробиотичните щамове е да адхезират по епителни клетки или клетъчни култури. Наличието на S-слойни протеини при трите щамове с пробиотични свойства на *Lactobacillus plantarum* беше проучено, както и тяхната способност да адхезират към епителен монослоен модел от неракова клетъчна линия MDCK. При трите щамове липсват S-слойни протеини, но *Lactobacillus plantarum* X2 и *Lactobacillus plantarum* LBRZ12 адхезират към клетъчна линия MDCK, докато *Lactobacillus plantarum* F3, не адхезира. Заедно с другите им пробиотични свойства това ги прави подходящи за включване в пробиотични препарати и храни.

*II. Б. Публикации в списания, които не са реферирани в Web of Science, SCOPUS или в списания с IF и SJR-фактор, и без цитиране в такива:*

18. Кълвачев, З., К. Шишкова, И. Цеков, Р. Павлов, **С. Шишков**. 2012. *ТТ вирусите (сем. Anelloviridae): широко разпространени сред човешката популация, но все още с неизяснена патогенност. Военна медицина, 3-4: 25-30.*

Новото вирусно семейство Anelloviridae обединява няколко рода необвити вируса с циркулярен едноверижен ДНК-ов геном. Три от тях са означени като Torque Teno Virus (род Alphatorquetenovirus), Torque Teno-like Mini Virus (род Betatorquetenovirus), Torque Teno-like Midi Virus (род Gammatorquetenovirus), инфектират хора и се обсъждат като възможни патогени при различни заболявания. ТТ вирусите могат да бъдат открити в почти всички изследвани органа и течности но за сега остава неясен въпроса за реалния им патогенен потенциал и връзката им с различни клинично проявени заболявания. Настоящият материал предлага и обсъжда актуална информация за ТТ вирусите, която е от интерес както за вирусолози, така и за клиницисти от различни специалности.

19. Denkova, R., H. Strinska, Z. Denkova, G. Dobrev, D. Todorov, K. Mladenova, **S. Shishkov**. 2014. *Study of the adhesion of Lactobacillus acidophilus strains with probiotic properties to MDCK. Научни Трудове на Русенския Университет, 53 (10.2): 22-26.*

Едно от изискванията за пробиотичните щамове е да адхезират по епителни клетки или клетъчни култури. Наличието на S-слоини протеини при трите щамове с пробиотични свойства на *Lactobacillus acidophilus* беше проучено, както и тяхната способност да адхезират към епителен монослоен модел от неракова клетъчна линия MDCK. Трите щамове - *Lactobacillus acidophilus* A2, *Lactobacillus acidophilus* Ac и *Lactobacillus acidophilus* Z10 притежават S-слоини протеини и адхезират към клетъчна линия MDCK. Заедно с другите им пробиотични свойства това ги прави подходящи за включване в пробиотични препарати и храни.

20. Todorov, D., A. Hinkov, M. Dimitrova, K. Shishkova, D. Dragolova, V. Kapchina-Toteva, S. Shishkov. 2015. Anti-herpes effects of *in vitro* and *in vivo* extracts derived from *Lamium album* L. *Annuaire de l'Universite' de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie*, 100 (4): 177-183.

Родът *Lamium* (*Lamiaceae*) се състои от около 40 вида. *Lamium album* L. притежава противовъзпалителна, кръвоспираща и антисептична активност и е широко използван в различни терапии. В нашето *in vitro* изследване, за антивирусна активност бяха изследвани водни екстракти получени чрез лиофилизация и етанолови екстракти получени чрез термостатна екстракция от *in vivo* и *in vitro* култивирани растения. Водните екстракти инхибираха репликацията на Herpes simplex virus тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) в клетъчна линия MDBK без видима цитотоксичност. 50% ефективната концентрация (ЕК<sub>50</sub>) на водния *in vitro* екстракт е 1130 mg/ml спрямо HSV-1 и 990 mg/ml спрямо HSV-2. ЕК<sub>50</sub> на водния *in vivo* екстракт е 940 mg/ml и 1970 mg/ml съответно. Репликацията и на двата вируса се потиска над 95% при прилагане на *in vitro* екстракта в максимална нетоксична концентрация (МНК). Приложен в МНК екстрактът инактивира навлизането на HSV-1 над 60% ( $\Delta \log 0,5$ ). Етаноловите екстракти не проявиха антивирусен ефект.

21. Angelova, P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova, D. Todorov, S. Shishkov. 2016. Inhibition of Human Herpes Virus Type 2 Replication by water Extract from *Nepeta nuda* L. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 32 (2): 148-149.

