

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ НА БЪЛГАРСКИ И АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

на Силвия Йорданова Атанасова-Стамова, дф
за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „Доцент“
в област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление
7.3. Фармация, публикуван в ДВ брой 7 от 23.01.2024 г.

Научна продукция, покриваща минималните наукометрични изисквания:

***Критерий А.1. Дисертационен труд за придобиване на образователна и
научна степен „доктор“***

Силвия Йорданова Атанасова-Стамова. Синтез и охарактеризиране на заместени производни на имидазола с потенциален биологичен ефект. Медицински университет-Варна, 2021 г.

Инфекциозните агенти са причина за смъртта на милиони хора по света всяка година. Бактериалните, гъбичните и вирусните инфекции, водещи до усложнения, не могат да бъдат лекувани без приложение на антимикробен агент. В световен мащаб се полагат неимоверни усилия в създаването и търсенето на нови антимикробни средства, но синтезът на нови такива лекарства е дълъг и труден процес. Десетилетия наред се работи изключително активно по синтеза, охарактеризирането, изследването и изучаването на хетероциклени съединения. В частност имидазоловия пръстен е основен скелет в молекули с различни фармакологични свойства- антибактериални, противогъбични, антинеопластични, противовирусни, антидиабетни и други. От друга страна 5-нитроимидазоловите лекарства са едни от най-ефективните антимикробни агенти. Те се отличават с голямо разнообразие в терапевтичните си приложения. Основен представител на тази група е метронидазол-

лекарство, което близо 70 години се прилага успешно срещу тежките анаеробни инфекции. Тази дългогодишна употреба и сериозната изменчивост на микробните агенти крие опасност от развитие на резистентност и намаляване ефективността на метронидазол. Ето защо той се явява подходящ обект за различни химични трансформации и синтез на модифицирани негови производни. Целта е постигането на по-добри фармакокинетични показатели, редуциране на токсичните ефекти и не на последно място разширяване на потенциалната му биологична активност. Това определи и целта на настоящата научна разработка, а именно: синтез на нови и не описани в литературата производни на метронидазол, структурното им охарактеризиране и биологично изследване за антибактериална чувствителност. Успешно е разработен двуетапен синтетичен метод за получаване на амиди производни на метронидазол, с помощта на който са синтезирани две нови производни на метронидазол -MT2 и MT3. Получените нови съединения са структурно охарактеризирани с помощта на FT-IR, ^1H , ^{13}C -ЯМР-анализ и UV-ViS спектроскопски анализи. Разработен е UV-ViS спектроскопски метод за предварителна оценка на хидролитичната стабилност на новосинтезираните амидни производни. Методът определя изследваните молекули като стабилни при зададените условия. Разработени и валидирани са изократичен HPLC и градиентен UHPLC методи за идентифициране на метронидазол и неговите производни самостоятелно и в смеси. Установено е, че градиентният UHPLC/UV метод е по-подходящ за определяне на метронидазол и негови производни самостоятелно и в смеси. Приложен е теоретичен модел за оценка на потенциалната кожна метаболитна активност на метронидазол и неговите новосинтезирани производни. В резултат на проведения QSAR Toolbox анализ е установено, че новите амидни производни имат потенциал за кожна метаболитна активация за разлика от изходната структура. Приложен е и теоретичен модел за оценка на потенциалния микробен метаболизъм на метронидазол и неговите производни. В резултат на проведения QSAR Toolbox анализ на симулатор на микробен метаболизъм се установи, че изследваните съединения претърпяват метаболитна активация с потенциална възможност за образуване на 59 метаболита за MT2 и 72 метаболита за MT3. Оценен е антиоксидантният потенциал на новополучените производни на метронидазол посредством два подхода – способност за електронен пренос – ABTS-тест, пренос на водороден атом - DPPH-тест. Получените данни показват липса на антиоксидантна активност, която се дължи на структурните особености в новополучените

производни. Опитно е установена микробната чувствителност на новите амидни производни спрямо клинични изолати и референтен шам. Установено е, че въвеждането на амидна група в структурата на метронидазоловите производни води до поява на по-силна антимикробна активност срещу изследваните клинични изолати и референтен шам в сравнение с метронидазол.

Sylvia Yordanova Atanasova-Stamova. Synthesis and characterization of substituted imidazole derivatives with potential biological effect. Medical University-Varna, 2021.

Infectious agents cause the death of millions of people worldwide each year. Bacterial, fungal, and viral infections leading to complications cannot be treated without the use of an antimicrobial agent. Worldwide, enormous efforts are being made in the creation and search for new antimicrobial agents, but the synthesis of such drugs is a long and difficult process. For decades, work has been extremely active on the synthesis, characterization, research, and study of heterocyclic compounds. In particular, the imidazole ring is the main skeleton in molecules with various pharmacological properties, e.g., antibacterial, antifungal, antineoplastic, antiviral, antidiabetic and others. On the other hand, 5-nitroimidazole drugs are one of the most effective antimicrobial agents. They are distinguished by the great diversity in their therapeutic applications. The main representative of this group is metronidazole, a drug that has remained an invincible fighter against severe anaerobic infections for almost 70 years. This long-term use and the serious variability of microbial agents hide the danger of developing resistance and reducing the effectiveness of metronidazole. Therefore, it is a suitable object for various chemical transformations and the synthesis of its modified derivatives. The goal is to achieve better pharmacokinetic indicators, reduce toxic effects, and last but not least, expand its potential biological activity. This determined the purpose of the current scientific development, namely: the synthesis of new derivatives of metronidazole and those not described in the literature, their structural characterization, and biological testing for antibacterial sensitivity. A two-step synthetic method for the obtaining of metronidazole amide derivatives was successfully developed, with the help of which two new metronidazole derivatives - MT2 and MT3 - were synthesized. The new compounds obtained were structurally characterized using FT-IR, ^1H , ^{13}C -NMR, and UV-ViS spectroscopic analyzes. The UV-ViS spectroscopic method has been developed for preliminary evaluation of hydrolytic stability of newly synthesized amide derivatives. The method defines the

molecules studied as stable under the specified conditions. Isocratic HPLC and gradient UHPLC methods for the identification of metronidazole and its derivatives alone and in mixtures were developed and validated. The gradient UHPLC/UV method was found to be more suitable for the determination of metronidazole and its derivatives alone and in mixtures. A theoretical model was applied to evaluate the potential skin metabolic activity of metronidazole and its newly synthesized derivatives. As a result of the QSAR Toolbox analysis performed, it was found that the new amide derivatives have potential for skin metabolic activation in contrast to the parent structure. A theoretical model was also applied to evaluate the potential microbial metabolism of metronidazole and its derivatives. As a result of the QSAR Toolbox analysis performed on a microbial metabolism simulator, it was found that the investigated compounds undergo metabolic activation with the potential to form 59 metabolites for MT2 and 72 metabolites for MT3. The antioxidant potential of the newly obtained metronidazole derivatives was evaluated using two approaches: electron transfer ability ABTS test, hydrogen atom transfer DPPH test. The data obtained show a lack of antioxidant activity, which is due to the structural features in the newly obtained derivatives. The microbial susceptibility of the new amide derivatives was experimentally determined against clinical isolates and a reference strains. It was established that the introduction of an amide group into the structure of metronidazole derivatives leads to the appearance of stronger antimicrobial activity against the clinical isolates studied and reference strains compared to metronidazole.

В3. Хабилитационен труд – монография

Потенциалът на природните съединения в справянето с АМР

Етеричните масла - полезен съюзник в борбата с патогените

Медицински университет-Варна, 2023

Настоящият труд е посветен на най-актуалната за СЗО тематика свързана с нарастващата в глобален мащаб антибиотична резистентност, категоризирана от СЗО сред десетте най-големи заплахи за човешкото здраве. В **Първа глава** на монографичния труд се разглежда

огромното значение на АМР за човечеството в настоящия момент. Антимикробните лекарства безспорно предизвикват революция в лечението на инфекциозните заболявания и с тях се постига спасяването на много човешки животи. Продължителността на човешкия живот се е увеличила средно с 23 години, след въвеждането на първия антибиотик през 1910 г.. С успеха в лечението на инфекциозните заболявания се увеличават и възможностите за извършване на различни съвременни медицински процедури, включително хирургични интервенции, лечение на неопластични заболявания, трансплантация на органи и други. Полезното действие на антимикробните средства обаче до голяма степен е компрометирано от появата на феномена на антимикробна резистентност (АМР). Тя се дефинира като способност на микроорганизмите да оцеляват и да бъдат жизнеспособни под въздействието на антимикробни агенти. АМР е следствие от естествен подбор и генетични мутации. Но в голяма степен за развитието ѝ са отговорни много човешки фактори като неправилна употреба на антимикробни средства в хуманната и ветеринарната медицина, лоши хигиенни условия в здравните заведения или в хранителната верига, улесняващи предаването на резистентни микроорганизми. С течение на времето всичко това намалява терапевтичната ефикасност и ефективност, и в крайна сметка превръща антимикробните средства в безполезни. Някои нови модифицирани щамове намаляват шанса за подходяща терапия на пациентите, причинявайки дълбоки последствия, водещи до заболяване смъртност или клинични усложнения.

Засегната е връзката между Covid-19 и АМР в светлината на пандемията през 2020 г., която създаде безпрецедентен сценарий за лечение на подозирани или доказани бактериални инфекции с антибиотици.

Представени са и част от предприетите към момента глобални мерки за справяне с АМР, както и конкретни планове за действие на световни здравни, национални и обществени организации за противодействие. Описани са дейностите в посока на справяне с проблема и търсенето на алтернативи, които се заложили в Глобален план за действие (GAP) и Глобална антимикробна резистентност и система за наблюдение на употребата (GLASS), Европейски план за действие „Едно здраве“. В допълнение към „Единен здравен подход“, през 2015 г. СЗО стартира програма за управление, свързана с АМР, известна като Глобален план за действие, фокусиран върху АМР (GAP-AMR). Този план има за цел да гарантира, че инфекциозните заболявания винаги могат да бъдат успешно лекувани и предотвратени чрез

запазване на антимикробните средства по отговорен начин с подходяща достъпност и проверки на качеството. Вниманието е отделено и на факта, че голям брой проучвания пренасочват вниманието от човешки към по-сериозни фактори, допринасящи за АМР, идващи от приложението на антибиотици в животновъдството. Селскостопанският сектор не е пасивен участник в тези мерки и поема проактивна роля в осигуряването на отговорна употреба на лекарства във ветеринарната медицина чрез разработването на различни програми за управление на антимикробните средства. RUMA (Алианс за отговорно използване на лекарства в селското стопанство) насърчава иновативни усилия за подобряване на отговорното използване на лекарства, като същевременно се гарантира оптимално здраве и хуманно отношение към животните.

Направен е обзор на данни за АМР в Европа и България. Понастоящем доклад на Европейската мрежа за наблюдение на антимикробната резистентност (EARS-Net) обявен през 2022 г., обобщава данните за АМР в Европа за период 2017–2021 г. Двадесет и девет държави от Европейския съюз/Европейското икономическо пространство (ЕС/ЕИП) съобщават за случаи на патогени с антимикробна резистентност към Европейската мрежа за наблюдение на антимикробната резистентност (EARS-Net) за 2021, въз основа на данни за инвазивни бактериални изолати (извлечени от кръв или цереброспинална течност). Двадесет и осем държави съобщават за случаи на всичките осем бактериални вида, наблюдавани от EARS-Net (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, видове *Acinetobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*), докато една държава (Гърция) съобщава данни за всички бактериални видове с изключение на *S. pneumoniae*.

Подробно са разгледани и основни причини и вероятни механизми за развитие на резистентност срещу медицински значими патогени (бактерии, фунги).

Последната част от **Първа глава** е посветена на основните стратегии, прилагани в борбата с АМР. Повечето от тях са насочени към модификации и усъвършенстване на старите подходи, комбинации от подходи и включване на нови ресурси, които не са използвани до момента. Основен акцент е поставен върху природните съединения и фитотерапията. Природните продукти са основен източник на нови молекулни единици за почти всяко едно заболяване. В исторически аспект голяма част от вече познатите антимикробни агенти имат

природен произход. Впечатляващо е структурното разнообразие и сложност, което те притежават в сравнение със синтетичните класове. Световната здравна организация (СЗО) насърчава използването на лечебни растения като средства за поддържаща терапия при липсата на конвенционално лечение. Антимикробните съединения, изолирани от лечебни растения (екстракти, етерични масла) могат да инхибират растежа на бактерии, гъбички, вируси и протозои по механизми, различни от тези на използваните в момента антимикробни средства и поради това могат да имат значителна клинична стойност при лечението на резистентни микробни щамове. Някои от тези активни съединения показват, както присъща антибактериална активност, така и свойства за модифициране на антибиотичната резистентност, а други макар и сами по себе си да не са ефективни като антибиотици, когато се комбинират с антибиотици, могат да помогнат за преодоляване на антибиотичната резистентност при бактериите.

Втора глава изцяло е посветена на антимикробните природни съединения. Подробно са изложени данни, доказващи антимикробната активност на различни природни съединения на база на световния опит. Въпреки структурното им разнообразие те са класифицирани като: алкалоиди, ацетилени, иридоиди, ксантони, кумарини, лигнани, макролиди, полипептиди, стероидни сапонини, терпеноиди, флавоноиди, изофлавоноиди, феноли, хинони. Антимикробните им свойства са оценени спрямо хетерогенни микробни причинители, което доказва потенциала на природните източници в търсенето на нови антиинфекциозни агенти. В опит за справяне с нарастващата заплаха за общественото здраве в резултат на АМР, голяма част от научните публикации подкрепят фокусирането върху лечебните растения. Те са обещаващ източник на потенциални нови антибиотици за справяне с инфекции, причинени от резистентни бактериални патогени, тъй като голям процент от съществуващите фармацевтични продукти са с растителен произход.

Трета глава представя етеричните масла като полезен съюзник в борбата с патогените. Подчертана е ролята на традиционната медицина като важен елемент от здравните услуги по света. В някои страни тя има дълга история за поддържане на здравето, за профилактика и лечение на заболявания, особено хронични. Не случайно СЗО разработва стратегия за традиционната медицина, която цели държавите-членки да получат подкрепа в оползотворяване на потенциалния принос на традиционната медицина за здравето и стремеж към безопасно и ефективно прилагане на традиционната медицина, чрез

регулирането, изследването и интегрирането на традиционни медицински продукти. Понастоящем голям процент от световното население прилага традиционни лекарства на растителна основа за лечение на различни проблеми с човешкото здраве, включително и етерични масла.

Етеричните масла са сложни смеси от биоактивни съединения с ниско молекулно тегло, синтезирани от растенията, присъстващи в листата, стъблата, пъпки, семена, плодове, жлези и цветове. Летливите съединения, присъстващи в тях, имат различни ефекти, които включват антибактериално, противогъбично, инсектицидно, антивирусно действие, а също така могат да привличат определени насекоми и да ги защитават от неприятели. Свойствата на етеричните масла от всеки растителен вид са свързани с вторичните метаболити, произведени от растението, които включват химични съединения като терпени, фенилпропаноиди, алдехиди, естери, алкохоли и кетони. Най-голямата група са терпените и техните кислородни производни. Примери за монотерпени са лимонен, α -цимен, γ -терпинен, сабинен и β -мирцен. Терпеноидите са резултат от ензимни модификации на терпените и хидроксилни групи, и са отговорни за антимикробното действие. Като примери могат да се посочат карвакрол, тимол, ментол, α -терпинеол и гераниол. Химичният състав и концентрация на етеричните масла могат да варират между различните растителни видове и дори в рамките на един и същи вид, поради вариации във времето на прибиране на реколтата, климатични условия, части от растението, метод на извличане, сушене и съхранение.

