



До  
Председателя на научно жури,  
Определено със Заповед № 1778/25.06.2024г.  
на Ректора на Медицински университет – Плевен

Приложено представям:

Становище

по конкурс за заемане на академична длъжност „Доцент“

по научна специалност „Хематология и преливане на кръв“, област на висше образование 7.

Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1 Медицина

Специалност „Хематология“

обявен в ДВ бр. 37/26.04.2024 за нуждите на Научноизследователския институт на МУ –  
Плевен

Изготвено от: Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, дм

Научна специалност/-и: Вътрешни болести и Клинична хематология

Институция : МУ-Варна, Втора катедра по вътрешни болести, УС хематология

Адрес и контакти: УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД, Клиника по хематология

Пощенски адрес: гр. Варна 9010, бул. “Христо Смирненски“1

Електронен адрес: [ilinamicheva@gmail.com](mailto:ilinamicheva@gmail.com)

Телефони: GSM +359896262300

## СТАНОВИЩЕ

ПО КОНКУРС ЗА ЗАЕМАНЕ НА АКАДЕМИЧНА ДЛЪЖНОСТ „ДОЦЕНТ” В МУ-ПЛЕВЕН

### **I. Анализ на кариерния профил на кандидата**

Доц. д-р Велизар Шиваров завършва висше образование – Магистър по медицина през 2003 г. с отличие. Придобива специалност „Клинична имунология” през 2011 г., специалност „Клинична хематология” през 2019 г в МУ-София, магистърска степен по „Онкология” от Ulm University, Германия 2014 г. През 2011 придобива ОНС „Доктор” по научна специалност „Имунология” с дисертация на тема “Проучвания върху механизма на действие на ензима активационно-индуцируема цитидиндеаминаза (AID) при процеса на изотипно превключване и соматични хипермутации на имуноглобулиновите гени”, а през 2023 ОНС „Доктор” по научна специалност „Хематология и преливане на кръв” с тема “Имуногенетични аспекти в патогенезата на JAK2 V617F-положителните миелопролиферативни неоплазии”. През 2017 г. завършва едногодишен следдипломен курс по Генетика и терапия на рака в Harvard University, а 2020 г. сертификационен акредитиран курс по Компетентност по малигнен лимфоми към Ulm University, Германия. Има Европейски сертификат по хематология от Европейската хематологична асоциация от 2018 г. От 2003 до 2020г. има проведени множество специализации и обучения у нас и в чужбина, спечелил е редица стипендии и грантове.

От 2004 до 2014 доц. д-р Шиваров работи като научен сътрудник, Лаборатория по хематопатология и имунология, СБАЛХЗ, София. 2006-2008 е изследовател със стипендия към Катедра по имунология и геномна медицина в Университет Киото, Япония. 2011-2012 е постдокторант, Раков център към Медицински факултет на Университет Yale, Ню Хейвън, САЩ. От 2015г. работи в отделение по Клинична хематология, УМБАЛ „Софиямед”, София като лекар, специализант и специалист, а от 2015 е началник Лаборатория по Клинична имунология в същата болница. От 12.2018 е доцент, катедра Генетика, Биологически Факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“. От 06. 2020 е медицински директор в Хематология/Онкология, PRAHS/ICON plc, София, България. Понастоящем е изследовател към НИИ на МУ-Плевен.

Д-р Шиваров е член на Български лекарски съюз, F1000Prime Subcommittee on Clinical Immunology and Rheumatology, EHA, ASH 2012-14, Member of the Scientific Committee for Lymphoid Neoplasia, Yale Alumni Association, Harvard Alumni Association, Ulm University Alumni Association. За периода 2012-2014 е член на Научния комитет по лимфоидни неоплазии на American Society of Hematology.

Професионалната му дейност получава най-висока национална оценка с удостояването му от МОН с голямата награда „Питагор” за млад учен през 2014 г. Допълнително национално признание е втората награда за млад изобретател на фондация „Еврика” за 2012 г. През 2021 година получава наградата за изявена млада личност в категория „Иновации в медицината“ на Junior Chamber International, клон България. Сред първите 20 победители е за наградата на ЕНА-ASH Translational Research Training in Hematology през 2009 г.

