

**Резюмета на публикациите на
д-р Велизар Стефанов Шиваров, представени за участие в конкурс за
академична длъжност „Доцент”**

(област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт по професионално
направление 7.1. Медицина и научна специалност „Хематология и преливане на
кръв“/ДВ бр. 37/26.04.2024)

I. Журнални статии в международни списания (Броят на независимите цитирания е според справката на МБ на МУ-Плевен от 21.05.2024)

- 1. Ivanova M, Shivarov V. HLA genotyping meets response to immune checkpoint inhibitors prediction: A story just started. Int J Immunogenet. 2021 Apr;48(2):193-200.**

Прилагането на блокадата на имунните контролни пунктове като терапевтичен вариант в съвременната онкология е едно от значимите имунологични постижения през последния век. Постоянно натрупването на доказателства предполага, че отговорът към инхибитрите на имунните контролни пунктове не е универсален. Следователно е от решаващо значение да се определят предиктивни маркери за отговор, резистентност и неблагоприятни ефекти от терапията с инхибиторите на имунните контролни пунктове. Последните широкомащабни анализи на данни от ракови геноми разкриха ключовата роля на молекулите HLA клас I и клас II в имунната редакция при рак и изглежда, че HLA разнообразието може да предскаже отговор към терапията с инхибиторите на имунните контролни пунктове. В тази статия обобщаваме най-новите данни за ролята на HLA вариациите на зародишната линия като маркер за отговор към чекпойнт-инхибитори.

Импакт фактор: 2.385; Цитирания: 8

Статията е включена в материалите за защита на дисертационен труд през 2023 г.

-
- 2. Ivanova M, Tsvetkova G, Lukanov T, Stoimenov A, Hadjiev E, Shivarov V. Probable HLA-mediated immunoediting of JAK2 V617F-driven oncogenesis. Exp Hematol. 2020 Dec;92:75-88.e10.**

Установено е, че HLA клас I (HLA-I) генотипът влияе върху развитието на рака чрез представянето на неопитопи. Нашите разбирания за неговия ефект върху развитието на миелопролиферативни неоплазии (МПН) остава ограничено. Поставихме си за цел да изясним предполагаемата протективна роля на HLA-I алелите в развитието на JAK2 V617F+ МПН, използвайки популационно генетичен подход. Вариабилността на HLA-I генотипа няма ефект върху наличието на мутация JAK2 V617F. Установихме обаче, че три алела са в обратна

корелация с наличието на JAK2 V617F мутация: HLA-A*02:01 ($p = 0.036$), HLA-B*35:01 ($p = 0.017$) и HLA-C*15:02 ($p = 0.033$). Алелът HLA-B*35:01 може да свързва с 9-мерен пептид, получен от мутантния протеин JAK2 V617F. Анализът на генната експресия разкрива по-ниска експресия на HLA-A и -B в CD34+ клетки от пациенти с МПН в сравнение с нормалните CD34+ клетки, като експресията се модулира при лечение с руксолитиниб и интерферон- α . В обобщение, ние предоставяме солидни доказателства, че специфични молекули HLA-I ограничават JAK2 V617F-зависимата онкогенезата. JAK2 V617F+ стволови клетки избягват имунния надзор чрез понижаване на експресията на HLA-I. Следователно, наличието на специфични HLA-I алели може да бъде предиктивен маркер за отговор към някои видове имунотерапии, регулиращи експресията на HLA-I. И накрая, нашите данни открития имат приложение и при разработването на мутационни ваксини за МПН.

Импакт фактор: 3.084; Независими цитирания: 4

Статията е включена в материалите за защита на дисертационен труд през 2023 г.

3. Tanev D, Peteva P, Fairbanks L, Marinaki A, Ivanova M, Alaikov T, Shivarov V. Beware of the Uric Acid: Severe Azathioprine Myelosuppression in a Patient With Juvenile Idiopathic Arthritis and Hereditary Xanthinuria. J Clin Rheumatol. 2020 Mar;26(2):e49-e52.

В тази статия описваме първият случай на наследствена ксантинурия в България. Освен това това е един от по-малко от 10 случая на тип 2 наследствена ксантинурия, описани в света. Описаният случай показва, че това заболяване може да представлява фармакогенетичен дефект обуславящ токсичност при лечение с тиопуринови производни (напр. азатиоприн). В този смисъл е препоръчително включването на наследствената ксантинурия като абсолютно противопоказание за лечение с азатиоприн и 6-меркаптопурин.

Импакт фактор: 3.517; Независими цитирания: 2

4. Sozer S, Aptullahoglu E, Shivarov V, Yavuz AS. In situ detection of JAK2V617F within viable hematopoietic cells using gold nanoparticle technology. Int J Lab Hematol. 2019 Aug;41(4):e95-e98.