Акцентът в **Трета глава** е върху доказаното антимикробно действие на етеричните масла, което понякога се свързва със синергизмът, който се наблюдава между отделните съставни компоненти. Освен това действията на няколко етерични масла могат да се комбинират с цел търсене на антагонистични, адитивни и синергични ефекти. Проблемът с АМР, разгледан в **Първа глава**, очертава ясно сериозния мащаб и рисковете за световното население, ако не се намерят надеждни и ефективни алтернативи. Една от тези алтернативи се крие именно в етеричните масла и техните доказани антибактериални, фунгицидни, антивирусни и антипротозойни свойства. Тези ефекти, както вече стана ясно се определят от сложния им химичен състав и различните механизми на действие спрямо патогените.

Подробно са описани механизмите на антибактериално и антимикотично действие на етеричните масла. Доказана е безспорната им актуалност като потенциални антимикробни агенти като са изложени данни за проведени изследвания с тях срещу различни патогени през последните 10 години.

Четвърта глава включва резултати от проведени собствени изследвания с различни етерични масла относно техния FTIR анализ и за оценка на антимикробния им потенциал. Проведени са серия от микробиологични експерименти и са приложени различни методи за доказване на тяхната антимикробна активност, както самостоятелно, така и в комбинация с други съединения, включително лекарства. Резултатите са оформени като отделни доклади, представяйки данните от проведените експерименти, информация за приложените методи и аналитични техники, както и дискусии свързани с получените резултати.

Анализът на етеричните масла изисква сложни и силно специфични техники за уточняване на състава и летливите компоненти. Газовата хроматография с масспектрална детекция (GC/MS) е основният и най-универсален аналитичен метод за качествено и количествено определяне на състава на тези сложни смеси. Тя е стандартна техника, използваща различни фази и размери на колоната за разделяне на компонентите, за пълното им охарактеризиране и дори тяхното изолиране чрез препаративни приложения. Приложими са и други аналитични методи като HPLC, NMR и др. Изпълнението на хроматографските методи е свързано със сложна пробоподготовка, осигуряване на стандартни субстанции и разтворители с висока степен на чистота. От друга страна етеричните масла са неполярни и не се смесват с вода и полярни разтворители. Това е предпоставка за възникване на затруднения при приложение на хроматографски методи за техния анализ.

Друга техника, която може да се приложи за идентификация и установяване автентичността на различни вещества е ИЧ спектроскопски анализ. Той е бърз метод, който не изисква сложна пробоподготовка и е лесен за работа. Инфрачервената спектроскопия с трансформация на Фурие (FTIR) придоби популярност като алтернатива на традиционните подходи, базирани на GC. Въпреки това могат да възникнат някои затруднения при нейното прилагане като метод за анализ на етерични масла и растителни екстракти. Например растителните екстракти и етерични масла са многокомпонентни смеси и получените инфрачервени спектри обикновено са доста сложни. Разтълкуването на ивиците може да

бъде трудна задача поради сложността на крайния спектър, тъй като всяка функционална група в една молекула допринася за него.

Отснети и анализирани са спектри на етерични масла от сем. *Lamiaceae*, *Zingiberaceae* и *Rutaceae*. Използвани са по три проби етерични масла от *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* и *Lavandula angustifolia* на три различни производителя. Изследвани са още четири етерични масла от представители на семейство *Zingiberaceae*-*Curcuma spp.*, *Zingiber officinalis* и *Rutaceae*-*Citrus limon*, *Citrus sinensis*. Всички етерични масла са закупени от търговската мрежа и са с 100% чистота. Спектрите на етеричните масла от риган на три различни производителя показват, че те са напълно идентични. Разлики се появяват в зоната на пръстовия отпечатък при етеричното масло на втория производител. Те най-вероятно се дължат на присъствието на допълнителни компоненти включително алифатни и ароматни въглеводороди, в това етерично масло, които липсват в останалите две проби. В спектрите на етерични масла от мащерка също се наблюдава идентичност на спектралните картини. Забелязва се ниско интензивна широка ивица при 1690 cm^{-1} в спектъра на етеричното масло на първия производител, която се асоциира с допълнителното присъствие на естери и карбоксилни киселини. В маслото от втория производител се забелязват малко по-интензивни ивици на някои от компонентите, което вероятно е свързано с тяхното количествено съдържание.

Спектрите на етерично масло от лавандула също напълно се припокриват. Наблюдава се една минимална разлика в спектъра на етеричното масло от третия производител. Налична е допълнителна ивица при 1050 cm^{-1} , която вероятно е свързана с присъствие на допълнителни алкенови производни.

Паралелно се доказват и общите за сем. *Lamiaceae* характеристични ивици, които присъстват в спектрите на съответните етерични масла. Следващият анализ отново е свързан с отнемането и сравняването на спектри на етерични масла от едно и също семейство и търсене на сходство между тях. Изследвани са две етерични масла от лимон и портокал от сем. *Rutaceae*, закупени от един и същ производител. Основните компоненти за двете проби са лимонен, α - и β -пинен, мирцен, терпинеол, сабинен. Наблюдава се изключително голям процент на сходство между сравнените спектри. Подобен е и резултатът в анализа на спектрите на етерични масла от сем. *Zingiberaceae*. Представените спектри са отново доста

идентични и съдържат характеристични абсорбционни сигнали, отговарящи на съединения, характерни за сем. *Zingiberaceae*. Абсорбционният сигнал в спектъра на етеричното масло от куркума при 1744 cm^{-1} отговаря на вибрациите на карбонилна група. Именно в интервала $1800\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ се наблюдава и първата разлика в двата спектъра. В етеричното масло от джинджирил в този район са регистрирани повече сигнали с преобладаващи сложно съставни ивици с нисък интензитет. Тези сигнали също се отнасят за присъстващи карбонилни производни. Сигналят при 1515 cm^{-1} и в двата спектъра свидетелства за присъствието на етерна група. На база на наблюдаваните спектри може да се каже, че двете етерични масла притежават белези, които са характерни за наличните в тях съединения.

В заключение може да се каже, че ATR-FTIR анализ на етерични масла е подходящ метод за установяване идентичността и принадлежността на етерични масла към различни или еднакви семейства. Ключовите спектрални ивици са определящи за наличните „спектрални отпечатьци“ на основните конституенти в етеричното масло.

Следващата част е свързана с представяне на резултати от изследване антимикробната активност на етерични масла от сем. *Lamiaceae*.

In vitro изследване на антимикробната активност на етерични масла от *Origanum vulgare* против *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Escherichia coli* ATCC 25922

Приложеният дисково-дифузионен метод за изследване на етерични масла от риган (за локална и перорална употреба) доказва, че те са ефективни в контрола на *S. aureus* ATCC 29213 и *E. coli* ATCC 25922. Двете използвани форми на етеричните масла от риган имат антибактериална активност срещу Грам-положителни бактерии като *S. aureus* - зони на инхибиране между 21 и 38 mm и срещу Грам-отрицателни бактерии като *E. coli*, със зони на инхибиране между 21 и 34 mm. Получените големи зони на инхибиране и при двете етерични масла от риган (локална и перорална употреба) са сравними дори с резултатите на конвенционални антибиотици, тествани по този метод.

Изследване на антимикробната активност на етерични масла от Thymus vulgaris с помощта на дисково-дифузионен метод

Получените резултати за антимикробната активност на етеричните масла от *Thymus vulgaris* (за локално приложение и перорална употреба) срещу *S. aureus* ATCC29213 и *E. coli* ATCC25922 чрез дисково-дифузионен метод доказват висока активност срещу тези

бактериални щамове. Отчетените зони на инхибиране срещу грам-положителната *S. aureus* са между 23 и 40 мм, а срещу грам-отрицателната *E. coli* между 20 и 38мм. Според получения резултат, етеричното масло от мащерка за перорална употреба има по-силен ефект срещу грам-положителния представител. Този резултат съвпада и с общо изградената хипотеза, че грам-положителните бактерии са по-чувствителни спрямо етеричните масла поради структурните особености на клетъчната си стена.

In vitro изследване на антимикробната активност на търговски продукти, съдържащи етерични масла от семейство *Lamiaceae* срещу *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia Coli* ATCC 25922 и *Candida albicans* ATCC 10231

Антимикробната активност на етеричните масла от мащерка и риган (две за локална и две за перорална употреба) е определена с помощта на метода на серийни двукратни разреждания. MIC на масло от мащерка (локална употреба) срещу *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* е съответно 8, 2 и 4 µg/ml. Маслото от мащерка за перорална употреба показва по-висока антимикробна активност от това за локална. То показва активност срещу *S.aureus*, *E. coli* и щамове *C. albicans* с най-добри резултати, с MIC вариращи от 2 до 1 µg/ml ($P<0,05$). В допълнение, маслото от мащерка (перорална употреба) инхибира растежа на трите анализирани щамове *S.aureus*, *E. coli* и *C. albicans* с MIC 2, 1 и 1 µg/ml.

Етеричното масло от риган (външна употреба) е активно срещу *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*, показващи съответно MIC от 1, 2 и 4 µg/ml. След определяне на MIC, от всяка епруветка с бистра суспензия се взема обем, равен на една бактериална бримка, и се прехвърля в кръвен агар за определяне на MBC. Наблюдаваното MBC за масло от мащерка (външна употреба) срещу *S. aureus* е 8 µg/ml, а срещу *E. coli* и *C. albicans* е съответно 2 и 8 µg/ml. Получените данни за MBC на масло от мащерка (вътрешна употреба) са както следва: 4 µg/ml за *S. aureus* и по-малко от 1 µg/ml за *E.coli* и *C. albicans* ($P<0,05$). При определяне на MBC на масло от риган (външна употреба) срещу *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*, антимикробната активност се отчита, както следва: 16 µg/ml срещу *S. aureus*, 4 µg/ml за *E.coli* и 32 µg/ml срещу *C. albicans*. Наблюдаваната антимикробна активност на маслото от риган за вътрешна употреба е по-висока от тази на външната – 2 µg/ml срещу *S. aureus* и по-ниска от 1 µg/ml за другите патогени. Получените данни за MBC на масла от риган (вътрешна и външна употреба) са статистически значими спрямо *S. aureus* и *C. albicans* ($P<0,01$).

Синергично взаимодействие между эфирными маслами из семейства Lamiaceae и антимикотическими препаратами против Candida albicans ATCC 10231

Целью исследования было оценить антимикотический эффект эфирных масел из мащерки и ригана против *C. albicans* ATCC 10231 и их потенциал для синергичных взаимодействий с часто используемыми противогрибковыми средствами – нистатином и флуконазолом. Первоначально определена минимальная ингибирующая концентрация для обоих антимикотиков, нистатина и флуконазола, как и эфирных масел из ригана и мащерки, в жидкой питательной среде. Для этой цели был применен метод серийного двукратного разведения в ВНТ бульоне. Определенная стоимость для МИС для флуконазола против *C. albicans* ATCC 10231 составляет 37,5 µg/mL, для МИС для нистатина – 16 µg/mL, а МИС для эфирного масла из *Thymus vulgaris* составляет 2 µg/mL. Масло из ригана также демонстрирует противогрибковую активность против *C. albicans* и стоимость для МИС составляет 4 µg/mL. После определения МИС, объем, равный одной петле (0,1 мл), был взят из каждой пробирки без видимого помутнения и перенесен на Сабуро для определения МВС. Наблюдаемые МВС против *C. albicans* ATCC 10231 для эфирных масел из мащерки и ригана составляют 4 µg/mL. Полученные результаты для обоих эфирных масел доказывают, что *C. albicans* демонстрирует высокую чувствительность к ним и они имеют потенциал для использования в терапевтической практике и некоторые из них вероятно в комбинации с другими антимикробными средствами.

Диффузионный метод Kirby-Bauer также был применен для оценки антимикробной активности флуконазола, нистатина и эфирных масел из ригана и мащерки против *C. albicans*. Антимикотические и эфирные масла были нанесены на 8 мм стерильные диски из фильтровальной бумаги для получения конечной концентрации 25 µg/mL для флуконазола/диск, 16 µg/mL для нистатина/диск и 32 µg/mL для обоих эфирных масел. Результаты показывают, что *C. albicans* ATCC 10231 чувствительна ко всем тестируемым проби. Зоны ингибирования для нистатина составили 20 ± 2 мм, для флуконазола – $21 \pm 0,89$ мм и для эфирных масел достигли до 40 ± 3 мм.

Синергичные взаимодействия между нистатином, флуконазолом и эфирными маслами определялись с помощью метода шахматной доски. Они показывают, что наблюдается синергичный эффект между флуконазолом и эфирным маслом из *Thymus vulgaris* в комбинации с 9,37 µg/mL антимикотика и соответственно 2 µg/mL эфирного масла (FIC индекс стоимости 0,49). В

комбинация с други концентрации на антимикробни агенти, ефектът е адитивен или интерферентен. MIC на етеричното масло от *Thymus vulgaris* срещу *C. albicans* ATCC 10231 е 8 µg/mL и MIC на флуконазол – 37,5 µg/mL. Флуконазолът не показва синергизъм с етерично масло от риган при всяка от комбинациите в различни концентрации (стойности на FIC индекс 0,75). MIC на флуконазол отново е 37,5 µg/mL и тази на етеричното масло от *Oregano* – 16 µg/mL. Получените резултати за нистатин и етерично масло от мащерка срещу *C. albicans*, са 2 µg/mL за нистатин и 2 µg/mL за етерично масло от *Thymus vulgaris*, като ефектът им на взаимодействие отново се определя като синергичен (стойности на FIC индекса 0,22). При другите концентрации ефектът е адитивен. MIC на етеричното масло от мащерка срещу *C. albicans* ATCC 10231 е отново 8 µg/mL и MIC на нистатин – 16 µg/mL. В комбинация от нистатин и етерично масло от риган също се наблюдава синергичен ефект, съответно 2 µg/mL за антимикотика и 2 µg/mL за етеричното масло от риган (стойности на FIC индекса 0,29).

Комбинация на етерични масла от Thymus vulgaris и Origanum vulgare с аскорбинова киселина

В проучването се оценява антимикробната активност на комбинациите на етерични масла от риган и мащерка с аскорбинова киселина срещу два микробни щама. На всеки етап от проведеното изследване получените резултати се сравняват с демонстрираното антимикробно действие на етеричните масла и аскорбинова киселина самостоятелно. Резултатите за определяне на MIC и впоследствие на MBC на комбинацията риган ЕМ–аскорбинова киселина показват активност при ниски концентрации на етеричното масло - MIC <0,035% (v/v) риган ЕМ+20 mg/mL аскорбинова киселина срещу двата изследвани щама. В допълнение, получените стойности са значително по-ниски от тези, при които чистото масло от риган проявява антимикробен ефект срещу изследваните щамове - MIC в диапазона 0,31-0,62% (v/v).