Научните интереси на д-р Шиваров са в областта на биология на В-лимфоцитите, молекулярна диагностика, миелоидни неоплазии, молекулярно-генетични биомаркери, имуногенетика, редки болести.

Владее отлично английски, добре немски и френски.

През последните 10 години е рецензент на 38 международни списания.

## **II. Общо описание на представените материали по конкурса.**

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител включва необходимите документи, посочени в чл. 24 за Условието и реда за заемане на академичната длъжност „доцент” от Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за развитие на академичния състав в МУ–Плевен.

## **III. Оценка на научните трудове на кандидата за цялостното академично развитие.**

### **Обща характеристика на научната продукция и публикационната активност**

Представените трудове за участие в конкурса са общо 36 под формата на пълнотекстови публикации в 22 списания, индексирани в Scopus и Web of Science (ISSN) с общ импакт фактор 114 и един в сборник с ISBN.

Представен е списък и на 75 научни съобщения и доклади с отпечатани резюмета на международни и национални научни форуми.

### **ГРУПА ПОКАЗАТЕЛИ А:**

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"-2011г., Национален център по заразни и паразитни заболявания, София, България, Научна специалност „Имунология“. „Проучвания върху механизма на действие на ензима активационно-индуцируема цитидиндеаминаза (AID) при процесите на изотипно превключване и соматични хипермутации на имуноглобулиновите гени“ -**50т.**

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"-2023г, МУ-Плевен, Научна специалност „Хематология и преливане на кръв“- “Имуногенетични аспекти в патогенезата на JAK2 V617F-положителните миелопролиферативни неоплазии” –**50 т.**

### **ГРУПА ПОКАЗАТЕЛИ В:**

Хабилитационен труд под формата на 10 научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (само Scopus и Web of science) -**124,5 т.**

#### ГРУПА ПОКАЗАТЕЛИ Г:

Публикации и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (само Scopus и Web of science)-**387,07 т.**

#### ГРУПА ПОКАЗАТЕЛИ Д:

Цитирания или рецензии в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация или в монографии и колективни томове-**5820т.**

#### ГРУПА ПОКАЗАТЕЛИ Е: **409т.**

### **Научна активност – разпространение и приложение на научно-практическите постижения на кандидата сред научната общност**

Основните направления на научна активност на д-р Шиваров са биология на В-лимфоцитите, молекулярна диагностика, миелоидни неоплазии, молекулярно-генетични биомаркери, имуногенетика, редки болести и състояния.

Голяма част от научните му разработки са посветени на ензима AID. Демонстрирана е дисоциация между каталитичната активност на голям брой мутанти на ензима AID като особено впечатление прави наличието на мутанти с напълно липсваща деаминационна активност върху еВДНК, но с относително запазена активност при процесите на изотипно превключване. Получените резултати имат значение за правене на заключения относно молекулярните механизми на формиране на имунологична памет и евентуално за процесите на лимфомагенезата. Демонстрирано е *in vitro* и на ксенотрансплантационни модели, че транслокацията на AIDER фузирани протеини след добавяне на тамоксифен води до индукция на апоптоза в клетъчна линия от човешки Бъркитов лимфом. Липсата на сигнал за експорт от ядрото на AID (т.нар. JP8Bdel мутант) е съпроводена с по-високо ниво на апоптоза, тъй като AID не може да се експортира от ядрото. Тези данни предполагат, че един от възможните подходи за активиране на AID с цел индукция на апоптоза е блокиране на нуклеарния експорт.

Демонстриран е ефекта на експресията на ензима AID върху епигенетичния профил (ДНК метилиране) на лимфоми, произхождащи от герминативните центрове.

Разработен е нов, оригинален, високо производителен течностен микросферов чип метод, базиран на Luminex<sup>TM</sup> технологията за определяне на 6 функционално значими генни полиморфизми в *MBL2* гена и *MPL*, *JAK2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* гените. Съществена

техническа новост е използването на олигонуклеотидни сонди с BNA-модифицирани олигонуклеотиди. Методите са защитени с три национални полезни модели.