В тази статия описахме нов метод за откриване of JAK2 V617F мутация в живи клетки, използвайки съвременна нова нанотехнология, наречена "нанопламъци". Тя се основава на златни наночастици с диаметър 13 nm, натоварени със сонди за две различни таргетни мРНК за дивия тип JAK2 и за JAK2 V617F мутация едновременно вътре в жива клетка. Анализът се извършва чрез флоуцитометрия по излъчената флуоресцентна светлина при наличие на съответната таргетна мРНК. Това е първата демонстрация на използването на тази технология за детекция на точкови мутации.

Импакт фактор: 2.141; Независими цитирания: 2

5. Alkhezraji A, Elgama! M, Hui Ang S, Shivarov V, All cancer hallmarks lead to diversity, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2019 Jan; 1 (12):132-157.

Концепцията за отличителните характеристики на рака се счита за основно обобщение на принципите на раковата биология. Много усъвършенствания на тази концепция бяха предложени въз основа на новите открития относно молекулярните и клетъчните характеристики на раковите клетки, изяснени след 2000 г. Освен това, през последното десетилетие бързото развитие на високопроизводителните omics технологии даде възможност за безпрецедентно наблюдение за еволюционната динамика на раковите клетъчни популации. Тук ние предложихме разширяване на концепцията за отличителните характеристики на рака въз основа на последните усъвършенствания на знанията на еволюционните механизми, залегнали в основата на иницирането и преогесирането на раковия растеж.

Импакт фактор: 0.166; Независими цитирания: 3

Статията е включена в материалите за защита на дисертационен труд през 2023 г.

6. Alaikov T, Angelova S, Hristova J, Ivanova M, Shivarov V. A case of very rare co-occurrence of POEMS syndrome and JAK2 V617F positive MPN. *J Hematopathol* (2018) 11: 23.

В тази сатия описваме уникален случай на POEMS синдром при възрастна пациентка с постполицитемична миелофиброза с голяма давност. Случаят доказва, че двете заболявания не са взаимноизключващи се. Освен това съвременните диагностични критерии за POEMS синдром не са напълно приложими при наличието на подлежаща миелопролиферативна неоплазия. В този смисъл е уместно изследването на JAK2 V617F мутация при всички пациенти с POEMS синдром, представящи се клинично с еритроцитоза или тромбоцитоза.

Импакт фактор: 0.410; Независими цитирания: 0

Резултати, описани в тази статия са представяни на Salzburg Medical Seminar, за което получих сертификат за отлично представяне (2018)

7. Shivarov V, Ivanova M. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma in USA between 2000 and 2014: an updated analysis based on the SEER data. *Br J Haematol*. 2018 Sep;182(5):727-730.

Нодуларният Лимфом на Ходжкин с лимфоцитно предоминиране (NLPHL) е рядък подтип на Ходжкиновия лимфом, който се отличава с експресия на CD20. Поради това и сравнително по-малко агресивния ход на заболяването през последните 2 десетилетия се правят опити за включване на имунотерапията с анти-CD20 като част от поведението при този вид лимфом. Не са правени рандомизирани проучвания в тази насока и затова всякакви заключения почиват на малки ретроспективни анализи и данни от ракови регистри. По тази причина ние анализирахме

клиничните резултати при пациенти с NLRPHL, включен в един от Американските ракови регистри (SEER). Нашият анализ не показва свързана с пола на пациентите разлика в общата преживяемост. Освен това е малко вероятно частичното въвеждане на ритуксимаб при NLRPHL да е довело до подобрене на общата преживяемост. За да се наблюдава такава би било необходимо по-продължително приложение на ритуксимаб като първа линия терапия при всички стадии на заболяването.

Импакт фактор: 5.206; Независими цитирания: 15

8. Shivarov V, Gueorguieva R, Ivanova M, Stoimenov A. Incidence of second solid cancers in mastocytosis patients: a SEER database analysis. Leuk Lymphoma. 2018 Jun;59(6):1474-1477.

Мастоцитоза е термин, с които се описват група редки клонални заболявания, засягащи мастоцитния ред. До този момент нямаше системно проучване на риска от развитие на вторични солидни тумори при тези пациенти. За целта използвахме данни от Американския Раков регистър (SEER) след 2000 г. Анализиранияте данни не показаха статистически значим риск за вторични солидни тумори при тези пациенти. Не може обаче да се изключи статистически значимо повишен риск за някои редки видове рак като тумори на жлъчните пътища или тумори на щитовидната жлеза. Категоричен отговор на тази хипотеза предвид ниската честота на мастоцитозата може да се получи евентуално от лонгитудиналното събиране на данни от международните регистри на пациентите с мастоцитоза.