Мащерка ЕМ – комбинация с аскорбинова киселина демонстрира антибактериален ефект срещу *E. coli* и *S. aureus* с MIC, MBC <0,035% Thyme ЕМ + 20 mg/mL аскорбинова киселина. Срещу *E. coli* етеричното масло от мащерка демонстрира ефект при по-високи концентрации - 1.25% (v/v) (MIC=1.25% (v/v); MBC=1.25% (v/v)). Срещу *S. aureus* маслото от мащерка показва инхибиращи микробния растеж свойства с MIC от 0,62% (v/v) и 1,25%

(v/v), съответно. Стойностите на MBC са много по-високи за *S. aureus* –5% (v/v). т.е. стойностите на MBC са повече от 140 пъти по-ниски при прилагане на етерично масло от мащерка в различни концентрации с 20 mg/mL аскорбинова киселина в сравнение с прилагането на чисто етерично масло от мащерка.

При определянето на антимикробната активност чрез метода на разреждане на агар са изследвани антимикробните ефекти на чисти етерични масла от риган и мащерка, аскорбинова киселина и комбинациите ЕМ риган-аскорбинова киселина и ЕМ мащерка-аскорбинова киселина в концентрации на маслата в от 1%-5%/10 ml (v/v). Водните разтвори на аскорбиновата киселина варират от 0,1-2 mg/mL. В тази техника са използвани само по-високите концентрации за разлика от техниките за определяне на MIC, MBC, тъй като в 10 ml агарова среда разрежданията на маслата са по-големи от тези в предишните техники. В комбинацията ЕМ риган-аскорбинова киселина се наблюдава повишаване на антимикробната активност срещу *E. coli*. Етеричното масло от риган и аскорбиновата киселина самостоятелно не показват инхибиторна активност, но в комбинациите от 5% /10 ml (v/v) риган ЕМ и 4%/10 ml (v/v) риган ЕМ с 2 mg/ml аскорбинова киселина наблюдаваме пълно инхибиране на микробния растеж на *E. coli* (MBC= 0,4% ЕМ риган-2mg/mL аскорбинова киселина). При отчитане ефекта на риган ЕМ-аскорбинова киселина срещу *S. aureus*, се открива потенциал за антагонистично взаимодействие - с ЕМ от риган резултата за MBC е 4%/10 ml (v/v), с ЕМ риган-аскорбинова киселина – риган ЕМ 5%/10 ml (v/v) – аскорбинова киселина 2 mg/mL (фиг. 42, 43). Резултатите от антимикробната активност на ЕМ от мащерка срещу *E. coli* и *S. aureus* и ефектите на ЕМ в комбинация с аскорбинова киселина остават без промяна - MIC 5%/10 ml (v/v) и в двата вида проби.

Определяне на MIC и MBC на етерично масло от Lavandula angustifolia, Lamiaceae спрямо 7 патогенни щамове микроорганизми

Целта на изследването е да се анализира чувствителността и *in vitro* да се определи антимикробната активност на етерично масло от лавандула в различни концентрации спрямо 7 патогенни микроорганизми. Антимикробната активност на етеричното масло от лавандула е определена с помощта на метода на серийни двукратни разреждания. Следните щамове бактерии и дрожди са закупени и използвани в изследването: *E. coli* ATCC25922 (Gram-), *S. aureus* ATCC29213 (Gram+), *B. subtilis* ATCC6633 (Gram+), *K. pneumoniae*

ATCC13883 (Gram-), *P. aeruginosa* ATCC27853 (Gram-), *S. pyogenes* ATCC12384 (Gram+) и гъбичен *C. albicans* ATCC10231. Изследването стартира с начална концентрация от 10 % етерично масло, разтворено в DMSO(1%). Резултатите от докладваната антимикробна активност на етерично масло от лавандула срещу *E. coli* ATCC25922 (Gram-), *S. aureus* ATCC29213 (Gram+), *B. subtilis* ATCC6633 (Gram+), *K. pneumoniae* ATCC13883 (Gram-), *P. aeruginosa* ATCC27853 (Gram-), *S. pyogenes* ATCC12384 (Gram+) и гъбичен *C. albicans* чрез метод на серийните разреждания са представени в таблица 11. Маслото показва висока активност само срещу *E.coli* ATCC25922. Определените стойности за MIC и MBC са 0,31%. Известна активност се наблюдава и за *S. aureus* ATCC29213 (MIC=5%, MBC=10%), *K. pneumoniae* ATCC13883 (MIC=5%, MBC=10%), *S. pyogenes* ATCC12384 (MIC=5%, MBC=2,5%). Активността срещу *B. subtilis* ATCC6633 (MIC=10%, MBC=10%) и *P. aeruginosa* ATCC27853 (MIC=10%) се проявява само в най-високите концентрации на маслото. Гъбичният щам *C. albicans* ATCC10231 не е чувствителен на етерично масло от лавандула. Получените резултати показват, че изследваното етерично масло от лавандула притежава висока активност спрямо подбрания панел от човешки патогени.

Оценка на антимикробната активност на етерично масло от лавандула в комбинация с амониев хлорид

Изследването оценява антимикробния потенциал на комбинация от етерично масло и четвъртично амониено съединение спрямо шест бактериални и един гъбичен щам. Антимикробната активност на комбинацията между етеричното масло от лавандула и амониев хлорид е определена с помощта на метода на серийни двукратни разреждания. Следните щамове бактерии и дрожди са използвани в изследването: *E. coli* ATCC25922 (Gram-), *S. aureus* ATCC29213 (Gram+), *B. subtilis* ATCC6633 (Gram+), *K. pneumoniae* ATCC13883 (Gram-), *P. aeruginosa* ATCC27853 (Gram-), *S. pyogenes* ATCC12384 (Gram+) и гъбичен *C. albicans* ATCC10231. Изследването стартира с начална концентрация от 10 % етерично масло, разтворено в DMSO(1%) и 2% разтвор на амониев хлорид, приготвен със стерилна вода, чиято концентрация остава постоянна за всяка проба. Комбинацията показва по-ниска активност (MIC=MBC=5%) спрямо *E.coli* ATCC25922, отколкото чистото масло (MIC и MBC са 0,31%). Стойностите за MIC и MBC са се покачили приблизително 16 пъти. Такъв тип взаимодействие с определя като антагонизъм. При останалите патогени *K. pneumoniae* ATCC13883 (MIC=10%, MBC=10%), *S. pyogenes* ATCC12384 (MIC=5%,

MBC=5%). Активността срещу *B. subtilis* ATCC6633 (MIC=10%, MBC=10%) и *P. aeruginosa* ATCC27853 (MIC=10%/-) на чистото масло и комбинацията от етерично масло от лавандула+амониев хлорид се запазва без промяна. Ефектът може да се определи като индиферентен. При *S. aureus* ATCC29213 (MIC=5%, MBC=5%), MBC се понижава до 5%. Интересен момент е резултатът при гъбичния шам *C. albicans* ATCC10231, който не проявява чувствителност към чистото етерично масло, а е чувствителен на комбинацията етерично масло+амониев хлорид (MIC=MBC=10%). Този резултат дава посока за бъдещи изследвания на етеричното масло от лавандула в комбинация със структурно по-сложни четвъртични амониеви съединения спрямо различни гъбични щамове.

Етеричните масла притежават изключително широк спектър на антимикробна активност и са ценен ресурс в борбата с АМР поради богатия си химичен състав. Потенциалът им е значително изследван в миналото, но все още те са актуален източник и вариант за справяне с феномена АМР в световен мащаб.

Monograph Summary

The potential of natural compounds in the combat of AMR

Essential oils - a valuable ally in the fight against pathogens

The present work is devoted to the most relevant topic for the WHO, related to the growing global resistance to antibiotics, categorized by the WHO among the ten biggest threats to human health.

Chapter One of the monographic work examines the enormous importance of AMR for humanity at present. Antimicrobial drugs have undoubtedly revolutionized the treatment of infectious diseases and saved many lives. Human life expectancy has increased by an average of 23 years since the introduction of the first antibiotic in 1910. With success in the treatment of infectious diseases, the opportunities to perform various modern medical procedures, including surgical interventions, treatment of neoplastic diseases, organ transplantation, and others. However, the beneficial effect of antimicrobials is greatly compromised by the emergence of the antimicrobial resistance (AMR) phenomenon. It is defined as the ability of microorganisms to survive and be viable under the influence of antimicrobial agents. AMR is a consequence of natural selection and genetic mutations. However, to a large extent, many human factors are responsible for its

development, such as improper use of antimicrobials in human and veterinary medicine, poor hygiene conditions in health facilities or in the food chain, facilitating the transmission of resistant microorganisms. Over time, all this reduces therapeutic efficacy and effectiveness and ultimately renders antimicrobials useless. Some new modified strains reduce the chance of appropriate therapy for patients, causing profound consequences leading to disease mortality or clinical complications.

The relationship between Covid-19 and AMR has been addressed in light of the 2020 pandemic, which created an unprecedented scenario for treating suspected or confirmed bacterial infections with antibiotics.

Some of the global measures taken at the moment to deal with AMR, as well as specific action plans of global health, national, and public organizations for countermeasures, are also presented. Activities to address the problem and the search for alternatives are described, which are set out in the Global Action Plan (GAP) and the Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS), European One Health Action Plan. In addition to the One Health Approach, in 2015 the WHO launched an AMR-related management program known as the Global Action Plan Focused on AMR (GAP-AMR). This plan aims to ensure that infectious diseases can always be successfully treated and prevented by preserving antimicrobials responsibly with appropriate availability and quality controls. Attention is also drawn to the fact that a large number of studies shift the focus from human to more serious contributors to AMR coming from the use of antibiotics in livestock. The agricultural sector is not a passive participant in these measures and plays a proactive role in ensuring the responsible use of drugs in veterinary medicine by developing various antimicrobial stewardship programs. RUMA (Alliance for Responsible Use of Medicines in Agriculture) promotes innovative efforts to improve the responsible use of medicines while ensuring optimal animal health and welfare.

A review of data on AMR in Europe and Bulgaria was carried out. Currently, a report from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) announced in 2022 summarizes AMR data in Europe for the period 2017–2021. Twenty-nine countries in the European Union/European Economic Area (EU / EEA) reported cases of pathogens with antimicrobial resistance to the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) for 2021, based on data from invasive bacterial isolates (derived from blood or CSF). Twenty-eight countries

reported cases of all eight bacterial species monitored by EARS-Net (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter species*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*), while one country (Greece) reported data for all bacterial species except *S. pneumoniae*.

The basic causes and probable mechanisms for the development of resistance against medically important pathogens (bacteria, fungi) are also discussed in detail.

The last part of **Chapter One** is devoted to the main strategies applied in the fight against AMR. Most of them are aimed at modifications and improvements of old approaches, combinations of approaches, and inclusion of new resources that have not been used so far. The main emphasis is placed on natural compounds and phytotherapy. Natural products are a major source of new molecular entities for almost every disease. Historically, a large part of the antimicrobial agents known have a natural origin. The structural diversity and complexity they possess compared to synthetic classes is impressive. The World Health Organization (WHO) promotes the use of medicinal plants as a means of maintenance therapy in the absence of conventional treatment. Antimicrobial compounds isolated from medicinal plants (extracts, essential oils) can inhibit the growth of bacteria, fungi, viruses, and protozoa by mechanisms different from those of currently used antimicrobial agents and therefore may have significant clinical value in the treatment of resistant microbial strains. Some of these active compounds show both intrinsic antibacterial activity and antibiotic resistance-modifying properties, and others, although not effective as antibiotics on their own, when combined with antibiotics can help overcome antibiotic resistance in bacteria.

A **Chapter Two** is entirely devoted to natural antimicrobial compounds. Data proving the antimicrobial activity of various natural compounds based on world experience are presented in detail. Despite their structural diversity, they are classified as: alkaloids, acetylenes, iridoids, xanthenes, coumarins, lignans, macrolides, polypeptides, steroidal saponins, terpenoids, flavonoids, isoflavonoids, phenols, quinones. Their antimicrobial properties have been evaluated against heterogeneous microbial agents, which proves the potential of natural sources in the search for new anti-infective agents. In an effort to address the growing threat to public health resulting from AMR, much of the scientific literature supports the focus on medicinal plants. They are a

promising source of new potential antibiotics to tackle infections caused by resistant bacterial pathogens, as a large percentage of existing pharmaceuticals are of plant origin.

Chapter Three presents essential oils as a useful ally in the fight against pathogens. The role of traditional medicine as an important element of health services around the world is emphasized. In some countries, it has a long history of health maintenance, prevention, and treatment of diseases, especially chronic ones. It is no coincidence that the WHO is developing a strategy for traditional medicine, which aims to support member states in exploiting the potential contribution of traditional medicine to health and striving for safe and effective application of traditional medicine, through the regulation, research, and integration of traditional medicinal products. Currently, a large percentage of the world's population uses traditional plant-based medicines to treat various human health problems, including essential oils.

Essential oils are complex mixtures of low molecular weight bioactive compounds synthesized by plants, present in leaves, stems, buds, seeds, fruits, glands, and flowers. The volatile compounds present in them have various effects that include antibacterial, antifungal, insecticidal, antiviral and can also attract certain insects or protect them from enemies. The properties of essential oils of each plant species are related to the secondary metabolites produced by the plant, which include chemical compounds such as terpenes, phenylpropanoids, aldehydes, esters, alcohols, and ketones. The largest group of groups are terpenes and their oxygen derivatives. Examples of monoterpenes are limonene, p-cymene, γ -terpinene, sabinene, and β -myrcene. Terpenoids are the result of enzymatic modifications of terpenes and hydroxyl groups and are responsible for antimicrobial activity. Examples include carvacrol, thymol, menthol, α -terpineol and geraniol. The chemical composition and concentration of essential oils can vary between different plant species and even within the same species, due to variations in harvest time, climatic conditions, plant parts, method of extraction, drying, and storage.

The emphasis in **Chapter Three** is on the proven antimicrobial action of essential oils, which is sometimes associated with the synergism observed between the individual components. In addition, the actions of several essential oils can be combined in order to seek antagonistic, additive, and synergistic effects. The AMR problem discussed in **Chapter One** clearly outlines the serious scale and risks to the world's population if reliable and effective alternatives are not found. One of these alternatives lies precisely in essential oils and their proven antibacterial, fungicidal,

antiviral, and antiprotozoal properties. These effects, as has become clear, are determined by their complex chemical composition and different mechanisms of action against pathogens.

The mechanisms of antibacterial and antifungal action of essential oils are described in detail. Their indisputable relevance as potential antimicrobial agents has been proven by presenting data on research conducted with them against various pathogens over the last 10 years.

The **Chapter Fourth** includes results of the author's research with various essential oils regarding their FTIR analysis and evaluation of their antimicrobial potential. A series of microbiological experiments were conducted and various methods were applied to prove their antimicrobial activity, both alone and in combination with other compounds, including drugs. The results are presented as separate reports, which present data from the conducted experiments, information about the applied methods and analytical techniques, and discussions related to the obtained results.

The analysis of essential oils requires complex and highly specific techniques to determine the composition and volatile components. Gas chromatography with mass spectral detection (GC/MS) is the primary and most versatile analytical method for qualitative and quantitative determination of the composition of these complex mixtures. It is a standard technique that uses different phases and column sizes to separate components, fully characterize them, and even isolate them through preparative applications. Other analytical methods such as HPLC, NMR, etc. are also applicable. The performance of chromatographic methods is related to complex sample preparation, provision of standard substances, and solvents with a high degree of purity. However, essential oils are nonpolar and do not mix with water or polar solvents. This is a prerequisite for the emergence of difficulties in applying chromatographic methods for their analysis.