Разработен е нов 9-генен панел (*ASXL1*, *EZH2*, *CALR*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *U2AF1*) за детекция чрез секвениране от следващо поколение (NGS) на клинично значими мутации при пациенти с миелоидни неоплазии. Апробирани са 3 метода (директно секвениране, HRM и секвениране от следващо поколение) за анализиране на мутации в *CALR* ген. Доказана е тяхната приложимост в клинично-лабораторната практика.

Въведени са два метода: Luminex™ базирано профилиране и qPCR за определяне на експресионни профили на микроРНКи. По този начин е направено първото олигоценно експресионно профилиране на миелоидни неоплазии у нас. Разработен е нов метод за детекция на *JAK2* V617F мутации в живи клетки чрез използване на нанотехнология – т. нар. „наноламъци“. За първи път е направено комплексно проучване на мутации в *JAK2*, *MPL*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH2*, *CALR*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *U2AF1* при пациенти с миелоидни неоплазии от българската популация чрез оригинални методи. За първи път е направен епигенетичен профил чрез анализ на експресията на микроРНКи при български пациенти с остра миелоидна левкемия. Представени са предварителни данни, че определени микроРНКи биха могли да се използват като маркер за измерима/минимална остатъчна болест. Направен е биоинформатичен анализ на неоморфните C-краища на мутантни *CALR* протеини и е предложен модел за механизма на действие на новоидентифицираните мутации в гена *CALR* чрез взаимодействие с калциневрин-NFATс сигналния път. Чрез мета-анализ е оценена е прогностичната стойност на мутациите на гена *ASXL1* при пациенти с ОМЛ, както и експресионният профил при тази подгрупа пациенти. Оценена е прогностичната стойност на мутациите на гена *DNMT3A* при пациенти с ОМЛ. Установени са рекурентни мутации в *BCAS1* и *WASF3* гените при пациенти с миелоидни неоплазии. Разработен е прогностичен скор въз основа на експресията на 7 микроРНКи при пациенти с ОМЛ. Освен това е демонстрирано, че дефинираните от скор група пациенти имат сигнификантни различия по отношение на профила на генна експресия и епигенетичния профил (ДНК метилиране). Демонстрирано е рационално интегриране на омикс данни от различни платформи за получаване на клинично значимо и биологично обясними заключения и хипотези.

За първи път е направено комплексно имуногенетично проучване на *MBL2* гена, включващо 6 функционално значими SNPs като за целта е разработен оригинален метод. Изследвано е алелното и хаплотипно разпределение в четири етнически групи.

Демонстрирано е наличието на вероятното съществуване на протективни HLA алели (като

HLA-B\*35:01) за развитието на JAK2 V617F зависими миелопролиферативни неоплазии. Предложен е модел за действието на такива алели и на механизмите за тяхното избягване. Предложен е собствен теоретичен модел за развитието и прогресията на рака чрез постоянна генетична, епигенетична и фенотипна диверсификация на туморната клетъчна популация.

### **Лимфопролиферативни заболявания**

Направен е първият у нас анализ на разпределението на лимфопролиферативните заболявания по нозологични единици съгласно класификацията на СЗО (2001). Въз основа на данните от Американския раков регистър след 2000 г. са оценени клиничните резултати при рядкото заболяване - лимфом на Ходжкин с лимфоцитно преобладаване.

### **Редки болести и състояния**

Направен е комплексен анализ за оценка на честота на вторични тумори при пациенти със системна мастоцитоза въз основа на данни от Американския раков регистър. За първи път е описан случай на наследствена ксантинурия като фармакогенетичен ефект в контекста на лечение с азатиоприн, водещ до тежка миелосупресия. За първи път у нас, чрез прилагане на цялостно екзомно секвениране (WES) за идентифициране на каузална вродена мутация, е описано първото българско семейство с изключително рядко заболяване – фамилна еритроцитоза тип 4 – едва трети случай в света с мутация EPAS1 p.M535T. Описана е нова транслокация t(7;21)(q32;q22) със засягане на *RUNX1* гена при пациент с ОМЛ. Направено е едно от първите описания на новата транслокация t(9;22)(p24;q11), която води до фузионен белтък BCR-JAK2, която доведе до дефиниране на нова нозологична единица. Описани са линейни и морфологични превключвания в хода на остри левкемии, които допълват картината на линейната пластичност на левкемичните стволови клетки. Описан е първият случай на асоциация между миелопролиферативна неоплазия с JAK2 p.V617F мутация и РОЕМС синдром. Описан е нов вариант мускул – *m. iliopsoas accessorius*, чието разпознаване в клиничната практика има значение в неврохирургията.