Импакт фактор: 2.674; Независими цитирания: 3

9. Pavlov I, Hadjiev E, Alaikov T, Spassova S, Stoimenov A, Naumova E, Shivarov V, Ivanova M. Calreticulin Mutations in Bulgarian MPN Patients. Pathol Oncol Res. 2018 Jan;24(1):171-174.

В тази статия правим пълен анализ на мутациите на гените JAK2, MPL и CALR при български пациенти с миелопролиферативни неоплазии без Филадельфийска хромозома. За детекцията на мутациите на CALR са използвани четири метода: high resolution melt (HRM) analysis, Sanger секвениране, секвениране на таргетни гени чрез семикондукторна платформа и пълно екзомно секвениране. A total of 78 patients with myeloid malignancies were included in the study. Това е едно от малкото съобщения за честотата на мутациите на CALR в страни от Югоизточна Европа. Честотата и разпределението на тези мутации в българската популация са идентични с тези за други държави предимно от Западна Европа. Освен това всички използвани методи дават идентични резултати.

Импакт фактор: 2.433; Независими цитирания: 3

10. Alaikov T, Ivanova M, Shivarov V. EPAS1 p.M535T mutation in a Bulgarian family with congenital erythrocytosis. Hematology. 2016 Dec;21(10):619-622.

Тази статия описва българско семейство с тип 4 фамилна еритроцитоза, т.е. с мутация в гена *EPAS1*, който кодира транскрипционния фактор HIF2 α . До този момент имаше общо 22 описани пациенти с този тип фамилна еритроцитоза, но едва двама (неродствени) с мутация p.M535T. Освен детайлното описание на клиничния ход на заболяването в три поколения от едно семейство тази статия е оригинална и с диагностичния си подход. Пробандът беше генотипизиран чрез пълно екзомно секвениране, което го прави първият докладван у нас подобен случай.

Импакт фактор: 1.244; Независими цитирания: 11

Резултати, описани в тази статия са представяни на Salzburg Medical Seminar, за което е получен сертификат за отлично представяне (2017)

11. Shivarov V, Dolnik A, Lang KM, Krönke J, Kuchenbauer F, Paschka P, Gaidzik VI, Döhner H, Schlenk RF, Döhner K, Bullinger L. MicroRNA expression-based outcome prediction in acute myeloid leukemia: novel insights through cross-platform integrative analyses. Haematologica. 2016 Nov;101(11):e454-e456.

В тази статия описваме разработването на нов базиран на експресия на микроРНК прогностичен модел при възрастни пациенти с остра миелоидна левкемия. Използвахме данни за експресия на микроРНК от микрочипове от 91 възрастни пациенти с *de novo* ОМЛ, включени в проучването на AMLSG AML HD98A („training“ група). Друга група от 177 пациенти с ОМЛ с профил на експресия на микроРНК (RNA-Seq) от проекта Cancer Genome Atlas (TCGA) беше използвана за „validation“ група. Избраният модел включваше 7 микроРНК (miR-100, miR-132, miR-185, miR-186, miR-302a, miR-330 и miR-422a). Както за „training“, така и за „validation“ групата дискретните скорове бяха значими прогностични фактори при унивариационните анализи. При анализа само на ОМЛ с нормална цитогенетика (CN-AML) дискретният скор беше значим фактор за лоша прогноза за „training“ групата и се оказа независим прогностичен фактор за частта от „validation“ групата по-млади пациенти с CN-AML. След това направихме анализ на мрежата от 7-те микроРНК и техните известни и предполагаеми таргетни РНК и открихме обогатяване на белтъци, свързващи нуклеиновите киселини. Като използвахме данните за ПГЕ от TCGA установихме 850 сонди, които бяха диференциално експресирани между пациентите с нисък и висок скор при ниво от $p < 0.01$. Анализът на генната онтология показва, че най-значимо свръхпредставеният път е „General transcription regulation“. Освен това при анализа на Gene Set Enrichment (GSEA) при подгрупата от CN-AML пациенти <61 години първите 7 по ранк генни профила бяха свързани с РНК метаболизма. Генният профил с най-висок ранг беше „РНК сплайсинг“. Анализът на диференциалната употреба на екзони (DEU) между пациентите с нисък и висок скор показва общо 7500 диференциално експресирани секвенции при ниво на значимост от под 0.05. И накрая, използвахме данни за ДНК метилиране от TCGA и открихме общо 1218 CpG позиции с диференциално метилиране между пациентите с нисък и висок скор.

Това проучване показва възможността за интегриране на данни за експресия на микроРНК от различни платформи (микрочипове и RNA-Seq данни) за създаване на прогностични скорове

при ОМЛ. Освен това интегралният анализ на омикс данните от подгрупите, дефинирани въз основа на скората от експресията на микроРНК, дава допълнителни доказателства за потенциалната връзка с биологичната същност на тези подгрупи и ролята на дерегулацията на РНК сплайсинга при патогенезата на ОМЛ.