Вирус Herpes simplex тип 2 (HSV-2) причинява рецидивиращи болезнени генитални язви. При новородената инфекция е свързана със висока заболяемост и смъртност. Продължителното лечение с най-често с нуклеозидни аналози води до селекция на резистентни вирусни щамове. Веществата с природен произход притежават голям лечебен потенциал. Растенията от род *Nepeta* се използват широко в народната медицина поради техните антиспазматични, отхрачващи, диуретични, антисептични, противокашлични, антиастматични и противовъзпалителни свойства. Изследвахме антивирусната активност на воден екстракт, получен от нативно култивираното растение (*in vivo*) *Nepeta nuda* L. Беше определена максималната нетоксична концентрация (MNC) – 4 мг/мл и цитотоксична концентрация 50% (CC<sub>50</sub>) – 8 мг/мл. Екстрактът инхибира значително репликацията на HSV-2 – инхибиращата концентрация 50% е 0.75 мг/мл. Продукцията на инфекциозното вирусно потомство се потиска до 98%.

22. Hinkov, A., H. Valchovski, S. Shishkov, K. Nedyalkova, R. Donkova. 2016. Investigation of the Antiviral and Antibacterial Potential of Coelomic Fluid from Some Earthworm Species (*Oligochaeta: Lumbricidae*). *Acta Microbiologica Bulgarica*, 32 (3): 39-44.

Влиянието на целомната течност от четири вида дъждовни червеи: *Aporrectodea rosea*, *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris* и *Octolasion lacteum*, е изследвано върху някои

Грамотрицателни бактерии: *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas luteola*, както и спрямо Herpes simplex virus тип 2 (генитален херпес). Получените резултати показват, че само *Eisenia fetida* има изразен антибактериален ефект върху изследваните микроорганизми като ефектът е най-силен спрямо *Aeromonas hydrophila*. Метаболитните компоненти на целомната течност имат силна цитолитична активност при въздействие на използваната от нас клетъчна линия, но не повлияват репликацията на човешкия херпесен вирус тип 2.

23. Волева, С., С. Иванова, В. Манолов, Б. Маринов, С. Ангелова, В. Василев, С. Шишков. 2017. Парвовирусна В19 инфекция, асоциирана с анемичен синдром, при пациентки с рискова бременност. *Медицински преглед*, 53 (5): 5-10.

Вирусните инфекции по време на бременност са една от основните причини за тежки усложнения при майката и плода. Проучването на ролята им в хода на бременността придобива все по-голямо значение с оглед опасността от възникване на епидемични взривове от съществуващи или новозараждащи се патогени. На лице са силни епидемиологични доказателства че бременните жени са изложени на по-висок риск от развитие на тежки заболявания и смърт, причинени от вирусни инфекции. Данните показват, че инфекцията с парвовирус В19 при жени с патологична и рискова бременност, освен с характерната симптоматика се асоциира и с развитието на тежък анемичен синдром. Възпалението, причинено от вирусни инфекции стимулира синтезата на цитокини (интерлевкин-6 TNF $\alpha$  и др.) които от своя страна водят до повишена продукция на хепсидин в черния дроб. Пептидът блокира желязото в редица клетки и тъкани (хепатоцити, макрофаги, РЕС, плацента, кардиомиоцити и др.). Повишеното ниво на хепсидин в серума при пациентки с вирусна инфекция, причинена от парвовирус В19, би довело до прекомерно отлагане на желязо в тъканите и невъзможност за неговото усвояване при еритропоезата. Количественото определяне на серумен хепсидин би предотвратило неправилното суплементиране с желязо при анемичен синдром в хода на бременността и инфекция от парвовирус В19.

### **III. Научни статии, публикувани в пълен текст в сборници от научни форуми:**

*III. А. В сборници от международни научни форуми:*

24. Костова, К., Д. Тодоров, М. Димитрова, Я. Неделкова, В. Капчина-Тотева, С. Шишков. 2010. Ефикасност на екстракти от медицинското растение *Leonurus cardiaca* в клетки инфектирани с херпес симплекс. *Proc. 20<sup>th</sup> Intern. Sci. Conf. "Stara Zagora -2010"*, June, 3-4, 2010, *Medical Biology Studies*, 3: 50-54.