### **Въвеждане на нови молекулярно диагностични методи**

Методи за детекция на JAK2; MPL и CALR мутации – разработени и внедрени;

Методи за детекция на IDH1, IDH2 и DNMT3A мутации – разработени и внедрени;

NGS метод за мултиплексно определяне на мутации при миелоидни левкемии – разработен и внедрен, заедно с аналитичен подход;

Нов метод за определяне на имуногенността на неоантигени от мутантни JAK2 и CALR белтъци – разработен и внедрен.

### **Участие в изпълнение и ръководство на научноизследователски проекти**

Д-р Шиваров е участвал пряко в 14 научни проекта с национално и международно финансиране. По-голямата част от тях са довели до научни публикации или представяния на научни срещи. Работил е като изследовател в три престижни университета: Kyoto University, Япония с научен ръководител проф. Тасуку Хондзо, получил Нобелова награда за Медицина и физиология за постиженията си в областта на имунологията на рака през 2018 година, Yale University, САЩ, Ulm University, Германия.

#### **IV. Оценка на монографичния труд или равностойни публикации, представени за участие в конкурса за „ДОЦЕНТ” от кандидата.**

Д-р Шиваров участва в конкурса с Хабилизационен труд под формата на 10 научни публикации само за област на висшето образование 7, публикувани издания, реферирани и индексирани в Scopus и Web of Science, (с ISSN). Общият IF е 21,411.

Представените научни публикации са тематично свързани с изследване на молекулярно-генетични биомаркери основно при миелоидните неоплазии.

Представен е 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. Описано е българско семейство с тип 4 фамилна еритроцитоза, т.е. с мутация в гена *EPAS1*, който кодира транскрипционния фактор HIF2a.

Разработен и валидиран е 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.

Друга тема е разработването и валидирането на нов микросферов, течностен, хибридизационен метод за детекция на мутации в различни гени-DNMT3A гена в кодон R882, IDH1 и IDH2 гените при миелоидни неоплазии, екзон 12 на JAK2 гена, човешкия MPL ген. Изследван е профила на експресия на микроРНКи при пациенти с остра миелоидна левкемия с оглед приложението на експресията на микроРНКи като маркер за оценка на минималната резидуална болест.

#### **V. Отражение (цитиране) на публикациите на кандидата в националната и чуждестранна литература (публикационен имидж).**

По прегледани база данни Scopus и Web of Science са издирени 388 цитирания в чуждестранни източници. Изключени са автоцитирания.

## **VI. Комплексна, качествена оценка на учебно-методическата и преподавателската дейност, вкл. научно ръководство на студенти, докторанти, специализанти.**

Д-р Шиваров има богат опит като преподавател. Участвал е в актуализацията на задължителния курс по „Фармакогенетика“ за специалност фармация (БЕО и АЕО), автор е на курса „Имуногенетика“ в ПМ „Генетика и геномика“, както и съавтор на учебна програма по „Омикс-технология“ в СДК „Генетика и биомедицина“ към СУ „Св. Климент Охридски“. За периода 2016-2021 към катедра Генетика има учебна натовареност общо 1414 аудиторни часа.

Водил е часове по Фармакогенетика във факултет по Химия и фармация СУ „Св. Климент Охридски“ като за периода 2021/2022 има 270 часа лекции и упражнения, а за периода 2023/2024-30 часа лекции и 30 часа упражнения БЕО и 30 часа лекции и 30 часа упражнения АЕО. Ръководител е на успешно защитил дипломант към СУ „Св. Климент Охридски“, както и на редовен докторант. От 2024 е ръководител на дипломант по магистърска програма „Онкология“ към Университета Улм, Улм, Германия.