Импакт фактор: 7.702; Независими цитирания: 6

Резултати, описани в тази статия са представяни на 20. Конгрес на ЕНА, за което е получен Travel Grant (2015)

12. Ivanova M, Shivarov V, Pavlov I, Lilakos K, Naumova E. Clinical Evaluation of a Novel Nine-Gene Panel for Ion Torrent PGM Sequencing of Myeloid Malignancies. Mol Diagn Ther. 2016 Feb;20(1):27-32.

В тази статия описваме разработването и първоначалното валидиране на нов панел за секвениране на всички кодиращи екзони на 9 гена, свързани с миелоидни неоплазии. Това е една от първите статии описващи такъв in-house панел и използваща втората по популярност платформа за секвениране от следващо поколение (NGS), Ion Torrent. Статията демонстрира полезността и приложимостта на този подход за молекулярно генетично профилиране на миелоидни неоплазии дори и в лаборатории с по-малки ресурси. Освен това за първи път в България са изследвани мутации на гените ASXL1, SETBP1, EZH2, CALR, RUNX1, SF3B1, U2AF1, TET2, SRSF2.

Импакт фактор: 1.909; Независими цитирания: 4

13. Shivarov V, Gueorguieva R, Ivanova M, Tiu RV. ASXL1 mutations define a subgroup of patients with acute myeloid leukemia with distinct gene expression profile and poor prognosis: a meta-analysis of 3311 adult patients with acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2015 Jun;56(6):1881-3.

Тази статия описва мета-анализ на прогностичната стойност на мутациите на гена ASXL1 при пациенти с остра миелоидна левкемия. Нашият мета-анализ доказва лошата прогноза, която се определя от наличието на мутации в този ген, както при пациенти под 60 годишна възраст, така и при пациенти над 60 годишна възраст. Освен това представяме и мета-анализ на диференциалната експресия на различни гени при пациенти с мутации на ASXL1, които показват засягане на пътищата, свързани със синтеза на пиримидини.

Импакт фактор: 3.093; Независими цитирания: 7

Резултати, описани в тази статия са представяни на 19. Конгрес на ЕНА, за което е получен Travel Grant (2014).

14. Shivarov V, Bullinger L. Expression profiling of leukemia patients: key lessons and future directions. Exp Hematol. 2014 Aug;42(8):651-60.

Тази статия обобщава основните постижения на използването на определянето на профилите на генна експресия при пациенти с остра миелоидна левкемия. В статията се обсъждат и основните предизвикателства и възможности пред използването на РНК секвенирането (RNA-Seq), както и на интегрирането на големи масиви данни от различни омикс технологии. Част от тези концепции са залегнали в реализирането на проучванията, описани в статия 11 (вж. по-горе).

Импакт фактор: 2.475; Независими цитирания: 37

15. Shivarov V. TRUE gene silencing for hematologic malignancies. Leuk Res. 2014 Jul;38(7):729.

В тази редакторска статия описвам значението на различните видове подходи за РНК интерференция в хематологията и по специално на един от тях – чрез използване на т. нар. РНК, използващи ендегенните РНКазы Z. Тази статия обяснява основните резултати от статията на Takahashi et al. от същия брой на списанието и дискутира ограничените на метода за in vivo приложения.

Импакт фактор: 2.351; Независими цитирания: 5

16. Shivarov V, Ivanova M, Naumova E. Rapid detection of DNMT3A R882 mutations in hematologic malignancies using a novel bead-based suspension assay with BNA(NC) probes. PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e99769.

Тази статия описва разработването и валидирането на нов микросферов, течностен, хибридационен метод за детекция на мутации на DNMT3A гена в кодон R882. Това са най-честите мутации на този ген и се откриват при голям брой случаи на миелоидни неоплазии – остра миелоидна левкемия, миелодиспластични синдроми и миелопролиферативни заболявания. Освен това за първи път демонстрирахме предимството на олигонуклеотидните сонди с т.нар. BNA-модифицирани нуклеотиди спрямо тези с LNA-модифицирани нуклеотиди. Методът е количествен и позволява детекция на мутациите с чувствителност от около 2.5%. Тази статия описва и първото изследване на такива мутации при български пациенти.

Импакт фактор: 3.234; Независими цитирания: 10

17. Shivarov V, Ivanova M, Tiu RV. Mutated calreticulin retains structurally disordered C terminus that cannot bind Ca(2+): some mechanistic and therapeutic implications. Blood Cancer J. 2014 Feb 21;4:e185.