Another technique that can be used to identify and authenticate various substances is infrared (IR) spectroscopic analysis. It is a rapid method that does not require complex sample preparation and is easy to operate. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy has gained popularity as an alternative to traditional GC-based approaches. However, some difficulties may arise in its application as a method for the analysis of essential oils and plant extracts. For example, plant extracts and essential oils are multicomponent mixtures, and the resulting infrared spectra are usually quite complex. Interpreting the bands can be a difficult task because of the complexity of the final spectrum as each functional group in a molecule contributes to it.

Spectra of essential oils from the families *Lamiaceae*, *Zingiberaceae* and *Rutaceae* were taken and analyzed. Three samples of essential oils of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and *Lavandula angustifolia* were used from three different manufacturers. Four more essential oils from representatives of the *Zingiberaceae*-*Curcuma* spp., *Zingiber officinalis* and *Rutaceae*-*Citrus limon*, *Citrus sinensis*, were studied. All essential oils are purchased commercially and are 100% pure. The spectra of oregano essential oils from three different manufacturers show that they are completely identical. Differences appear in the fingerprint area of the second manufacturer's essential oil. These are most likely due to the presence of additional components, including aliphatic and aromatic hydrocarbons, in this essential oil, which are absent in the other two samples. The identity of spectral patterns was also observed in the spectra of essential oils of thyme. A low-intensity broad band at 1690 cm^{-1} is observed in the spectrum of the first producer's essential oil, which is associated with the additional presence of esters and carboxylic acids. In the oil from the second manufacturer, slightly more intense streaks of some of the components are noticeable, probably related to their quantitative content.

The spectra of the lavender essential oil also overlap completely. A minimal difference was observed in the spectrum of essential oil from the third manufacturer. An additional band at 1050 cm^{-1} is present, probably related to the presence of additional alkene derivatives.

At the same time, the author also demonstrates the characteristic stripes common to the *Lamiaceae* family, which are present in the spectra of relevant essential oils. The next analysis is again about taking and comparing spectra of essential oils from the same family and looking for similarity between them. Two essential oils of lemon and orange from the *Rutaceae* family, purchased from the same manufacturer, were investigated. The main components of both samples are limonene, α - and β -pinene, myrcene, terpineol, sabinene. An extremely high percentage of similarity between the spectra compared is observed. Similar is the result in the analysis of the spectra of essential oils of the *Zingiberaceae*. The spectra presented again are quite identical and contain characteristic absorption signals corresponding to compounds characteristic of the *Zingiberaceae* family. The absorption signal in the turmeric essential oil spectrum at 1744 cm^{-1} corresponds to the vibration of a carbonyl group. It is in the $1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ interval that the first difference in the two spectra is observed. In ginger essential oil, more signals with complex low-intensity bands predominating were registered in this region. These signals also refer to the carbonyl derivatives present. The signal at 1515 cm^{-1} in both spectra indicates the presence of an ether group. On the basis of the

observed spectra, it can be said that the two essential oils have marks that are characteristic of the compounds present in them.

In conclusion, it can be said that the ATR-FTIR analysis of essential oils is a suitable method for establishing the identity and belonging of essential oils to different or the same families. The key spectral bands define the available "spectral fingerprints" of the main constituents of the essential oil.

The next part is related to the presentation of results of a study of the antimicrobial activity of essential oils from the *Lamiaceae* family.

In vitro study of the antimicrobial activity of Origanum vulgare essential oils against Staphylococcus aureus ATCC 29213 and Escherichia coli ATCC 25922

The applied disc diffusion method for the study of essential oils of oregano (for topical and oral use) proved to be effective in the control of *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 25922. The two forms of oregano essential oils used have antibacterial activity against Gram-positive bacteria such as *S. aureus*, zones of inhibition between 21 and 38 mm, and against Gram-negative bacteria such as *E. coli*, with zones of inhibition between 21 and 34 mm. The large zones of inhibition obtained with both oregano essential oils (topical and oral use) were comparable even to the results of conventional antibiotics tested by this method.

Investigation of the antimicrobial activity of Thymus vulgaris essential oils using the disc diffusion method

The results obtained for the antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oils (for topical application and oral use) against *S. aureus* ATCC29213 and *E. coli* ATCC25922 by disc diffusion method show high activity against these bacterial strains. The reported zones of inhibition against Gram-positive *S. aureus* are between 23 and 40 mm and against Gram-negative *E. coli* between 20 and 38 mm. According to the result obtained, thyme essential oil for oral use has a stronger effect against the gram-positive representative. This result coincides with the general hypothesis that Gram-positive bacteria are more sensitive to essential oils because of the structural features of their cell wall.

In vitro study of the antimicrobial activity of commercial products containing essential oils of the Lamiaceae family against Staphylococcus aureus ATCC 29213, Escherichia Coli ATCC 25922 and Candida albicans ATCC 10231

The antimicrobial activity of the essential oils of thyme and oregano (two for topical use and two for oral use) was determined using the two-fold serial dilution method. The MIC of the thyme oil (topical use) against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* was 8, 2 and 4 µg/ml, respectively. Thyme oil for oral use shows higher antimicrobial activity than that for topical use. It showed activity against strains of *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* with the best results, with MIC ranging from 2 to 1 µg/ml ($P < 0.05$). Furthermore, thyme oil (oral use) inhibited the growth of the three analyzed strains *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* with MICs of 2, 1 and 1 µg/ml.

Essential oil of oregano (external use) is active against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, showing MICs of 1, 2 and 4 µg/ml, respectively. After determination of the MIC, a volume equal to one bacterial loop was taken from each tube of clear suspension and transferred to blood agar for determination of the MBC. The observed MBC for thyme oil (external use) vs. *S. aureus* is 8 µg/ml, and vs. *E. coli* and *C. albicans* was 2 and 8 µg/ml, respectively. The MBC data obtained for thyme oil (internal use) are as follows: 4 µg/ml for *S. aureus* and less than 1 µg/ml for *E. coli* and *C. albicans* ($P < 0.05$). In determining the MBC of oil of oregano (external use) versus *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, antimicrobial activity is reported as follows: 16 µg/ml against *S. aureus*, 4 µg/ml for *E. coli* and 32 µg/ml vs. *C. albicans*. The antimicrobial activity observed of the oregano oil for internal use is higher than that of external – 2 µg/ml against *S. aureus* and lower than 1 µg/ml for the other pathogens. MBC data obtained for oregano oils (internal and external use) were statistically significant against *S. aureus* and *C. albicans* ($P < 0.01$).

Synergistic interaction between essential oils of Lamiaceae and antifungal drugs against Candida albicans ATCC 10231

The purpose of the study was to evaluate the antifungal effect of essential oils of thyme and oregano against *C. albicans* ATCC 10231 and their potential for synergistic interactions with commonly used antifungal agents, nystatin and fluconazole. Initially, the minimum inhibitory concentration of the two antifungals nystatin and fluconazole was determined, as well as the essential oils of oregano and thyme, in a liquid culture medium. For this purpose, a serial two-fold dilution method in BNT broth was applied. The determined value for the MIC of fluconazole against *C. albicans*

ATCC 10231 was 37.5 µg/mL, for the MIC of nystatin was 16 µg/mL, and the MIC of *Thymus vulgaris* essential oil against was 2 µg/mL. Oregano oil also demonstrated antifungal activity against *C. albicans* and the MIC value was 4 µg/mL. After determining the MIC, a volume equal to one ounce (0.1 ml) was taken from each of the tubes without visible turbidity and transferred to a Saburo plate for determination of MBC. The MBC observed against *C. albicans* ATCC 10231 for thyme and oregano essential oils was 4 µg/mL. The reported results for the two essential oils prove that *C. albicans* shows high sensitivity to them and that they have the potential to be used in therapeutic practice and some of them possibly in combination with other antimicrobial agents.

The Kirby-Bauer disk diffusion method has also been applied to evaluate the antimicrobial activity of fluconazole, nystatin, and essential oils of oregano and thyme against *C. albicans*. Antifungals and essential oils were applied to 8 mm sterile filter paper discs to obtain a final concentration of 25 µg/mL for fluconazole/disc, 16 µg/mL for nystatin/disc, and 32 µg/mL for both essential oils. The results showed that *C. albicans* ATCC 10231 was susceptible to all tested samples. The inhibiting zones for nystatin were 20 ± 2 mm, for fluconazole were 21 ± 0.89 mm and for essential oils reached 40 ± 3 mm.

Synergistic interactions between nystatin, fluconazole, and essential oils were determined by the checkerboard method. They showed that a synergistic effect was observed between fluconazole and *Thymus vulgaris* essential oil in combination with 9.37 µg/mL antifungal and 2 µg/mL essential oil, respectively (FIC index values 0.49). In combination with other concentrations of antimicrobial agents, the effect is additive or interferent. The MIC of *Thymus vulgaris* essential oil against *C. albicans* ATCC 10231 was 8 µg/mL and the MIC of fluconazole was 37.5 µg/mL. Fluconazole did not show synergism with oregano essential oil in any of the combinations at different concentrations (FIC index values 0.75). The MIC of fluconazole was again 37.5 µg/mL and that of the essential oil of oregano was 16 µg/mL. The results obtained for nystatin and thyme essential oil against *C. albicans* were 2 µg/mL for nystatin and 2 µg/mL for *Thymus vulgaris* essential oil, and its interaction effect was again determined to be synergistic (FIC index values 0, 22). At other concentrations, the effect is additive. The MIC of the essential oil of thyme against *C. albicans* ATCC 10231 was again 8 µg/mL and the MIC of nystatin was 16 µg/mL. A synergistic effect was also observed in the combination of nystatin and oregano essential oil, 2 µg/mL for antifungal and 2 µg/mL for oregano essential oil, respectively (FIC index values 0.29).

A combination of essential oils of Thymus vulgaris and Origanum vulgare with ascorbic acid

The study evaluated the antimicrobial activity of combinations of oregano and thyme essential oils with ascorbic acid against two microbial strains. At each stage of the research conducted, the results obtained are compared with the demonstrated antimicrobial action of essential oils and ascorbic acid alone. The results for determining the MIC and subsequently the MBC of the oregano EO - ascorbic acid combination showed activity at low concentrations of essential oil - MIC <0.035% (v/v) oregano EO + 20 mg / ml of ascorbic acid against the two strains tested. Furthermore, the values obtained were significantly lower than those in which pure oregano oil exhibited an antimicrobial effect against the tested strains, MIC in the range 0.31-0.62% (v/v).

Thyme EO - in combination with ascorbic acid demonstrated an antibacterial effect against *E. coli* and *S. aureus* with MIC, MBC <0.035% Thyme EO + 20 mg/mL ascorbic acid. Against *E. coli*, thyme essential oil demonstrated an effect at higher concentrations - 1.25% (v/v) (MIC=1.25% (v/v); MBC=1.25% (v/v)). Against *S. aureus*, thyme oil showed microbial growth inhibitory properties with MIC of 0.62% (v/v) and 1.25% (v/v), respectively. MBC values were much higher for *S. aureus* –5% (v/v). i.e., the MBC values were more than 140 times lower when thyme essential oil was applied at different concentrations with 20 mg/mL ascorbic acid compared to the application of pure thyme essential oil.

In the determination of antimicrobial activity using the agar dilution method, the antimicrobial effects of pure essential oils of oregano and thyme, ascorbic acid and the combinations of oregano EO-ascorbic acid and thyme EO -ascorbic acid were investigated in EOs concentrations of 1% to 5% / 10 ml (v/v). Aqueous solutions of ascorbic acid range from 0.1-2 mg / ml. In this technique, only the higher concentrations were used, in contrast to the MIC, MBC determination techniques, because in 10 ml of agar medium, the EOs dilutions were higher than in the previous techniques. In the combination of oregano EO-ascorbic acid, an increase in antimicrobial activity was observed against *E. coli*. Oregano essential oil and ascorbic acid alone did not show inhibitory activity, but in combinations of 5%/10 ml (v/v) oregano EO and 4%/10 ml (v/v) oregano EO with 2 mg / ml of ascorbic acid, we observed complete inhibition of *E.coli* microbial growth (MBC = 0.4% Oregano EO -2mg / ml of ascorbic acid). When considering the effect of oregano EO-ascorbic acid against *S. aureus*, a potential antagonistic interaction is detected - with oregano EO the MBC result is 4%/10 ml (v/v), with oregano-ascorbic acid EO - oregano EO 5 %/10 ml (v/v) – ascorbic acid 2

mg/mL (Fig. 42, 43). The results of the antimicrobial activity of thyme EO against *E. coli* and *S. aureus* and the effects of EO in combination with ascorbic acid remained unchanged, MIC 5%/10 ml (v/v) in both types of samples.

Determination of the MIC and MBC of essential oil of Lavandula angustifolia, Lamiaceae against 7 pathogenic strains of microorganisms

The aim of the study was to analyze the sensitivity and in vitro to determine the antimicrobial activity of lavender essential oil in different concentrations against 7 pathogenic microorganisms. The antimicrobial activity of lavender essential oil was determined using the two-fold serial dilution method. The following bacteria and yeast strains were purchased and used in the study: *E. coli* ATCC25922 (Gram-), *S. aureus* ATCC29213 (Gram+), *B. subtilis* ATCC6633 (Gram+), *K. pneumoniae* ATCC13883 (Gram-), *P. aeruginosa* ATCC27853 (Gram-), *S. pyogenes* ATCC12384 (Gram+) and the fungus *C. albicans* ATCC10231. The study was started with an initial concentration of 10% essential oil dissolved in DMSO(1%). The results of the reported antimicrobial activity of lavender essential oil against *E. coli* ATCC25922 (Gram-), *S. aureus* ATCC29213 (Gram+), *B. subtilis* ATCC6633 (Gram+), *K. pneumoniae* ATCC13883 (Gram-), *P. aeruginosa* ATCC27853 (Gram-), *S. pyogenes* ATCC12384 (Gram+) and fungal *C. albicans* by serial dilution method are presented in Table 11. The oil showed high activity only against *E. coli* ATCC25922. The MIC and MBC values determined were 0.31%. Some activity was also observed for *S. aureus* ATCC29213 (MIC=5%, MBC=10%), *K. pneumoniae* ATCC13883 (MIC=5%, MBC=10%), *S. pyogenes* ATCC12384 (MIC=5%, MBC= 2.5%). Activity against *B. subtilis* ATCC6633 (MIC=10%, MBC=10%) and *P. aeruginosa* ATCC27853 (MIC=10%) occurred only at the highest concentrations of EO. The fungal strain *C. albicans* ATCC10231 was not sensitive to lavender essential oil. The results obtained show that the lavender essential oil tested has high activity against the selected panel of human pathogens.