Гост лектор е в Модерно училище по акушерство и гинекология, МУ – Плевен (2023) и в Harvard Medical School със семинар за кариерно ориентиране към програма High-Impact Cancer Research (2021).

## **VII. Критични бележки и препоръки.**

## **VIII. Заключение – отговаря / не отговаря на задължителните и специфични условия и наукометрични критерии – за академичната длъжност „Доцент“.**

Д-р Велизар Шиваров е изтъкнат учен със забележителна научна кариера, оценена високо у нас и в чужбина. Има значителен опит като университетски преподавател, специалист и ръководител. Д-р Велизар Шиваров отговаря и многократно надвишава задължителните условия, количествени критерии и наукометричните показатели, съгласно регламента за заемане на академична длъжност „Доцент“ в МУ Плевен (събрани общо точки-6840,57 при изискуеми 400).

С убеденост препоръчвам на уважаваното Научно жури да предложи на Факултетния Съвет да присъди на Доц. д-р Велизар Шиваров, дб, дм академичната длъжност “доцент”.

09/08/2024

**На основание чл. 59 от ЗЗЛД**  
Проф. Илина Мичева, дм



## OPINION

### COMPETITION FOR THE ACADEMIC POSITION OF "ASSOCIATE PROFESSOR" IN MU-PLEVEN

#### **I. Analysis of the candidate's career profile**

Dr. Velizar Shivarov graduated from higher education - Master of Medicine in 2003 with honors. Acquired the specialty "Clinical Immunology" in 2011, specialty "Clinical Hematology" in 2019 at MU-Sofia, master's degree in "Oncology" from Ulm University, Germany in 2014. In 2011, obtained the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Immunology" with a dissertation on the topic "Studies on the mechanism of action of the enzyme activation-inducible cytidine deaminase (AID) in the process of isotype switching and somatic hypermutations of immunoglobulin genes", and in 2023 educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Hematology and blood transfusion" with the topic "Immunogenetic aspects in the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms". In 2017, he completed a one-year postgraduate course in Cancer Genetics and Therapy at Harvard University, and in 2020, a certification accredited course in Competence in Malignant Lymphomas at Ulm University, Germany. In 2018 he obtained a European Certificate in Hematology from the European Hematology Association. From 2003 to 2020 he has carried out numerous specializations and trainings in Bulgaria and abroad, he has won a number of scholarships and grants.

From 2004 to 2014, Dr. Shivarov worked as a research assistant, Laboratory of Hematopathology and Immunology, SBALHZ, Sofia. 2006-2008 was a research fellow at the Department of Immunology and Genomic Medicine at Kyoto University, Japan. 2011-2012 is a postdoctoral fellow, Yale University School of Medicine Cancer Center, New Haven, USA. Since 2015 works in the Department of Clinical Hematology, UMBAL "Sofamed", Sofia as a doctor, resident and specialist, and since 2015 he is the head of the Laboratory of Clinical Immunology in the same hospital. Since 12.2018 he is an associate professor, Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski". Since 06. 2020 he is the medical director in Hematology/Oncology, PRAHS/ICON plc, Sofia, Bulgaria. He is currently a researcher at the Research Institute of MU-Pleven.

Dr. Shivarov is a member of the Bulgarian Medical Association, F1000Prime Subcommittee on Clinical Immunology and Rheumatology, EHA, ASH 2012-14, Member of the Scientific Committee for Lymphoid Neoplasia, Yale Alumni Association, Harvard Alumni Association, Ulm University Alumni Association. For the period 2012-2014, he is a member of the Scientific Committee on Lymphoid Neoplasms of the American Society of Hematology.

His professional activity received the highest national evaluation with the Ministry of Education and Science awarding him with the "Pythagoras" prize for a young scientist in 2014. Additional national recognition was the second award for a young investigator of the Eureka Foundation in 2012. In 2021, he received the award for an outstanding young person in the "Innovations in Medicine" category of the Junior Chamber International, Bulgaria branch. He was among the top 20 winners for the 2009 EHA-ASH Translational Research Training in Hematology Award.

Dr. Shivarov's scientific interests are in the field of B-lymphocyte biology, molecular diagnostics, myeloid neoplasms, molecular genetic biomarkers, immunogenetics, rare diseases.