Четири хлороформни и два метанолови екстракта, получени от ин витро размножени и естествени медицински растение *Leonurus cardiaca* (L) са изследвани за активност срещу херпес симплекс тип 2 (HSV-2) в клетъчна линия MDBK. Двата хлороформни екстракта от местни растения ChS и ChT имат най-мощната анти-HSV активност. 50% ефективни дози (IC50) са идентични - 80 mg/ml. Селективният индекс (SI) е съответно 6,25 mg/ml и 1,25 mg/ml.. Инхибиторните ефекти на другите екстракти са сходни или леки.

25. Abdulkadir M. Abudalleh, K. B. Simeonov, S. A. Shishkov, R. I. Alexandrova, G. Marinescu, D-C. Culita, L. Patron. 2012. *Investigations on cytotoxic and antiviral activities of a newly synthesized Zinc/Silver compound. Proceedings 6<sup>th</sup> Symposium with International*

*Participation "New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials", 8-9 November 2012, Timisoara, Romania, 25-28.*

Целта на проучването ни бе да се определят ефектите на новосинтезирания комплекс цинк/сребро наименувано като Zn-ампу-Ag ( $1\infty(\text{LiZn}_2(\text{u}_3\text{-OH})_{12}(\text{H}_2\text{O})(\text{H-Ag}(\text{CN})_2)](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3\text{THF} \cdot 0.5\text{MсOH}$ , където H2L1 е двукомпонентна шифова база като лиганд, получена при кондензация на 2,6-диформил- p-крезол с 2-аминометил-пиридин) върху преживяемостта пролиферацията говежди бъбречни клетки MDBK и репликацията на Говежди херпесен вирус тип 4 (BHV-4), щамове Movar 33/63 и DN599. Изследванията са проведени чрез МТТ тест и метода на Рийд и Менч. Преживяемостта на клетките MDBK за 144 часа в присъствието на изследваното вещество, приложено в 1.6; 3.1; 6.3; 12.5; 25.0 и 50.0 мкг/мл беше над > 92 % ( $p > 0.05$ ). При концентрации 25.0 и 50.0 мкг/мл t Zn-ампу-Ag did не понижава титъра на BHV-4.

26. *Abdulkadir A., P. Mitrenga, T. Zhivkova, L. Dyakova, S. Shishkov, R. Alexandrova. 2013. Effects of ammonium vanadate on viability and proliferation of cultured animal cells. Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Sci. Conference Research people and tasks on multidisciplinary sciences, 12-16 June, Lozenec, Bulgaria, 2: 105-107.*

Целта на настоящето изследване е да се определи ефекта на амониевия ванадат ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) върху жизнеността и пролиферативната способност на животински клетки. За нашите изследвания като модални системи бяха използвани MDBK клетъчна линия (говежди бъбрек) и BALB/c 3Т3 (миши ембрионални фибробласти). Бяха приложени МТТ тест, цитотоксичен тест чрез използване на неутрално червено, двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Резултатите показват, че приложен в концентрация 0,1 – 20  $\mu\text{g/ml}$  за 24 ч., 48 ч. и 72 ч. амониевият ванадат намалява жизнеността и пролиферативната активност на третираните миши фибробласти, докато клетките от другата клетъчна линия (говежди бъбрек) са резистентни в по-голяма степен.

#### **IV. Научни публикации в книги:**

27. *Alexandrova. R., A. Aludalleh, T. Zhivkova, L. Dyakova, S. Shishkov, M. Alexandrov, G. Marinesko, D. Culita, L. Patron. 2014. Cytotoxic effect of Zn/Ag complex on cultured non-tumor cells. In: Dushovski, C., J. Radenkova-Saeva, (eds.). "Toxicological problems", Military Publishing House Ltd., Sofia, Bulgaria, 32: 248-286.*

При предварителните ни изследвания бе установено, че комплексът цинк/сребро (Zn-Ампу-Ag) проявява значителен цитотоксичен и цитопатичен ефективърху човешки и животински туморни клетки. Цел на настоящото изследване бе определянето на влиянието на съединението върху преживяемостта и пролиферацията на нетуморни клетки. Следващите перманентни клетъчни линии бяха използвани като моделни системи в експериментите: Lер-3 (3-месечен човешки ембрион), MDBK (говежди бъбрек) и BALBc 3Т3 (миши фибробласти). Изследванията са проведени чрез методи клетъчни мишени и механизми на действие като МТТ тест, оцветяване с неутрално червено (NR), кристал виолет (CVI), двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид(АО/PI). Резултатите, получени при прилагане в концентрационни граници от 0,5 до 100 мкг/мл за 72 часа показват значително понижаване на преживяемостта и пролиферацията на третираните клетки.