Това е една от първите пет статии в света относно мутациите на CALR при миелопролиферативни неоплазии. Тя показва количествено разликата в електричните свойства на неоморфните мутантни белтъци и предлага хипотезата, че нарушените Ca²⁺ буферирани свойства на калретикулина могат да доведат до активиране на сигнални пътища, свързани предимно с активиране на мегакариоцитната пролиферация. Тези пътища представляват потенциална терапевтична мишена.

Импакт фактор: 3.467; Независими цитирания: 30

18. Shivarov V, Stoimenov A, Spassov B, Angelova S, Niagolov M, Ivanova M. Patient-specific microRNA expression profiles as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Hematology. 2014 Jan;19(1):18-21.

Тази статия описва нашите ограничени и първоначални опити върху определянето на профила на експресия на микроРНК при пациенти с остра миелоидна левкемия. Оригиналният принос на тази статия е в приложението на експресията на микроРНК като маркер за минимална резидулна болест. Поради малкия брой изследвани пациенти успяхме да демонстрираме само статистически тренд към значимост на повишената експресия на микроРНК след индукцията по отношение на общата преживяемост.

Импакт фактор: 1.253; Независими цитирания: 5

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

19. Shivarov V, Gueorguieva R, Stoimenov A, Tiu R. DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients. Leuk Res. 2013 Nov;37(11):1445-50.

Тази статия описва мета-анализ на прогностичната стойност на мутациите на гена на DNMT3A при пациенти с остра миелоидна левкемия. Тя се основава на анализа на девет проучвания с общо 4582 пациенти. Статията заключава, че тези мутации са независим прогностичен маркер, както по отношение на общата преживяемост, така и по отношение на преживяемостта без болест. Тя потвърждава, че въпреки че DNMT3A мутациите са често асоциирани с NPM1 и FLT3-ITD мутации, тяхната прогностична стойност не зависи от тях. Тези заключения бяха потвърдени по-късно и от други мета-анализи и независими проучвания.

Импакт фактор: 2.692; Независими цитирания: 72

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

20. Shivarov V, Ivanova M, Hadjiev E, Naumova E. Novel multiplex bead-based assay for detection of IDH1 and IDH2 mutations in myeloid malignancies. PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e76944.

Тази статия описва разработването и валидирането на нов микросферов, течностен, хибридационен метод за детекция на мутации на IDH1 и IDH2 гените при миелоидни неоплазии – остра миелоидна левкемия, миелодиспластични синдроми и миелопролиферативни заболявания. Методът е количествен и позволява детекция на мутациите с чувствителност от около 1-2.5%. Тази статия описва и първото изследване на такива мутации при български пациенти. Значението на тези мутации се определя от последните доказателства, че вероятно IDH2 мутиралите пациенти с ОМЛ вероятно са отделна молекулярна подгрупа. Освен това в момента се разработват нови инхибитори на мутантни IDH1/2 ензими.

Импакт фактор: 3.534; Независими цитирания: 1

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

21. Shivarov V, Dimitrova P, Vassilev T. Complex downstream effects of nuclear export inhibition in B-cell lymphomas: a possible role for activation-induced cytidine deaminase (AID). Haematologica. 2013 Sep;98(9):e1111-3.

Тази статия демонстрира, че проапоптичното действие на нов клас медикаменти – специфични инхибитори на нуклеарния експорт, при В-клетъчни лимфоми, вероятно зависи от експресията на ензима AID. Предложихме схематичен модел как тези инхибитори могат да нарушат транспорта на AID и да увеличат неговата генотоксична активност.

Импакт фактор: 5.868; Независими цитирания: 1

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

22. Shivarov V, Ivanova M, Yaneva S, Petkova N, Hadjiev E, Naumova E. Quantitative bead-based assay for detection of JAK2 exon 12 mutations. Leuk Lymphoma. 2013 Jun;54(6):1343-4.

Тази статия описва разработването и валидирането на нов микросферов, течностен, хибридационен метод за детекция на мутации за детекция на най-честите мутации на екзон 12 на JAK2 гена. Тези мутации се откриват в до 5% от случаите на полицитемия вера (като при тях липсва JAK2 p.V617F мутация) и по настоящем тяхното изследване е диагностичен критерий. По принцип откриването на тези мутации в рутинни условия е проблематично поради ниската чувствителност на директното секвениране и техния често субклонален характер. Нашият метод предлага решение на този проблем, тъй като позволява детекция на мутациите с чувствителност от около 1-2.5%. Тази статия описва и първото и единствено изследване на такива мутации при български пациенти.

Импакт фактор: 2.301; Независими цитирания: 6

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

23. Gu X, Shivarov V, Strout MP. The role of activation-induced cytidine deaminase in lymphomagenesis. *Curr Opin Hematol.* 2012 Jul;19(4):292-8.