He speaks excellent English, good German and French.

In the last 10 years, he has been a reviewer for 38 international journals.

#### **II. General description of the submitted materials for the competition.**

The presented set of materials on paper and electronic media includes the necessary documents specified in Art. 24 on the Conditions and procedure for occupying the academic position of "Associate Professor" from the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for the Development of the Academic Staff at MU-Pleven.

### **III. Evaluation of the scientific works of the candidate for the overall academic development.**

#### **General characteristics of scientific production and publication activity**

The works presented for participation in the competition are a total of 36 in the form of full-text publications in 22 journals indexed in Scopus and Web of Science (ISSN) with a total impact factor of 114 and one in a volume with ISBN.

A list of 75 scientific communications and reports with printed abstracts at international and national scientific forums is also presented.

#### **GROUP OF INDICATORS A:**

Dissertation for the award of the educational and scientific degree "doctor" - 2011, National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, Scientific specialty "Immunology". "Studies on the mechanism of action of the enzyme activation-inducible cytidine deaminase (AID) in the processes of isotype switching and somatic hypermutations of immunoglobulin genes"-50 points.

Dissertation for the award of the educational and scientific degree "doctor" - 2023, MU-Pleven, Scientific specialty "Hematology and blood transfusion" - "Immunogenetic aspects in the pathogenesis of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms" - 50 points.

#### **GROUP OF INDICATORS IN:**

Habilitation work in the form of 10 scientific publications in publications that are referenced and indexed in world-famous databases with scientific information (only Scopus and Web of science) -124.5 points.

#### **GROUP OF INDICATORS D:**

Publications and reports published in scientific publications, referenced and indexed in world-famous databases with scientific information (only Scopus and Web of science)-387.07 points.

#### **GROUP OF INDICATORS E:**

Citations or reviews in scientific publications, referenced and indexed in world-renowned databases of scientific information or in monographs and collective volumes-5820 points.

**GROUP OF INDICATORS IS:** 409 points.

#### **Scientific activity - dissemination and application of the candidate's scientific and practical achievements among the scientific community**

Dr. Shivarov's main areas of scientific activity are B-lymphocyte biology, molecular diagnostics, myeloid neoplasms, molecular genetic biomarkers, immunogenetics, rare diseases and conditions.

Much of his scientific work is devoted to the enzyme AID. A dissociation between the catalytic activity of a large number of mutants of the AID enzyme has been demonstrated, and the presence of mutants with a complete lack of deamination activity on DNA, but with relatively preserved activity in isotype switching processes, makes a special impression. The obtained results are important for drawing conclusions about the molecular mechanisms of immunological memory formation and possibly about the processes of lymphomagenesis. It has been demonstrated in vitro and in xenotransplantation models that translocation of AIDER fusion proteins after addition of tamoxifen results in the induction of apoptosis in a human Burkitt's lymphoma cell line. Absence of AID nuclear export signal (the so-called JP8Bdel mutant) is accompanied by a higher level of apoptosis because AID cannot be

exported from the nucleus. These data suggest that one possible approach to activate AID to induce apoptosis is to block nuclear export.

The effect of AID enzyme expression on the epigenetic profile (DNA methylation) of lymphomas originating from the germinal centers has been demonstrated.

A new, original, high-throughput liquid microsphere chip method based on Luminex<sup>TM</sup> technology was developed for the determination of 6 functionally significant gene polymorphisms in the MBL2 gene and the MPL, JAK2, DNMT3A, IDH1, IDH2 genes. A significant technical innovation is the use of oligonucleotide probes with BNA-modified oligonucleotides. The methods are protected by three national utility models.

A new 9-gene panel (ASXL1, EZH2, CALR, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, U2AF1) was developed for next-generation sequencing (NGS) detection of clinically relevant mutations in patients with myeloid neoplasms. Three methods (direct sequencing, HRM and next-generation sequencing) were tested to analyze mutations in the CALR gene. Their applicability in clinical and laboratory practice has been proven.