Evaluation of the antimicrobial activity of lavender essential oil in combination with ammonium chloride

The study evaluated the antimicrobial potential of a combination of an essential oil and a quaternary ammonium compound against six bacterial and one fungal strain. The antimicrobial activity of the combination of lavender essential oil and ammonium chloride was determined using the two-fold serial dilution method. The following bacteria and yeast strains were used in the study: *E. coli*

ATCC25922 (Gram-), *S. aureus* ATCC29213 (Gram+), *B. subtilis* ATCC6633 (Gram+), *K. pneumoniae* ATCC13883 (Gram-), *P. aeruginosa* ATCC27853 (Gram -), *S. pyogenes* ATCC12384 (Gram+) and the fungus *C. albicans* ATCC10231. The study started with an initial concentration of 10% essential oil dissolved in DMSO(1%) and 2% ammonium chloride solution prepared with sterile water, the concentration of which remained constant for each sample. The combination showed lower activity (MIC=MBC=5%) against *E.coli* ATCC25922 than pure oil (MIC and MBC were 0.31%). The MIC and MBC values have increased approximately 16 times. This type of interaction is defined as antagonism. For the remaining pathogens, *K. pneumoniae* ATCC13883 (MIC=10%, MBC=10%), *S. pyogenes* ATCC12384 (MIC=5%, MBC=5%). The activity against *B. subtilis* ATCC6633 (MIC=10%, MBC=10%) and *P. aeruginosa* ATCC27853 (MIC=10%/-) of the pure oil and the combination of essential oil lavender + ammonium chloride remained unchanged. The effect can be defined as indifferent. In *S. aureus* ATCC29213 (MIC = 5%, MBC = 5%), MBC decreased to 5%. An interesting point is the result of the fungal strain *C. albicans* ATCC10231, which does not show sensitivity to pure essential oil, but is sensitive to the combination of essential oil + ammonium chloride (MIC=MBC=10%). This result provides direction for future studies of lavender essential oil in combination with structurally more complex quaternary ammonium compounds against different fungal strains.

Essential oils possess an extremely broad spectrum of antimicrobial activity and are a valuable resource in the fight against AMR due to their rich chemical composition. Their potential has been significantly explored in the past, but they are still a current source and option to address the AMR phenomenon worldwide.

Критерий Г.7. Публикации и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science, Scopus)

Г.7.1. Силвия Стамова, Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, Светлана Георгиева. Потенциална антимикробна активност на нови производни на метронидазол срещу патогенни клинични изолати. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB*; 77-79, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

Настоящото проучване има за цел да изследва потенциалната антимикробна активност на нови производни на метронидазол срещу клинични изолати на *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Общо шест различни концентрации (6,25-200 µg/ml) на две новосинтезирани метронидазолови производни (MTD1 и MTD2) са тествани чрез дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer върху агар Mueller-Hinton. Изборът на разтворители беше много прецизен според разтворимостта на новите съединения. Затова са използвани и следните разтворители: NaCl 0,9%, фосфатен буфер pH 7,2, метанол и етанол. Разтворите на метанол и етанол на производните на метронидазола показват антимикробна активност срещу *S. aureus* и *C. albicans*. Производни MTD1 (Етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил) ацетамид) бензоат и MTD2 (бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1-имидазол-1-ил) ацетамид) бензоат в концентрации 100 µg / ml и повече, демонстрират зони на инхибиране от 12-14 mm срещу *S. aureus* и *Candida albicans*. За всяка проба в NaCl 0,9% и фосфатен буфер не беше открита антимикробна активност повече от контролите. Тестваните производни не показват антибактериална активност срещу щамове *E.coli* и *B. subtilis*.

Sylvia Stamova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Svetlana Georgieva. Potential antimicrobial activity of new metronidazole derivatives against pathogenic clinical isolates. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB*; 77-79, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

The present study aims to investigate potential antimicrobial activity of new metronidazole derivatives against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. A total of six different concentrations (6.25-200 µg/ml) of two newly synthesized metronidazole derivatives (MTD1 and MTD2) were tested by disc diffusion method of Kirby-Bauer on Mueller-Hinton agar. The selection of solvents was very precisely according to solubility of new compounds. Therefore, we have used the following solvents: NaCl 0.9%, Phosphate buffer pH 7.2, methanol and ethanol. The methanol and ethanol solutions of metronidazole derivatives showed antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans*. Derivatives MTD1 (Ethyl 4-(2-(2-methyl-5- nitro-1H- imidazol-1-yl) acetamide) benzoate and

MTD2 (Butyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1Himidazol-1-yl) acetamide) benzoate (concentrations 100 µg / ml and more) demonstrated inhibition zones of 12-14 mm, both against *S. aureus* and *Candida albicans*. For each sample in NaCl 0,9% and Phosphate buffer there was not detected antimicrobial activity more than the controls. The tested derivatives did not show antibacterial activity against *E.coli* and *B. subtilis* strains.

Г.7.2. Силвия Стамова, Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, Светлана Георгиева. Микробиологична оценка на нови производни на метронидазола. *J of IMAB, SUPPLEMENT 12 SEEC & 32 IMAB*; 42-45, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2022Supplement1>

Процесът на разработване и търсене на нови антимикробни лекарства включва глобални изследователски усилия. Целта на настоящата научна работа е да се оценят антимикробните свойства на две нови производни на метронидазол срещу анаеробен референтен щам *Bacteroides fragilis* ATCC25285. В изследването са приложени методи със серийни разреждания в бульон или агар. Резултатите определиха новите амидни производни като мощни антибактериални средства срещу *Bacteroides fragilis* ATCC25285 в сравнение с изходния метронидазол.

Sylvia Stamova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Svetlana Georgieva. Microbiologic evaluation of novel metronidazole derivatives. *J of IMAB, SUPPLEMENT 12 SEEC & 32 IMAB*; 42-45, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2022Supplement1>

The development process of searching for new antimicrobial drugs includes global research efforts. The aim of the present scientific work is to evaluate antimicrobial properties of two new metronidazole derivatives against anaerobic referent strain *Bacteroides fragilis* ATCC25285. In the study are applied agar agar and broth dilution assays. The results identified the novel amide derivatives as more potent antibacterial against *Bacteroides fragilis* ATCC25285 in compared to the parent metronidazole.

Г.7.3. Силвия Стамова, Светлана Георгиева, Мая Георгиева, Явор Митков, Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева. Синтез и характеристика на нови производни на метронидазола. *J of IMAB, SUPPLEMENT 12 SEEC & 32 IMAB*; 89-91, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2022Supplement1>

Антимикробните агенти са открити преди повече от 100 години. Борбата с бактериалните агенти обаче продължава и в момента. Процесът на разработване и търсене на нови антимикробни лекарства включва глобални изследователски усилия. Целта на настоящата научна работа е да се синтезират и структурно охарактеризират две нови амидни производни на метронидазол. Синтезната процедура включва два етапа. Първият етап постигна окислението на алкохолната група в структурата на изходния метронидазол до съответната карбоксилна киселина. Във вторият етап успешно е извършено амидиране на карбоксилната киселина с партньорите амини в присъствие на кондензиращ агент. Химичните структури на новите съединения са потвърдени от приложените FT IR, ^1H NMR и ^{13}C NMR аналитични техники.

Sylvia Stamova, Svetlana Georgieva, Maya Georgieva, Javor Mitkov, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva. Synthesis and characterization of new metronidazole derivatives. *J of IMAB, SUPPLEMENT 12 SEEC & 32 IMAB*; 89-91, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2022Supplement1>

Antimicrobial agents were discovered more than 100 years ago. However, the fight against bacterial agents is ongoing at the moment. The development process for the search for new antimicrobial drugs involves a global research effort. The aim of the present scientific work is to synthesize and structurally characterize two new amide derivatives of metronidazole. The synthesis procedure involves two steps. The first step achieved the oxidation of the alcohol group in the parent metronidazole structure to the corresponding carboxylic acid. In the second step, amidation of the carboxylic acid with the partner amines in the presence of a condensing agent was successfully carried out. The chemical structures of the new compounds were confirmed by applied FT IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR analytical techniques.

Г.7.4. Силвия Стамова, Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, Габриела Цанкова. Микробиологична оценка на фермерски млечни продукти. *J of IMAB, SUPPLEMENT 12 SEEC & 32 IMAB*; 34-37, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2022Supplement1>

Въведение: Млякото и млечните продукти са богати на хранителни вещества, осигуряващи висококачествени протеини, микроелементи, витамини и богати на енергия мазнини. В същото време този разнообразен състав на млякото осигурява идеална среда за растеж на различни хранителни микроорганизми и зоонози.

Цел: Целта на това проучване е да се направи литературен преглед относно микробиологичния контрол при приготвянето на фермерско сирене в зоната на Европейски съюз.

Материали и методи: Обобщена е информацията от световни литературни източници за производството и микробиологичната оценка на фермерско сирене в Европейския съюз.

Резултати: Млечнокиселите бактерии (LAB) са неразделна част от състава на повечето млечни продукти. Те са разнородна група от микроорганизми, включително щамове от рода *Lactobacillus*. Закваска от мезофилни млечнокисели бактерии култури, както и нестартерни LAB, включително различни *Lactobacillus spp.* се откриват в повечето проби. Споменатите проучвания са насочени към търсене на най-често срещаните патогени, открити във фермерските млечни продукти като *S. aureus*, *L. monocytogenes* и *E. coli*.

Заклучение: Този преглед подчертава факта, че занаятчийските и фермерските сирена са свързани с различна микробиота и микроби. По-голямата част от традиционните проби от сирене, описани в тази статия отговарят на микробиологичните изисквания и критерии за безопасност на храните.

Sylvia Stamova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Gabriela Tsankova. Microbiological evaluation of artisanal milk products. *J of IMAB, SUPPLEMENT 12 SEEC & 32 IMAB*; 34-37, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2022Supplement1>

Introduction: In general, milk and milk products are rich in nutrients, supplying high-quality proteins, trace elements, vitamins, and energy-rich fats. At the same time, this diverse composition

of milk provides an ideal environment for the growth of various food-borne microorganisms and zoonotic agents.

Aim: The aim of this study is to give an overview of artisanal cheese production and its microbiology control in the European Union.

Materials and methods: We summarize sources of world literature data about artisanal and farmhouse cheese microbiological evaluation in European Union.

Results: Lactic acid bacteria (LAB) are an integral part of the composition of most dairy products. They are a heterogeneous group of microorganisms including strains of the genus *Lactobacillus*. The mesophilic lactic acid bacteria starter cultures as well as non-starter LAB including different *Lactobacillus spp.* are detected in the most samples. The mentioned studies are aimed at searching for the most common pathogens found in artisanal dairy products such as *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*.

Conclusion: This review highlights the fact that artisanal and farmstead cheese products are associated with various microbiota and microbial. The majority of the traditional cheese samples in this paper complied with the microbiological criteria notifications on food safety.

Г.7.5. Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, Силвия Михайлова, **Силвия Стамова**, Красимира Лалева, Габриела Цанкова, Антоанета Цветкова. Синергично взаимодействие между етерични масла на представители от сем. *Lamiaceae* и противогъбични лекарства срещу *Candida albicans* ATCC 10231. *FARMACIA*, Vol. 70, 4, 2022.

DOI: [10.31925/farmacia.2022.4.18](https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.4.18)

Няколко вида *Candida* са част от нормалната човешка микробиота. Една от основните характеристики на *Candida* е способността ѝ да образува биофилми с висока лекарствена толерантност в човешкия гостоприемник. Противогъбичните терапевтични възможности все още са ограничени само до няколко класа лекарства, нито един от които не отговаря на всички желани очаквания. Системните инфекции с *Candida* демонстрират предимствата на комбинираните терапии, провеждани с комбинации от поне две различни противогъбични лекарства и/или комбинации с естествени противогъбични средства като етерични масла (ЕМ), пептидни молекули и т.н. В тази работа ние оценихме противогъбичния ефект на етерични масла от мащерка и риган срещу *C. albicans* ATCC10231 и техните потенциални

синергични взаимодействия с често използвани противогъбични средства – нистатин и флуконазол. Синергичните взаимодействия между нистатин и флуконазол и ЕМ са определени чрез метода на шахматната дъска-микротитърен анализ. Резултатите от проучването показват, че флуконазол има синергичен ефект с *Thymus vulgaris* ЕМ в комбинация съответно с 9,37 µg/mL противогъбично лекарство и 2 µg/mL етерично масло (стойности на FIC индекс 0,49). В комбинация с други концентрации на антимикробни агенти, ефектът е адитивен или интерфериращ. Флуконазол не показва синергично взаимодействие с ЕМ от риган при нито една от комбинациите в различни концентрации на антимикробни средства (стойности на FIC индекс 0,75). MIC на флуконазол отново е отчетен като 37,5 µg/mL, а този на риган ЕМ - 16 µg/mL. Нашите резултати доказват проява на синергично взаимодействие между ЕМ от риган и нистатин, ЕМ от мащерка и нистатин и между флуконазол и ЕМ от *Thymus vulgaris*.

Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Silviya Mihaylova, **Sylvia Stamova**, Krasimira Laleva, Gabriela Tsankova, Antoaneta Tsvetkova. Synergistic interaction between *Lamiaceae* essential oils and antifungal drugs against *Candida albicans* ATCC 10231. *FARMACIA*, Vol. 70, 4, 2022.

DOI: [10.31925/farmacia.2022.4.18](https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.4.18)

Several *Candida* species are part of the normal human microbiota. One of the main characteristics of *Candida* is its ability to form highly drug tolerance biofilms in the human host. The antifungal therapeutic options are still limited to only a few drug classes, none of which fulfils all desired expectations. Systemic *Candida* infections demonstrate the advantages of combined therapies carried out with combinations of at least two different antifungal drugs, or/and combinations with natural antifungal agents such as essential oils (EOs), peptide molecules etc. In this work we evaluated the antifungal effect of thyme and oregano essential oils against *C. albicans* ATCC10231 and their potential synergistic interactions with frequently used antifungal agents – nystatin and fluconazole. Synergic interactions between nystatin and fluconazole and EOs were determined by the checkerboard microtiter assay. The results of the study showed that fluconazole has a synergistic effect with *Thymus vulgaris* EO in combination with 9.37 µg/mL antifungal and 2 µg/mL essential oil, respectively (FIC index values 0.49). In combination with other concentrations

of antimicrobial agents, the effect is additive or interfering. Fluconazole did not show a synergistic interaction with oregano EO at any of the combinations in different concentrations of antimicrobial agents (FIC index values 0.75). The MIC of fluconazole was again reported as 37.5 µg/mL and that of oregano EO - 16 µg/mL. Our findings showed an experimental occurrence of a synergistic interaction between and oregano EO and nystatin, thyme EO and nystatin and between fluconazole and *Thymus vulgaris* EO.

Г.7.6. Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, Габриела Цанкова, Гергана Неделчева, Красимира Лалева, **Силвия Стамова**, Тодорка Костадинова. Лиофилизирани *Escherichia coli* щамове, съхранявани между 40-50 години: морфологична, серотипна, биохимична характеристика и лекарствена чувствителност. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 37(1):309-316, 2023. DOI: [10.1080/13102818.2023.2191737](https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2191737)

Бактериалните култури обикновено се съхраняват за дълги периоди от време чрез лиофилизация. Лиофилизираните бактерии обикновено запазват жизнеспособността си от 5 до 35 години. Изследвана е жизнеността и запазването на някои от характерните морфологични, серотипни и биохимични характеристики на 14 щама *Escherichia coli* след лиофилизирано съхранение за повече от 40–50 години. Оценена е и тяхната чувствителност към конвенционалните антибиотици, използвани при лечението на инфекции, причинени от представители на *Enterobacteriaceae*. В нашето изследване са използвани 14 щама на *E. coli*, свързани с 11 серологични типа – O1, O2 (два щам), O5, O7, O11, O20, O25, O26, O29, O111 (два щам) и O125 (два щам). Лиофилизираните ампули от микроорганизми са произведени в периода 1971 – 1973 г. и са съхранявани при 4 °C в микробна колекция за учебни цели към Медицински колеж – Варна, България. Контролните щамове бяха *E. coli* ATCC25922, щам *E. coli* (използван за образователни цели) и три клинични изолата на *E. coli* от урина и секрети от рани. Щамовете *E. coli*, съхранявани в продължение на 40–50 години, са запазили изследваните морфологични и биохимични характеристики, както и тези, свързани с техните антигенни характеристики и антибиотична чувствителност. Тяхната чувствителност към тестваните антимикробни средства е аналогична на контролния референтен щам *E. coli* ATCC25922, което показва, че въпреки дългото време на съхранение,

всички щамове запазват и демонстрират типичните морфологични, серотипни и биохимични характеристики на вида.

Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Gabriela Tsankova, Gergana Nedelcheva, Krasimira Laleva, **Sylvia Stamova**, Todorka Kostadinova. Lyophilized *Escherichia coli* strains stored for 40–50 years: morphological, serotypic, biochemical characteristics and drug sensitivity. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 37(1):309-316, 2023.

DOI: [10.1080/13102818.2023.2191737](https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2191737)

Bacterial cultures are commonly preserved for long periods of time *via* freeze-drying (lyophilization). Lyophilized bacteria typically retain viability from 5 to 35 years. We investigated the vitality and preservation of some of the characteristic morphological, serotypic and biochemical features of 14 *Escherichia coli* strains following lyophilized storage for over 40–50 years. We also investigated their susceptibility to conventional antibiotics used in the therapy of infections caused by *Enterobacteriaceae* representatives. In our study, 14 strains of *E. coli* related to 11 serological types – O1, O2 (two strains), O5, O7, O11, O20, O25, O26, O29, O111 (two strains) and O125 (two strains) – were used. The lyophilized microorganism ampules were produced in the period of 1971 to 1973 and were stored at 4 °C in a microbial collection for educational purposes at the Medical College – Varna, Bulgaria. Control strains were *E. coli* ATCC25922, an *E. coli* strain (used for educational purposes) and three clinical *E. coli* isolates from urine and wound secretions. The *E. coli* strains stored for 40–50 years had preserved the studied morphological and biochemical characteristics, as well as those related to their antigenic characteristics and antibiotic sensitivity. Their susceptibility to the tested antimicrobials was analogical to the control reference strain *E. coli* ATCC25922, indicating that despite the long storage time, all strains retained and demonstrated the typical morphological, serotypic and biochemical characteristics of the species.

Г.7.7. Надя Агова, Светлана Георгиева, Станила Стоева, **Силвия Стамова**, Явор Митков. HPLC метод за анализ на нови съединения-аналози на антинеопластично лекарство. *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 52, Issue A (pp. 09-16) 2020.
DOI: [10.34049/bcc.52.A.271](https://doi.org/10.34049/bcc.52.A.271)

През последното десетилетие се наблюдава значително нарастване на научните познания в областта на онкологията. По този начин се увеличава и интересът към откриване на нови лекарства и терапевтични подходи с потенциал в онкологията. Наскоро, група синтетични ретиноиди е използвана в онкологията. Трето поколение ретиноид- Вехаротене се използва при лечението на различни видове карциноми, например кожен Т-клетъчен лимфом, рак на гърдата, напреднал рак на белия дроб, сарком на Капоши, рак на простатата и други. В литературата анализите на бексаротен включват тънкослойна хроматография. Освен това газова хроматография с масспектрална детекция е използвана за определяне на съединението и неговите метаболити. В предходна работа, ние синтезирахме структурен аналог на Вехаротене. Целта на настоящата работа е да опише създаването и валидиране на HPLC метод за анализ на новото съединение.

Nadya Agova, Svetlana Georgieva, Stanila Stoeva, **Sylvia Stamova**, Javor Mitkov. HPLC method for analyzing new compounds – analogs of an antineoplastic drug. *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 52, Issue A (pp. 09-16) 2020.

DOI: [10.34049/bcc.52.A.271](https://doi.org/10.34049/bcc.52.A.271)

Over the past decade, there has been a significant scientific knowledge increment in the field of oncology. Thus, the interest in discovering of new drugs and therapeutic approaches with a potential in oncology has risen. Recently, the group of synthetic retinoids is used in oncology. The third generation retinoid Bexarotene is used in the treatment of various types of cancer, for instance cutaneous T-cell lymphoma, breast cancer, advanced lung cancer, Kaposi sarcoma, prostate cancer, and other. In literature, analyses of Bexarotene include thin-layer chromatography. Moreover, gas chromatography-mass spectrometry has been used to determine the compound and its metabolites. In our previous work, we synthesized a structural analog of Bexarotene. The purpose of the present work is to describe the development and validation of a HPLC method for the analysis of the new compound.

Г.7.8. Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, **Силвия Стамова**, Габриела Цанкова, Силвия Михайлова. Доказване на антимикробната активност на търговски продукти с етерично масло от *Thymus vulgaris*. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB*; 87-78, 2021.

Етеричните масла са летливи, природни, сложни съединения, известни със силния си аромат и различни лечебни свойства. Използват се като антимикробни, обезболяващи, седативни, противовъзпалителни, спазмолитични средства и като локални анестетици. Целта на проучването е да се оцени потенциалното антимикробно действие на два продукта (за външна и вътрешна употреба), съдържащи етерични масла от *Thymus vulgaris* срещу *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Изследването се проведе в Медицински колеж – Варна, България. Установена е антимикробната активност на етеричните масла от мащерка чрез използване на дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer. Наблюдава се инхибиращ ефект с диаметър над 20 mm за зоните на инхибиране. Резултатите показват, че тестваните етерични масла от *Thymus vulgaris* притежават силни антимикробни свойства и може в бъдеще да представляват нов източник на природни антисептици с приложение във фармацевтичната индустрия.

Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, **Sylvia Stamova**, Gabriela Tsankova, Silviya Mihaylova, Antoaneta Tsvetkova. Investigation of antimicrobial activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris*. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB*; 87-78, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

Essential oils are volatile, natural, complex compounds known for their strong odor and different medicative properties. They are used as antimicrobial, analgesic, sedative, anti-inflammatory, spasmolytic, and locally anesthetic agents. The aim of this study is to evaluate the potential antimicrobial activity of two (for external and internal use) commercial essential oils of *Thymus vulgaris* against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The study was conducted in Medical College – Varna, Bulgaria. The antimicrobial activity of thyme essential oils was determined using the Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test. This inhibitory effect was observed by the diameters above 20 mm of the zones of inhibition. The results demonstrate that the *Thymus vulgaris* essential oils tested possess strong antimicrobial properties and may in the future represent a new source of natural antiseptics with applications in the pharmaceutical industry.

Г.7.9. Антоанета Цветкова, Силвия Михайлова, **Силвия Стамова**, Светлана Радева. Превенция на женското здраве- трансвагинална ултрасонография- пилотно проучване. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB*; 61-63, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

Една четвърт от глобалните случаи на онкологични заболявания са в Европа, въпреки че нейното население е по-малко от 10% от световно население. Общото икономическо отражение на онкологичните заболявания в Европа възлиза на 100 милиарда евро годишно и 40% от случаите на тумори са предотвратими. Гинекологичен трансвагинален ултразвуков преглед за ранно откриването на гинекологични заболявания е проведен сред 1800 жени между 2017 и 2020 г. във Варна, Североизточен регион на България. Сред прегледаните 1800 жени при 527 са открити патологични находки, като най-голям е дялът на жените с миома на матката, последвани от ендометриални полипи, тумори в малкия таз и яйчниците. Най-засегнатата група са жените между 35 и 55 години, като пиковата възраст е 45-55 години.

Antoaneta Tsvetkova, Silviya Mihaylova, **Sylvia Stamova**, Svetlana Radeva. Preventive healthcare for women – transvaginal ultrasonography – a pilot study. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB*; 61-63, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

A quarter of the global cases of cancer are in Europe although its population is less than 10 % of the world population. The overall economic impact of cancer in Europe amounts to €100 billion annually and 40% of cancer cases are preventable. “Gynaecological transvaginal ultrasound examination for early detection of gynaecological conditions was conducted among 1800 women between 2017 and 2020 located in Varna in the North East Region of Bulgaria. Among the examined 1800 women, 527 pathological findings were detected where the largest share was that of women with uterine fibroids, followed by endometrial polyps, pelvic and ovarian tumours. The most affected group were women between 35 and 55, the peak age being 45-55.

Г.7.10. Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева, **Силвия Стамова**, Светлана Георгиева, Силвия Михайлова. Two alternative methods for anaerobic cultivation of *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 compared to the efficiency of cultivation in a gas pack system. *J of IMAB. Oct-Dec; 27(4): 4035-4037, 2021. DOI: [10.5272/jimab.2021274](https://doi.org/10.5272/jimab.2021274)*

Култивирането на анаероби не е рутинна процедура. В повечето случаи се извършва в референтни лаборатории с помощта на специално оборудване, включително анаеробна камера или анаеробна Gas pack система. Има някои по-стари методи като така наречената система Candlejar и принципът на Fortner. Целта на изследването е да се сравнят два алтернативни метода за анаеробно култивиране на *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 с култивиране чрез система Gas Pack, която е широко използван и добре проучен метод. Извършено е анаеробно култивиране с помощта на системата GasPack, Candle jar и принципа Fortner. Бактериите са посяти в два различни вида агарови среди - подходящи за анаеробно култивиране- Wilkins-Chalgren агар и Mueller-Hinton агар, полезен за тестване за чувствителност към антибиотици. Резултатите от нашето проучване показват, че във всички бактериални култури *B. fragilis* ATCC 25285 демонстрира силен растеж. Установено е, че системата Candle jar и принципът на Fortner са чувствителна и рентабилна алтернатива, която може да се използва в структури с ограничени ресурси.

Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, **Sylvia Stamova**, Svetlana Georgieva, Silviya Mihaylova, Two alternative methods for anaerobic cultivation of *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 compared to the efficiency of cultivation in a gas pack system. *J of IMAB. Oct-Dec; 27(4): 4035-4037, 2021. DOI: [10.5272/jimab.2021274](https://doi.org/10.5272/jimab.2021274)*

Cultivation of anaerobes is not a routine procedure. In most cases, it is carried out in reference laboratories with the help of special equipment, including an anaerobic chamber or anaerobic jar with Gas pack system. There are some older methods so-called the Candlejar system and the Fortner principle. The aim of the study is to compare two alternative methods for anaerobic cultivation of *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 with cultivation by Gas Pack system, which is a widely used and well-studied method. We made anaerobic cultivation using the GasPack system, Candle jar and Fortner principle. The bacteria were seed in two different types of agar media -

suitable for anaerobic cultivation Wilkins-Chalgren agar and Mueller-Hinton agar, useful for antibiotic sensitivity testing. The results of our study showed that in all bacterial cultures, *B. fragilis* ATCC 25285 demonstrated heavy growth. The Candle jar system and Fortner principle were found to be a sensitive and cost-effective alternative that might be used in resource-limited settings.

Г.7.11. Силвия Михайлова, Десислава Александрова, Антоанета Цветкова, **Силвия Стамова.** Ефективната комуникация като фактор, влияещ върху придържането към фармакотерапията. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB; 58-60, 2021.*

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

Комуникацията е ключов елемент от здравните и фармацевтичните грижи, който е пряко свързан с резултата от лечението. Това изследване има за цел да оцени възприятието на фармацевтите за ефективна комуникация като фактор, влияещ върху придържането към предписаното лечение. Анонимни индивидуални въпросниците са раздадени на фармацевти в аптеки от открит тип. Във въпросника са предложени 6 твърдения с пет възможности за отговор (наричана още петстепенна скала на Ликерт). Анкетираните единодушно са съгласни с твърденията, че добрата комуникация и доверие в лекаря (96%), и предоставянето на фармацевтичната грижа (91,1%) имат положително влияние и могат да доведат до подобри резултати в придържането към изписаната терапия. Общуването с пациентите, което разкрива техните предпочитания, нужди и ценности, е предпоставка за подобряване на степента на придържане към плана за лечение.

Silviya Mihaylova, Desislava Aleksandrova, Antoaneta Tsvetkova, **Sylvia Stamova.** Effective communication as a factor affecting adherence to pharmacotherapy. *J of IMAB, SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB; 58-60, 2021.*

DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2021Supplement1>

Communication is a key element of health and pharmaceutical care which is directly related to the treatment outcome. This research aimed to assess the pharmacists' perception of effective communication as a factor affecting adherence to the prescribed treatment. Anonymous individual questionnaires were distributed to community pharmacist's. The questionnaire proposed 6

statements with five response options (also called the five-point Likert scale). Respondents unanimously agreed with the statements that good communication and trust in the doctor (96%), and the provision of pharmaceutical care (91.1%) had a positive influence and could lead to better adherence outcomes. Communication with patients, which reveals their preferences, needs and values, is a precondition for improving the degree of adherence to the treatment plan.

Критерий Г.8. Публикации и доклади, публикувани в нереферирани списания с научно рецензиране или публикувани в редактирани колективни токове

Г.8.1. Силвия Стамова, Светлана Георгиева, Надя Агова, Петар Стамов. Съвременни подходи за лечение на *Helicobacter pylori*. *Academic journal, Healthcare, ISSN 13126121, vol. 15(5), 239-244, 2019.*

Инфекцията с *Helicobacter pylori* е една от най-честите хронични бактериални инфекции, засягащи хората. Повече от 70% от световното население е носител на *Helicobacter pylori*. Този грам-отрицателен организъм колонизира специално човешкия стомах и за съжаление може да се запази през целия живот на гостоприемника. Едновременно действие на *H. pylori* и неговия гостоприемник е довело до реакция на *H. pylori* със защитния механизъм на гостоприемника и имунната му система. В тази статия представяме утвърдени и нови схеми за лечение на инфекция с *H. pylori*.

Sylvia Stamova, Svetlana Georgieva, Nadya Agova, Petar Stamov. Modern approaches of *Helicobacter pylori* treatment. *Academic journal, Healthcare, ISSN 13126121, vol. 15(5), 239-244, 2019.*

Helicobacter pylori infection is one of the most common chronic bacterial infections affecting humans. More than 70% of the world's population carries *Helicobacter pylori*. This Gram-negative organism colonizes specifically the human stomach and unfortunately may be persisting for the entire life of the host. Concomitance of *H. pylori* and its host has resulted in reaction of *H. pylori*

with the host's pathogen defense mechanism and the immune system. Here we presented old and new regimens to manage of *H. pylori* infection.

Г.8.2. Силвия Стамова, Надя Агова, Светлана Георгиева. Локално приложение на метронидазол при *Acne rosaceae*. *Academic journal, Medicine, Pharmacy, Public health*, vol.6 (16); 38-42, 2020.

Acne rosaceae е хронично възпалително заболяване, което обикновено засяга възрастни групи над 40 години. Търсенето на нови подходи в лечението на *Acne rosaceae* е непрекъснато. В допълнение към пероралните лекарства, различни други схеми за локално лечение са успешно използвани. В повечето случаи те са предпочитани, защото избягват много от страничните ефекти на системните лекарства. Тази статия описва опита на различни специалисти, прилагали метронидазол локално при пациенти с *Acne rosaceae*.