Тази статия представя стегнато обобщение на известните факти за ролята на ензима активационно-индуцируема цитидиндеаминаза (AID) в патогенезата на В-клетъчните лимфоми. Отлично начално четиво за клиницисти-хематолози и специалисти с малък опит в областта на AID. Освен това статията дискутира част от нерешените проблеми относно AID и лимфомагенезата и представя коментар върху основните публикации по въпроса от последните години преди публикацията (2010-2011).

Импакт фактор: 4.111; Независими цитирания: 35

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

24. Angelova S, Jordanova M, Spassov B, Shivarov V, Simeonova M, Christov I, Angelova P, Alexandrova K, Stoimenov A, Nikolova V, Dimova I, Ganeva P, Tzvetkov N, Hadjiev E, Toshkov S. Amplification of c-MYC and MLL Genes as a Marker of Clonal Cell Progression in Patients with Myeloid Malignancy and Trisomy of Chromosomes 8 or 11. *Balkan J Med Genet.* 2011 Dec;14(2):17-24.

В тази статия се прави анализ на амплификацията на два онкогена MYC и MLL като маркери за клонална еволюция на пациенти с ОМЛ и МДС. Демонстрира се значението на индентификацията на тези криптични амплификации при пациенти с тризомия на 8 или 11 хромозома.

Импакт фактор: 0.255; Независими цитирания: 4

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

25. Angelova S, Zechev J, Stoimenov A, Spassov B, Romanova M, Shivarov V. A novel t(7;21)(q32;q22) translocation disrupting the RUNX1 gene in an adult patient with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011 Dec;52(12):2396-8.

Това е първото описание на нова транслокация t(7;21)(q32;q22) при пациент с остра миелоидна левкемия. С флуоресцентна *in situ* хибридизация доказахме, че един от партниращите гени е *RUNX1*. До момента тази транслокация не е докладвана при други пациенти. Окриването на подобни изключително редки мутации обаче може да позволи използването на специфични инхибитори за някой от фузионните партниращи си гени.

Импакт фактор: 2.580; Независими цитирания: 1

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

26. Dimitrova P, Vassilev T, Shivarov V. Inhibition or overactivation of AICDA to eliminate pathologic B cell clones? Comment on the article by Hsu et al. Arthritis Rheum. 2011 Oct;63(10):3174-5;

В тази статия демонстрирахме, че свръхактивирането на езнима AID in vitro и in vivo при човешки Бъркитов лимфом води до регресия на тумора. Тази статия представя доказателство за възможното използване на AID като терапевтична мишена. Неконвенционалният подход в случая предполага неговото активиране самостоятелно или в контекста на т.нар. синтетична леталност. Тези идеи са доразвити в статия номер 12 (вж. по-горе).

Импакт фактор: 7.866; Независими цитирания: 2

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

27. Shivarov V, Ivanova M, Hadjiev E, Naumova E. Rapid quantification of JAK2 V617F allele burden using a bead-based liquid assay with locked nucleic acid-modified oligonucleotide probes. Leuk Lymphoma. 2011 Oct;52(10):2023-6.

Това е първата от серия наши статии с разработване на микросферови, течностни мултиплексни методи за детекция на мутации, свързани с миелоидни неоплазии. Тук описваме разработването на този метод за детекция на JAK2 V617F мутация. За хибридизационни сонди използвахме т. нар. LNA-модифицирани олигонуклеотиди. Така се постига възможност за количествено определяне на товара на мутантния алел с чувствителност от 1%. Това е и първото количествено определяне на мутантния JAK2 V617F алел при български пациенти.

Импакт фактор: 2.580 Независими цитирания: 0

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

28. Angelova S, Spassova S, Toshkov S, Shivarov V. Chromosomal translocation t(9;22)(p24;q11) appears to be recurrently associated with myeloid malignancy with aggressive course. Leuk Lymphoma. 2011 Sep;52(9):1809-10.

Тази статия представя описание на едва четвъртия случай в света на транслокация t(9;22)(p24;q11) при пациент с миелопрлиферативен/миелодиспластичен оверлап синдром. Други автори доказаха, че тази транслокация води до формиране на нов фузионен белтък BCR-JAK2. Нашето предложение, че тази мутация е рекурентна при миелоидните неоплазии се оказа правилно, тъй като последваха повече от 10 други съобщения за пациенти с такава

транслокация и до опити за дефинирането на отделна нозологична единица. Тези пациенти биха могли да се повлияят от приложението на специфични JAK2 инхибитори.

Импакт фактор: 2.580; Независими цитирания: 6

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

29. Ivanova MI, Shivarov VS, Hadjiev EA, Naumova EJ. Novel multiplex bead-based assay with LNA-modified probes for detection of MPL exon 10 mutations. Leuk Res. 2011 Aug;35(8):1120-3.