Two methods are introduced: Luminex<sup>TM</sup> based profiling and qPCR to determine expression profiles of microRNAs. In this way, the first oligogenic expression profiling of myeloid neoplasias was done in our country. A new method has been developed for the detection of JAK2 V617F mutations in living cells using nanotechnology - the so-called "nanoflames". For the first time, a complex study of mutations in JAK2, MPL, IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, CALR, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, U2AF1 in patients with myeloid neoplasias from the Bulgarian population was done using original methods. For the first time, an epigenetic profile was made by analyzing the expression of microRNAs in Bulgarian patients with acute myeloid leukemia. Preliminary data are presented that certain microRNAs could be used as a marker for measurable/minimal residual disease. A bioinformatic analysis of the neomorphic C-termini of mutant CALR proteins was performed and a model was proposed for the mechanism of action of the newly identified mutations in the CALR gene through interaction with the calcineurin-NFATc signaling pathway. A meta-analysis evaluated the prognostic value of ASXL1 gene mutations in patients with AML, as well as the expression profile in this subgroup of patients. The prognostic value of DNMT3A gene mutations in AML patients was assessed. Recurrent mutations in the BCAS1 and WASF3 genes have been found in patients with myeloid neoplasia. A prognostic score was developed based on the expression of 7 microRNAs in AML patients. Furthermore, score-defined groups of patients have been shown to have significant differences in terms of gene expression profile and epigenetic profile (DNA methylation). A rational integration of omics data from different platforms to obtain clinically relevant and biologically explainable conclusions and hypotheses is demonstrated.

For the first time, a complex immunogenetic study of the MBL2 gene was performed, including 6 functionally significant SNPs, and an original method was developed for this purpose. The allelic and haplotype distribution in four ethnic groups was investigated.

The likely existence of protective HLA alleles (such as HLA-B\*35:01) for the development of JAK2 V617F-dependent myeloproliferative neoplasias has been demonstrated. A model for the action of such alleles and the mechanisms for their avoidance is proposed. A proprietary theoretical model for the development and progression of cancer through constant genetic, epigenetic and phenotypic diversification of the tumor cell population is proposed.

Lymphoproliferative diseases

The first analysis of the distribution of lymphoproliferative diseases by nosological units according to the WHO classification (2001) was made in our country. Based on data from the American Cancer Registry after 2000, clinical outcomes in the rare disease - Hodgkin's lymphoma with lymphocytic predominance were evaluated.

Rare diseases and conditions

A complex analysis was performed to estimate the incidence of secondary tumors in patients with systemic mastocytosis based on data from the American Cancer Registry. A case of hereditary xanthinuria as a pharmacogenetic effect in the context of azathioprine treatment leading to severe myelosuppression is described for the first time. For the first time in our country, by applying whole exome sequencing (WES) to identify a causal congenital mutation, the first Bulgarian family with an extremely rare disease - familial erythrocytosis type 4 - was described - only the third case in the world with EPAS1 p.M535T mutation. A new translocation t(7;21)(q32;q22) affecting the RUNX1 gene is described in a patient with AML. One of the first descriptions of the new translocation t(9;22)(p24;q11) that results in a BCR-JAK2 fusion protein was made, which led to the definition of a new nosological entity. Linear and morphological switches in the course of acute leukemias have been described, which complete the picture of linear plasticity of leukemic stem cells. The first case of association between myeloproliferative neoplasia with JAK2 p.V617F mutation and POEMS syndrome is described. A new variant muscle is described – m. iliopsoas accessorius, the recognition of which in clinical practice is important in neurosurgery.

#### **Introduction of new molecular diagnostic methods**

JAK2 detection methods; MPL and CALR mutations - developed and implemented;

Methods for detection of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations – developed and implemented;

NGS method for multiplex determination of mutations in myeloid leukemias - developed and implemented, together with an analytical approach;

A new method for determining the immunogenicity of neoantigens from mutant JAK2 and CALR proteins - developed and implemented.

#### **Participation in the implementation and management of scientific research projects**

Dr. Shivarov has directly participated in 14 scientific projects with national and international funding. The majority of these have resulted in scientific publications or presentations at scientific meetings. He worked as a researcher at three prestigious universities: Kyoto University, Japan with scientific supervisor Prof. Tasuku Honjo, recipient of the Nobel Prize in Medicine and Physiology for his achievements in the field of cancer immunology in 2018, Yale University, USA, Ulm University, Germany .