Sylvia Stamova, Nadya Agova, Svetlana Georgieva. Topical application of metronidazole to *Acne rosaceae*. *Academic journal, Medicine, Pharmacy, Public health*, vol.6 (16); 38-42, 2020.

Acne rosacea is a chronic inflammatory disease that usually affects age groups over 40 years. Searching of new approaches in the treatment of *Acne rosaceae* are constantly. In addition to oral drugs, various topical treatment regimens have been successfully used. In most cases, they are preferred because they avoid the many side effects of systemic drugs. This article describes the experience of various specialists who applied metronidazole topically to patients with *Acne rosacea*.

Г.8.3. Силвия Стамова, Надя Агова, Светлана Георгиева. Предизвикателства при лечението на кандидоза с азолови лекарства. *Academic journal, Medicine, Pharmacy, Public health*, vol.6 (16); 43-47, 2020.

Canida albicans и други не-*albicans* видове като *C. Krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, са причинители на системни инфекции. Те се възприемат като основни инфекциозни микроорганизми от този вид. Най-често те причиняват повърхностни,

вагинални или орални инфекции. Опасността е, че при определени условия те могат да нахлуят в кръвния поток, което да доведе до инвазия на локално разположени тъкани и органи. Ефикасността на противогъбичното лечение срещу кандидоза е оценена и се обсъжда в контекста на големи епидемиологични проучвания. Настоящият преглед подчертава употребата на азолни лекарства в стратегии за превенция и контрол по отношение на този широко разпространен патоген.

Sylvia Stamova, Nadya Agova, Svetlana Georgieva. Challenges in the treatment of *Candidiasis* with azole drugs. *Academic journal, Medicine, Pharmacy, Public health*, vol.6 (16); 43-47, 2020.

Canida albicans and other non-albicans species like *C. Krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, are the causes of systemic infections throughout the whole world. They are perceived as the main infectious microorganisms from this species. Most often, these organisms cause superficial, vaginal or oral infections. The danger is that, under certain conditions, they can invade the bloodstream, leading to invasion of locally located tissues and organs. The efficacy of antifungal treatment against candidiasis has been evaluated and discussed in the context of large epidemiological studies. The present review highlights the uses of azole drugs in prevention and control strategies regarding this widespread pathogen.

Г.8.4. Силвия Стамова, Яна Колева, Светлана Георгиева, Емилия Георгиева, Нели Ерменлиева. Оценка на чернодробното метаболитно активиране на бензокаин чрез *in silico* методи. *4th International conference on scientific research, Farabi Publishing House*, p. 639-644, 2021.

Бензокаинът е слабо разтворим локален анестетик, естер на пара-аминобензоената киселина. Той се хидролизира от естеразни ензими главно в плазмата и в по-малка степен в черния дроб. Целта на тази работа е да се предвидят вероятни чернодробни метаболити (*in vivo* и *in vitro* симулатор на метаболизма на плъхове) на бензокаин чрез *in silico* методи (софтуер QSARToolbox) и техният механизъм на действие (свързване с ДНК и протеини). Вероятните чернодробни метаболити на бензокаин, които са предвидени от QSAR Toolbox (*in vivo* и *in vitro* симулатор на метаболизма на плъхове), са четири. Три от тях не са реактивни, а един е реактивен, т.е. установява се свързване с ДНК. Метаболитът се свързва

чрез образуване на ROS (индиректно) (заместени с един пръстен първични ароматни амини и SN₁ (нуклеофилна атака след образуване на нитрениеви йони (заместени с един пръстен първични ароматни амини))). Три метаболита от четири не са реактивни, а един метаболит се свързва с протеини. Реактивният метаболит образува Шифови бази с механизъм на карбонилни съединения (алдехиди).

Sylvia Stamova, Yana Koleva, Svetlana Georgieva, Emilia Georgieva, Neli Ermenlieva. Evaluation of the hepatic metabolic activation of benzocaine by *in silico* methods. *4th International conference on scientific research*, Farabi Publishing House, p. 639-644, 2021.

Benzocaine is a slightly soluble local anesthetic, an ester of para-aminobenzoic acid. It is hydrolyzed by esterase enzymes mainly in plasma and a lesser extent in the liver. The purpose of this work is to predict probable hepatic metabolites (in vivo and in vitro rat) and their mechanism of action (DNA and protein binding) of benzocaine by *in silico* methods (QSARToolbox software). The probable hepatic metabolites of benzocaine that have been predicted by QSAR Toolbox (in vivo and in vitro rat metabolism simulator) are four metabolites. Three of them are not reactive metabolites and one is reactive, i.e. alert is found by DNA binding. The metabolite is with radical mechanism via ROS formation (indirect) (single-ring substituted primary aromatic amines and SN₁ (nucleophilic attack after nitrenium ion formation (single-ringsubstituted primary aromatic amines))). Three metabolites of four are not reactive and one metabolite was found alert by protein binding. The reactive metabolite is with Schiff base formation with carbonyl compounds (aldehydes) mechanism.

Г.8.5. Силвия Стамова, Яна Колева, Светлана Георгиева, Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева. Вероятна метаболитна активация на бензокаин в кожата. *4th International conference on scientific research book*, Farabi publishing house, p. 635-638, 2021.

Бензокаинът е локален анестетик, който се използва за намаляване на болката и дискомфорта, причинени от различни източници. Използва се и за обезболяване на кожни и лигавични повърхности в устата, носа и т.н. Настоящата работа е насочена към прогнозиране на възможни кожни метаболити на бензокаин чрез *in silico* методи като QSAR

Toolbox софтуер и техният механизъм на действие (свързване с ДНК и протеин). Вероятните кожни метаболити (реактивен един метаболит и нереактивен един метаболит) на бензокаин, които са предсказани от QSAR Toolbox, се свързват с ДНК чрез радикален механизъм и образуване на ROS (непряко): първични ароматни амини, заместени с един пръстен и SN_1 : нуклеофилна атака след образуване на нитрениев йон. За метаболитите на бензокаин не са открити възможности за свързване с протеини.

Sylvia Stamova, Yana Koleva, Svetlana Georgieva, Emiliya Georgieva, Neli Ermenlieva, Probable metabolic activation of benzocaine in the skin, *4th International conference on scientific research book, Farabi publishing house*, p. 635-638, 2021.

Benzocaine is a local anesthetic that is used to reduce pain and discomfort caused by different sources of pain on a surface of the body. It is also used to numb the skin or surfaces inside the mouth, nose, etc. The present work is aimed to predict possible metabolites and their mechanism of action (DNA and protein binding) of benzocaine in the skin by in silico methods as QSAR Toolbox software. The probable skin metabolites (not reactive one metabolite and reactive one metabolite) of benzocaine that have been predicted by QSAR Toolbox are with mechanism of action (radical mechanism via ROS formation (indirect): single-ring substituted primary aromatic amines and SN_1 : nucleophilic attack after nitrenium ion formation (single-ring substituted primary aromatic amines)) by DNA binding. For metabolites of benzocaine were not found alerts by protein binding, i.e. metabolites are not reactive.

Г.8.6. Надя Агова, Светлана Георгиева, **Силвия Стамова**, Боряна Михайлова. FT-IR спектрален анализ на ново получен аналог на бексаротен. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 2020, vol.7, 37-40.

ВЪВЕДЕНИЕ: Ретиноидите могат да бъдат природни и синтетични съединения, част от семейството на полиизопреноидните липиди. Те участват в няколко важни физиологични процеси в човешкото тяло поради способността им да се свързват с различни ядрени рецептори. Ретиноидите се използват в терапията на някои предракови лезии, лечението на остра промиелоцитна левкемия (APL), Т-клетъчен лимфом и превенцията на злокачествени

заболявания при групи с висок риск от карцином. В тази работа обсъждаме възможностите за анализ на новосинтезирания хидразон на ретиноида бексаротен.

ЦЕЛ: Целта на това изследване е да се проведе FT-IR спектрален анализ на новосинтезиран хидразон на бексаротен.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ: Инфрачервените спектри ($500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) бяха заснети на Bruker FTIR спектрометър с помощта на ATR - приставка със Smart iTR адаптер.

РЕЗУЛТАТИ: Инфрачервените спектри на новосинтезираното съединение бяха сходни в относителните позиции и интензитети на получените пикове, потвърждавайки тясната му структурна връзка с бексаротена. Въпреки структурното сходство, имаше значителни разлики, които сочат към въвеждането на заместител и образуването на ново производно на хидразон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: За да се потвърдят данните, получени чрез FT-IR спектроскопия, анализ, е необходимо да се извърши допълнителен HPLC-UV анализ на новото хидразоново производно.

Nadya Agova, Svetlana Georgieva, **Sylvia Stamova**, Boryana Mihaylova. FT-IR spectral analysis for a newly obtained structure analog of bexarotene. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 2020, vol.7, 37-40.

INTRODUCTION: Retinoids are natural and synthetic compounds part of the family of polyisoprenoid lipids. These compounds are involved in several important physiological processes in the human body because of their ability to bind to different nuclear receptors. Retinoids are used in the therapy of some precancerous lesions, the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), T-cell lymphoma, and the prevention of malignancies in high-risk cancer groups. In this work we discuss the possibilities for analysis of the newly synthesized hydrazone of the retinoid bexarotene.

AIM: The purpose of this study is to conduct FTIR spectral analysis of newly synthesized hydrazone of bexarotene.

MATERIALS AND METHODS: Infrared spectra $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ were taken on a Bruker FTIR spectrometer using ATR - a plug with Smart iTR adapter.

RESULTS: The infrared spectra of the newly synthesized compound were strikingly similar in the relative positions and intensities of the resulting peaks, confirming its close structural relationship

with bexarotene. Despite the structural similarity, there were significant differences that point to the introduction of a substituent and the formation of a new hydrazone derivative.

CONCLUSION: In order to confirm the data obtained by FTIR spectroscopy, a further reversed-phase HPLC-UV analysis of the new hydrazone derivative should be performed.

Г.8.7. Силвия Стамова, Яна Колева, Светлана Георгиева. *In silico* предсказване на метаболитна активация на метронидазол. *PROCEEDINGS OF UNIVERSITY OF RUSE - 2021, volume 60, book 10.1, p. 23-29, 2021.*

Метронидазолът е антимикробно лекарство с широк спектър на действие. Целта на тази работа е прогнозиране на вероятното метаболитно активиране на метронидазол в черния дроб (*in vivo* и *in vitro* симулатор на метаболизма на плъхове) и определяне на начина на свързване (протеин и ДНК) на неговите метаболити чрез OECD QSAR Toolbox. Основната структура на метронидазола може да се свърже с ДНК (радикален механизъм чрез образуване на ROS и SN₁ механизъм на действие), но не може да се свърже с протеини и експериментални метаболитни пътища на действие не са наблюдавани при плъхове *in vivo* и *in vitro*. Генерираните метаболити със симулатор на чернодробна метаболитна активация за двете състояния (*in vivo* и *in vitro* при плъх) са девет и седем, съответно. Реактивните метаболити и за двете (*in vivo* и *in vitro*) имат различни механизми на действие (Радикалов механизъм чрез образуване на ROS, SN₁, AN₂ и SN₂) чрез свързване с ДНК. Някои реактивни метаболити са с механизъм на действие с образуване на Шифова база при свързване с протеини.

Sylvia Stamova, Yana Koleva, Svetlana Georgieva. *In silico* predicting metabolic activation of metronidazole. *PROCEEDINGS OF UNIVERSITY OF RUSE, volume 60, book 10.1, p. 23-29, 2021.*

Metronidazole is an antimicrobial drug with wide spectrum of activity. The aim of this work is to predict the probable metabolic activation of metronidazole in the liver (*in vivo* and *in vitro* rat) and to determine the protein and DNA binding of its metabolites by OECD QSAR Toolbox. The parent structure of metronidazole can bind to DNA (Radical mechanism via ROS formation and SN₁ mechanism of action) but it cannot bind to protein and experimental metabolic pathways of action

were not observed for rat in vivo and in vitro. The generated metabolites after hepatic metabolic activation simulator for both conditions (in vivo and in vitro rat) are nine and seven, respectively. The reactive metabolites for both (in vivo and in vitro) have different mechanisms of action (Radical mechanism via ROS formation, SN₁, AN₂ and SN₂) by DNA binding. Some reactive metabolites are with the following mechanism of action (Schiff base formation) by protein binding.

Г.8.8. Йорданка Михайлова, **Силвия Стамова**, Емилия Георгиева, Нели Ерменлиева, Берна Бейти. Антимикробна лекарствена резистентност на фона на пандемията от COVID-19 в България и Европа: Задълбочен преглед на наличните литературни източници. *Acta Scientifica Naturalis, Journal ASN*, vol.9 (2022), 47-55.

DOI: <https://doi.org/10.2478/asn-2022-0005>

Неправилната употреба на антибиотици е изключително тревожна тенденция в световен мащаб. Това води до развитие на резистентност към тези лекарства. В резултат на това антибиотиците спират да действат и бактериите продължават да се развиват. Най-високи нива на резистентност, както у нас, така и по света, имат цефалоспорините от второ и трето поколение, някои аминогликозиди и др. Причината е, че тези антибиотици са били използвани най-нерационално през годините. Пандемията от COVID-19 и антимикробната лекарствена резистентност (AMR) са успоредни и взаимосвързани сериозни здравни явления, между които има причинно-следствена връзка, изразяваща се във висока смъртност сред човешката популация. Този преглед подчертава връзките между темповете на нарастване на антимикробната резистентност и пандемичната ситуация с Covid-19 в България и Европа.

Yordanka Mihaylova, **Sylvia Stamova**, Emilia Georgieva, Neli Ermenlieva, Berna Beyti. Antimicrobial drug resistance against the background of the COVID-19 pandemic in Bulgaria and Europe: A profound review of the available literature sources. *Acta Scientifica Naturalis, Journal ASN*, vol.9 (2022), 47-55.

DOI: <https://doi.org/10.2478/asn-2022-0005>

Improper use of antibiotics is an extremely worrying trend worldwide. This leads to the development of resistance to these drugs. As a result, antibiotics stop working and bacteria continue to grow. The highest levels of resistance, both in our country and worldwide, are to second and third-generation cephalosporins, some aminoglycosides, and others. The reason is that these antibiotics have been used most irrationally over the years. The pandemic of COVID-19 and Antimicrobial drug resistance (AMR) are parallel and interrelated serious health situations, between which there is a causal link, manifested in high mortality among the human population. This review highlights relations between growth rates of antimicrobial resistance and the Covid-19 pandemic situations in Bulgaria and Europe in this fast-growing research area.

Г.8.9. Силвия Атанасова-Стамова, Силвия Михайлова, Нели Ерменлиева, Емилия Георгиева. *In vitro* проучване на антимикробната активност на етерични масла от *Origanum vulgare* срещу *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, vol. 8(2), p. 34-37, 2021.

ВЪВЕДЕНИЕ: Етеричните масла са ароматни и летливи течности, извлечени от различни растителни части с антибактериални, противогъбични, антивирусни, антиоксидантни и други биологични свойства. Например етеричното масло от риган има антиоксидантно и антимикробно действие.

ЦЕЛ: Целта на това изследване е да се оцени потенциалната антимикробна активност на две търговски етерични масла (за външна и вътрешна употреба) от *Origanum vulgare* срещу *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Escherichia coli* ATCC 25922.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ: Изследването е проведено в Медицински колеж, Варна, България. Антимикробната активност на етеричните масла от риган се определя чрез използването на дисково-дифузионен метод на Кърби-Бауер.