В тази статия описваме разработването и валидирането на микросферов, течностен мултиплексен метод за детекция на мутации в кодон на W515 на човешкия MPL ген. И тук използвахме модификация на олигонуклеотидните сонди чрез LNA-модифицирани нуклеотиди. Методът позволява едновременното количествено определяне четири мутации и дивия тип с чувствителност от 1%. Тази статия е и първата съобщаваща изследването на такива мутации при пациенти с миелопротрофиеративни заболявания в България.

Импакт фактор: 2.923; Независими цитирания: 12

Статията е отличена с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г.

30. Shivarov V, Shinkura R, Doi T, Begum NA, Nagaoka H, Okazaki IM, Ito S, Nonaka T, Kinoshita K, Honjo T. Molecular mechanism for generation of antibody memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009 Mar 12;364(1517):569-75.

Тази статия описва постиженията на групата на проф. Тасуку Хонджо в разгадаването на молекулярните механизми, чрез които ензимът активационно-индуцируена цитидиндеаминаза (AID) предизвиква изотипно превключване и соматични хипермутации на имуноглобулиновите гени. В тази статия са обобщени данните на групата от периода 2006-2008 година като данните са интерпретирани в контекста на т.нар. модел на РНК редакция. Статията е добра насока за разбиране на сложността на молекулярните механизми на генерирането на имунологичната памет при гръбначните животни и човека.

Импакт фактор: 5.556; Независими цитирания: 22

Статията е включена в материалите за защита на дисертационен труд през 2011 г.

31. Shivarov V, Stoimenov A, Galabova I, Balatzenko G, Guenova M. Very early onset of an acute myeloid leukemia in an adult patient with B-cell lymphoblastic leukemia. Int J Lab Hematol. 2009 Feb;31(1):106-13.

Тази статия описва първият случай на много ранно развитие на остра миелоидна левкемия в хода на индукционно лечение за остра В-лимфобластна левкемия при млад мъж. Наличините фенотипни и молекулярни маркери към онзи момент напълно изключиха обща клоналност, което предполага наличието на „спящи“ миелоидни левкемични клетки, различни от изходния лимфобластен клон. В този смисъл статията представлява практическо доказателство за съществуването на спящи миелоидни левкемични клетки с голям пролиферативен потенциал.

Импакт фактор: 1.304; Независими цитирания: 6

32. Ivanova M, Ruiqing J, Matsushita M, Ogawa T, Kawai S, Ochiai N, Shivarov V, Maruya E, Saji H. MBL2 single nucleotide polymorphism diversity among four ethnic groups as revealed by a bead-based liquid array profiling. Hum Immunol. 2008 Dec;69(12):877-84.

Това е класическа имуногенетична статия, описваща разпределението на 6 единични нуклеотидни полиморфизма (SNPs) и съответните хаплотипове в гена MBL2, за които беше известно, че повлияват нивото на експресията му. Изследвани бяха четири популационни групи. Освен това беше разработен оригинален метод за едновременното изследване на тези полиморфизми чрез микросферовата платформа Luminex™. Открихме значителна вариабилност между популациите по отношение на разпределението на алелите и хаплотиповете, но сходно разпределение по отношение на функционалните особености на генотиповете. Това предполага селекция на функционално ниво и подчертава значимата роля на маноза-свързващия лектип (MBL) при вродения имунитет.

Импакт фактор: 3.061; Независими цитирания: 12

33. Shivarov V, Shinkura R, Honjo T. Dissociation of in vitro DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 14;105(41):15866-71.

Активационно-индуцируемата цитидин деаминаза (AID) е специфичен за В лимфоцитите ензим, който е от основно значение за трите основни процеса на вторични диверсификации на имуноглобулиновите гени, а именно изотипно превключване (ИП), соматични хипермутации (СХМ) и генна конверсия (ГК). Като член на фамилията на ензимите цитидиндеаминази, AID притежава цитидин (С) деаминазен мотив, който е абсолютно необходим за неговите физиологични функции.

Тази статия изследва валидността на т.нар. модел за ДНК деаминиране, който постулира, че ДНК деаминирането е абсолютно условие за ИП. За да изследваме това предварително условие на модела за ДНК деаминиране ние сравнихме относителните активности за деаминиране на евДНК и за ИП на различни мутантни миши AID белтъци. Следните мутанти H48A, L49A, R50A, N51A, K52A, G54A и S105G показаха ясна дисоциация между техните относителни активности за деаминиране на евДНК и ИП. Всички те относително по-висока активност за ИП, отколкото би могло да се очаква въз основа на по-ниската деаминационна активност върху евДНК. Най-впечатляващ беше мутантът N51 A, който

практически не показва никаква способност да деаминира евДНК, но имаше значително значително ниво на ИП. Прецизните анализи на този мутант показаха дозозависимост на неговата функция за ИП, но отсъствие на деаминационна активност независимо от използваното количество белтък. Нашите резултати показват, че моделът за ДНК деаминиране не е абсолютно валиден за що се отнася до процеса на ИП. Освен това аналогичен мутант на АРОВЕС1 (N57A) води до загуба на ДНК деаминираща активност, но запазва способност за РНК деаминиране. Данните от тези експерименти бяха интерпретирани в подкрепа на модела за РНК редакция, предложен от проф. Тасуку Хонджо.