#### **IV. Evaluation of the monographic work or equivalent publications submitted for participation in the competition for "ASSOCIATE PROFESSOR" by the candidate.**

Dr. Shivarov participated in the competition with a Habilitation work in the form of 10 scientific publications only for the field of higher education 7, published editions, referenced and indexed in Scopus and Web of Science, (with ISSN). Total IF is 21,411.

The presented scientific publications are thematically related to the study of molecular genetic biomarkers mainly in myeloid neoplasms.

A complete analysis of JAK2, MPL and CALR gene mutations in Bulgarian patients with myeloproliferative neoplasms without the Philadelphia chromosome is presented. Four methods were used for the detection of CALR mutations: high resolution melt (HRM) analysis, Sanger sequencing, sequencing of target genes using a semiconductor platform and whole exome sequencing. A Bulgarian family with type 4 familial erythrocytosis is described, i.e. with a mutation in the EPAS1 gene, which encodes the transcription factor HIF2a.

A novel panel was developed and validated for sequencing all coding exons of 9 genes associated with myeloid neoplasms. This is one of the first papers describing such an in-house panel and using the second most popular Next Generation Sequencing (NGS) platform, Ion Torrent.

Another topic is the development and validation of a new microsphere, liquid, hybridization method for the detection of mutations in different genes - DNMT3A gene at codon R882, IDH1 and IDH2 genes in myeloid neoplasms, exon 12 of the JAK2 gene, the human MPL

gene. The expression profile of microRNAi in patients with acute myeloid leukemia was investigated with a view to the application of microRNA's expression as a marker for the assessment of minimal residual disease.

**V. Reflection (citation) of the candidate's publications in national and foreign literature (publication image).**

Based on the reviewed Scopus and Web of Science databases, 388 citations in foreign sources were searched. Auto-citations are excluded.

**VI. Complex, qualitative evaluation of the teaching-methodical and teaching activity, incl. scientific guidance of students, doctoral students, specialists.**

Dr. Shivarov has extensive experience as a teacher. He participated in the update of the mandatory course on "Pharmacogenetics" for the specialty of pharmacy (education in Bulgarian and English), authored the course "Immunogenetics" in the Faculty of Medicine "Genetics and Genomics", as well as co-authored a curriculum in "Omics-technology" in the Faculty of Medicine "Genetics and Biomedicine" at SU "St. Kliment Ohridski". For the period 2016-2021, in the Department of Genetics he has a total teaching load of 1414 auditorial hours.

He led classes in Pharmacogenetics at the Faculty of Chemistry and Pharmacy, SU "St. Kliment Ohridski" and for the period 2021/2022 there are 270 hours of lectures and exercises, and for the period 2023/2024-30 hours of lectures and 30 hours of exercises in Bulgarian and 30 hours of lectures and 30 hours of exercises in English. He is a mentor of a successfully defended diploma student at the SU "St. Kliment Ohridski", as well as a full-time doctoral student. From 2024, he is the supervisor in the graduate program "Oncology" at the University of Ulm, Ulm, Germany.

He is a guest lecturer at the Modern School of Obstetrics and Gynecology, MU – Pleven (2023) and at Harvard Medical School with a seminar on career guidance for the High-Impact Cancer Research program (2021).

**VII. Critical notes and recommendations.**

**VIII. Conclusion - meets / does not meet the mandatory and specific conditions and scientometric criteria - for the academic position "ASSOCIATE PROFESSOR".**

Dr. Velizar Shivarov is a distinguished scientist with a remarkable scientific career, highly appreciated in our country and abroad. He has considerable experience as a university lecturer, specialist and manager. Dr. Velizar Shivarov meets and even exceeds the mandatory conditions, quantitative criteria and scientometric indicators, according to the regulation for occupying the academic position "Associate Professor" at MU Pleven (collected total points 6840.57 at 400 required).

With conviction, I recommend to the respected Scientific Jury to propose to the Faculty Council to award Dr. Velizar Shivarov the academic position of "Associate Professor".

09/08/2024

**На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Prof. Ilina Micheva, MD, PhD