Импакт фактор: 9.380; Независими цитирания: 22

Статията е включена в материалите за защита на дисертационен труд през 2011 г.

34. Shivarov V, Nikolova V, Balatzenko G, Guenova M. Microgranular relapse of typical hypergranular acute promyelocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2006 Dec;47(12):2661-3.

Тази статия описва случай на морфологична промяна на промиелоцитна левкемия при рецидив във вариантна промиелоцитна левкемия. Интересното е, че морфологичната промяна не беше свързана с промяна в имунофенотипа на малигенената популация, което противоречи на някои хипотези че вариантната промиелоцитна левкемия произхожда от йерархично по-незрели миелоидни прогенитори.

Импакт фактор: 1.559; Независими цитирания: 0

35. Shivarov V, Dimitrov J, Guenova M. Lymphoid neoplasms in Bulgaria according to the WHO classification (2001). The experience of the National Center of Haematology. Haematologica. 2005 Dec;90(12 Suppl):ELT07.

Тази статия е първото систематично изследване на разпределението на лимфоидните неоплазии в България съгласно класификацията на СЗО от 2001 г. Тя се базира на анализа на 790 новодиагностицирани случаи от периода 01.01.2003 - 31.12.2004. Това е едно от първите подобни съобщения от Източна Европа и има значение за рабирането на епидемиологията и планирането на здравните грижи при тези пациенти.

Импакт фактор: 4.575; Независими цитирания: 4

36. Jeleв L, Shivarov V, Surchev L. Bilateral variations of the psoas major and the iliacus muscles and presence of an undescribed variant muscle—accessory iliopsoas muscle. Ann Anat. 2005 Jul;187(3):281-6.

В тази статия от началото на професионалния ми път описваме билатерални вариации на мускулите psoas major и iliacus muscles, комбинирани с вариации в хода на левия и десния

феморален нерв. Те бяха установени при рутинна анатомична дисекция с учебна цел няколко години по-рано. От лявата страна беше изцяло формиран нов вариантен мускул, който отделязахме като *m. Iliopsoas accessorius*. Това е първото описание на подобен вариант, като след това последваха различни съобщения от анатоми и неврохирурзи, подчертвящи значението на подобни вариетети в патогенезата на феморалната невропатия.

Импакт фактор: 0.427; Независими цитирания: 27

II. Глави от международни книги

1. Velizar Shivarov. *Asking existing data the right questions – data mining as a research option in low- and middle-income countries*. In: „Improving Oncology Worldwide“, Editor: Uta Schmidt-Straßburger in the Sustainable Development Goals Series published by SpringerNature (2021) (accepted).

Тази глава е вдъхновена от участието ми в юбилейната среща на възпитаниците на Master Online Advanced Oncology Study Program по повод 10-тата година от започването на магистърската програма в Университета в Улм, Германия. Срещата се проведе онлайн по време на безпрецедентни пандемии на COVID-19 през октомври 2020 г. До голяма степен текстът е лична ретроспекция на моята изследователски усилия в областта на хематологията и раковата биология през последното десетилетие. Повечето идеи, които разгледах, както и използваните подходи, бяха вдъхновени от участието ми в програмата. Надявам се, че тези лични откровения относно изследователските ми подходи ще помогнат на млади специалисти с истински интерес към изследванията на рака, но с ограничени ресурси при дизайна и изпълнението на собствени изследователски проекти.

Публикацията е включена в материалите за защита на дисертационен труд през 2023 г.

III. Полезни модели

- BG1777 (U1)** Средство за директно определяне на мутации в екзон 12 на човешкия *JAK2* ген в проби от кръв или костен мозък.
- BG1494 (U1)** Средство за *in vitro* определяне на W515A/K/L/R мутации на *MPL* гена в кръвна проба.
- BG1481 (U1)** Средство за директно определяне на JAK2 V617F мутация в кръвна проба.

И трите полезни модела описват разработването и приложението на нови Lumipex™-базирани методи за детекция на мутации, свързани с миелопролиферативни неоплазии.

Получената защита като интелектуална собственост доказва оригиналността на методите и техническата им иновативност.

Полезните модели са отличени с голяма награда за млад учен „Питагор“ през 2014 г. и с Втора награда от Конкура за Млад изобретател на Фондация „Еврика“ през 2013 г.