РЕЗУЛТАТИ: Антимикробната активност на етеричните масла от риган (за външна и вътрешна употреба) е ефективна при контрола на *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Този инхибиторен ефект се наблюдава при зони на инхибиране с диаметри над 21 mm.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Бъдещата оценка на природни етерични масла със сравнително висока *in vitro* активност може да бъде изследвана при лечението на различни инфекциозни заболявания.

Sylvia Atanasova-Stamova, Silvia Mihaylova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva. *In vitro* study of antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, vol.8(2), p. 34-37, 2021.

INTRODUCTION: Essential oils are aromatic and volatile liquids, extracted from different plant parts with antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant, and biological properties. For example, the essential oil of oregano presents antioxidant and antimicrobial activities.

AIM: The aim of this study is to evaluate the potential antimicrobial activity of two (for external and internal use) commercial essential oils of *Origanum vulgare* against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted in Medical College, Varna, Bulgaria. The antimicrobial activity of oregano essential oils was determined using the Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test.

RESULTS: Antimicrobial activity of oregano essential oils (for external and internal use) was efficient in the control of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. This inhibitory effect was observed by the inhibitory diameters above 21 mm.

CONCLUSION: The future evaluation of natural essential oils with a relatively high *in vitro* activity could be researched in the treatment of various infectious diseases.

Г.8.10. Светлана Георгиева, Илиян Колев, **Силвия Стамова**, Надя Агова, Павлина Косева. Биологично действие на нитроимидазолите: минало и бъдеще. *Academic journal, Management and education*, VOL. XIV (5), p. 138-147, 2018.

Нитроимидазолите са клас терапевтични лекарства, използвани главно за лечение на инфекции причинени от чувствителни организми, особено аеробни бактерии и протозои. Нитроимидазолите са важни при лечението на интраабдоминален и гинекологичен сепсис, абсцеси и тетанус. Те също са важен компонент на профилактичните режими за хирургични

процедури, при които има вероятно анаеробно замърсяване на флората. Нитроимидазолите се използват за лечение на бактериална вагиноза (често свързана с *G. vaginalis*) и зъбни инфекции, включително остър некротизиращ улцерозен гингивит (ангина на Винсент). Нитроимидазолите са също компонент на съвременните схеми за тройна ерадикация на *H. pylori*. Голям брой нитроимидазолови лекарства се използват и днес. Някои 5-нитроимидазолови производни като метронидазол, тинидазол, секнидазол и азомицина са използвани дълго време за тежки случаи на инфекции. 2-нитроимидазолите играят важна роля като биоредуктивни маркери за туморна хипоксия, като радиосенсибилизатори и за някои също е известно, че демонстрират антипротозойна активност. В този литературен преглед ще представим нови перспективи за употреба на производните на нитроимидазола лекарства в бъдеще.

Svetlana Georgieva, Iliyan Kolev, **Sylvia Stamova**, Nadya Agova, Pavlina Koseva. Biological activity of nitroimidazoles: past and future. *Academic journal, Management and education*, VOL. XIV (5), p.138-147, 2018.

Nitroimidazoles are class of the therapeutic drugs used mainly in the treatment of infections caused by susceptible organisms, particularly an aerobic bacteria and protozoa. Nitroimidazole are therefore important in the treatment of intra-abdominal and gynecologic sepsis, abscesses and tetanus. They are also an important component of prophylactic regimens for surgical procedures where contamination with anaerobic flora is likely. Nitroimidazoles are used to treat bacterial vaginosis (frequently associated with *G. vaginalis*) and dental infections, including acute necrotizing ulcerative gingivitis (Vincent's angina). Nitroimidazoles are also a component of modern triple eradication regimens for *H. pylori*. The large number nitroimidazole drugs are in use today. Some 5-nitroimidazole derivatives such as metronidazole, tinidazole, secnidazole and azomycin have been used long time for severe cases of infections. 2-nitroimidazoles play an important role as bioreductive markers for tumor hypoxia, as radiosensitizers and some are also known to demonstrate antiprotozoan activity. In this literature review, we will present new perspective of nitroimidazole derivatives in the future.

Г.8.11. Надя Агова, **Силвия Стамова**, Светлана Георгиева. Суицидни прояви при ретиноидна терапия на акне. *Academic journal, Management and education*, VOL. XVI (6). p. 7-10, 2020.

Все повече изследвания насочват вниманието на учените към възможната връзка между пероралната употреба на ретиноиди и самоубийство. Ретиноидът изотретиноин от трето поколение е основният използван при лечението на тежки форми на акне. Докладвани са много неблагоприятни психични ефекти, включително депресия, тревожност и опити за самоубийство след употребата на изотретиноин. Правилното разпознаване и лечение на психичните странични ефекти при пациенти с акне са от решаващо значение предвид риска от смърт и нараняване. Настоящото проучване изследва връзката между изотретиноина, използван при лечението на акне и появата на депресия и самоубийство.

Nadya Agova, **Sylvia Stamova**, Svetlana Georgieva. Suicidal events in acne treatment with retinoids. *Academic journal, Management and education*, VOL. XVI (6), p. 7-10, 2020.

More and more studies are drawing scientists' attention to the possible link between oral retinoids and suicide. The third-generation retinoid isotretinoin is the main one used in the treatment of severe acne. Many adverse psychiatric effects, including depression, anxiety, and suicide attempts, have been reported since the use of isotretinoin. Proper recognition and treatment of psychiatric side effects in patients with acne are crucial given the risk of death and injury. The present study examines the relationship between isotretinoin used in the treatment of acne and the occurrence of depression and suicide.

Г.8.12. Надя Агова, Светлана Георгиева, **Силвия Стамова**, Яна Колева. **QSAR** моделиране за предсказване на свързване с ДНК или протеини на дермални метаболити на новосинтезирани хидразони. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, vol.7(1), p. 7-11, 2020.

През последното десетилетие се наблюдава значително увеличение на научните познания за туморните заболявания, което съответно доведе до развитието и увеличаването на интереса към нови лекарства и терапевтични подходи с потенциални приложения в онкологията. Изследването на активността и идентифицирането на потенциални терапевтични и токсични

ефекти на производни на бексаротен, са в основата на разработването на нови подходи за лечение на редица нелекувани заболявания. Това изисква допълнително и задълбочено проучване на потенциала на новосинтезирани съединения да произвеждат активни метаболити.

ЦЕЛ: С оглед на възможността за дермално приложение на бексаротен, трябва да се изследва възможността за токсичен метаболизъм в кожата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ: За целта е използван OECD (Q) SAR Application Toolbox. Това е софтуерно приложение за оценка на свойствата на химични съединения въз основа на тяхната молекулна структура.

РЕЗУЛТАТИ: Приложението на модела за предсказване на метаболитни промени дава възможност да се оцени риска въз основа на химичната структура на съединенията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Метаболитното дермално прогнозиране на нови хидразони от трето поколение ретиноид бексаротен показва, че нито един от тях не предвижда свързване с ДНК или протеини.

Nadya Agova, Svetlana Georgieva, **Sylvia Stamova**, Yana Koleva. QSAR modeling for prediction of binding to DNA or proteins of dermal metabolites of newly synthesized hydrazones. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, vol.7(1), p.7-11, 2020.

Over the last decade, there has been a significant increase in the scientific knowledge about cancer, which has accordingly led to the development and increase of interest in new medicines and therapeutic approaches with potential applications in oncology. Activity research and the identification of potential therapeutic and toxic effects of bexarotene-like structures underpin the development of new approaches to the treatment of a number of untreated diseases. This requires a further and in-depth study of the potential of newly synthesized compounds to produce active metabolites.

AIM: In view of the potential for dermal administration of bexarotene, the potential for toxic metabolism in the skin needs to be investigated.

MATERIALS AND METHODS: For the purpose the OECD (Q) SAR Application Toolbox was used. It is a software application for evaluating the properties of chemicals based on their molecular structure.

RESULTS: The application of the model for predicting metabolic changes makes it possible to assess the risk based on the chemical structure of the compounds.

CONCLUSION: The skin metabolic prediction of new hydrazones of third-generation retinoid bexarotene indicates that not one of them predicts binding to DNA or proteins.

**Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън
минималните наукометрични изисквания за заемане на АД "доцент"**

1. **Силвия Стамова, Яна Колева, Светлана Георгиева, Емилия Георгиева, Нели Ерменлиева.** Вероятна микробиална оценка на бензокаин като антимикробен агент. *The book of full text of Tokyo Summit III, 3rd International conference of innovative studies of contemporary sciences, p.545-551, 2021.*

Бензокаинът е добре известен като анестетик, както и неговата допълнителна роля като антимикробен агент. Целта на настоящата работа е да се предскажат вероятните микробни метаболити на бензокаин и техния механизъм на действие чрез OECD QSAR Toolbox. Предвидени от софтуера са тридесет и шест микробни метаболита на бензокаин. Двадесет и пет от тях не са реактивни, а единадесет са реактивни, т.е. открива се свързване с ДНК. Реактивните метаболити на микробна трансформация на бензокаин се свързват с ДНК чрез: AN_2 механизъм (присъединяване тип Michael, хиноидни структури, присъединяване тип Michael към активирани алкенови производни, нуклеофилно присъединяване към алфа, бета-ненаситени карбонилни съединения), образуване на Шифови бази, нековалентно свързване (ДНК интеркалиране), радикален механизъм чрез образуване на ROS и SN_1 нуклеофилна атака след механизми за образуване на нитрениеви йони. Двадесет и четири микробни метаболита от тридесет и шест не са реактивни спрямо протеини, а за дванадесет микробни метаболита са открити сигнали за свързване с протеини.

Sylvia Stamova, Yana Koleva, Svetlana Georgieva, Emiliya Georgieva, Neli Ermenlieva, Probable microbial evaluation of the benzocaine as an antimicrobial agent. *The book of full text of Tokyo Summit III, 3rd International conference of innovative studies of contemporary sciences, p.545-551, 2021, 2021.*

Benzocaine is well known as an anesthetic agent and its supplemental role as antimicrobial agent. The purpose of present work is to predict the probable microbial metabolites of benzocaine and their mechanism of action by the OECD QSAR Toolbox. Thirty six microbial metabolites of benzocaine were predicted by the software. Twenty five of them are not reactive metabolites and eleven are reactive, i.e. alerts are found by DNA binding. The reactive metabolites of microbial transformation simulator of benzocaine are with, AN2 (Michael-type addition, quinoid structures, Michael-type conjugate addition to activated alkene derivatives, nucleophilic addition to α , β -unsaturated carbonyl compounds), Schiff base formation, non-covalent interaction (DNA intercalation), radical mechanism via ROS formation and SN1 nucleophilic attack after nitrenium ion formation mechanisms. Twenty four microbial metabolites of thirty six are not reactive and for twelve microbial metabolites were found alerts by protein binding.

2. Силвия Стамова, Ивелин Илиев, Светлана Георгиева. Софтуер базирано проучване за предсказване на микробната активност на етакридин лактат, *4th International congress of multidisciplinary studies in medical sciences, Proceedings Book, p. 126-133, February 28, 2022.*

Акридиновите производни са един от най-старите класове биоактивни вещества, широко използвани като антибактериални и антипротозойни средства. Етакридин лактат (7-етоксиакридин-3,9-диамин, 2-хидроксипропанова киселина), акридиново производно, известно още като риванол, се използва като антимикробен агент от ерата на пеницилина. В допълнение, това е лекарство, което обикновено се използва за прекъсване на бременността през втория триместър с доказана ниска степен на усложнения. Целта на тази работа е да се предскажат вероятните микробни метаболити на етакридин лактат и тяхното ДНК и протеиново свързване, като се използва софтуерно базиран подход - QSAR Toolbox. Реактивността на метаболитите на етакридинов лактат чрез симулатора на микробна трансформация, имат различни механизми на ДНК свързване (нековалентно взаимодействие, радикален механизъм чрез образуване на ROS, образуване на S, S, A и шифова база). Протеиновата реактивност на етакридиновите метаболити има следния механизъм на действие: S², присъединяване тип Michael, образуване на Шифови бази,

нуклеофилно присъединяване. Установено е, че някои от генерираните метаболити не се свързват с ДНК или протеини.

Sylvia Stamova, Ivelin Iliev, Svetlana Georgieva. Software based approach for prediction of microbial activity of ethacridine lactate, *4th International congress of multidisciplinary studies in medical sciences, Proceedings Book*, p.126-133, February 28, 2022.

Acridine derivatives are one of the oldest classes of bioactive, widely used as antibacterial and antiprotozoal agents. Ethacridine lactate (7-ethoxyacridine-3,9-diamine, 2-hydroxypropanoic acid), an acridine derivative also known as rivanol has been used as an antimicrobial agent from the penicillin era. In addition, it is a drug commonly used for second trimester termination of pregnancy with proven low rate of complication. The aim of this work is to predict the probable microbial metabolites and their DNA and protein binding of ethacridine lactate using a software-based approach- QSAR Toolbox. The reactivity of the predicted Microbial transformation simulator metabolites of ethacridine lactate has different mechanisms of action (non-covalent interaction, radical mechanism via ROS formation, S, S, A and Schiff-base formation) of DNA binding. The protein reactivity of ethacridine metabolites has the following mechanism of action: S². Michael addition, Schiff-base formation, nucleophilic addition. Some of the generated metabolites were found to lack DNA or protein binding.

3. Петар Стамов, **Силвия Стамова**. Хирургично срещу консервативно лечение на инвагинация при деца, *Conference Book Hodja Akhmet Yassawi, 4th International conference on scientific research, Ankara, Farabi publishing house*, p. 543-545, 2021.

Инвагинацията е животозастрашаващо състояние, което изисква незабавна медицинска помощ. Това е една от най-честите причини за чревна обструкция при деца, тъй като една част от червата навлиза в съседна част. Причината обикновено е неизвестна при деца. Целта на настоящото изследване е да опише и да направи ретроспективен анализ на приетите пациенти с инвагинация в периода от 01.01.2015 г. до 31.12.2020 г. въз основа на нашия опит в Клиниката по Детска хирургия-Варна. Идентифицирани са общо 24 деца на възраст от 2

месеца до 10 години. Диагнозата се основава не само на клинични данни, но и на рентгенография и ехография на корем. Само при четирима пациенти инвагинацията успешно се репонира с помощта на пневмоколоноскопия, а при останалите двадесет се наложи оперативно лечение. Резултатите показват, че инвагинацията е по-честа при деца до 3 години и обикновено се появява след хранене или след добавяне на нов вид храна, или по време на чревна инфекция. Повечето от тях се подлагат на оперативно лечение.

Petar Stamov, **Sylvia Stamova**. Surgical versus conservative management of intussusception in children, *Conference Book Hodja Akhmet Yassawi, 4th International conference on scientific research, Ankara, Farabi publishing house, p. 543-545, 2021.*

Intussusception is a life-threatening condition that requires immediate medical attention. It is one of the most common causes of intestinal obstruction in children as one part of the intestine slides into an adjacent part of the intestine. The cause is typically unknown in children. The purpose of this study is to review and describe the retrospective analysis of admitted patients with intussusception in the period from January 1, 2015, to December 31, 2020, based on our experience in the Department of Pediatric Surgery-Varna. A total number of 24 children aged from 2 months to 10 years were identified. The diagnosis is based not only on clinical data but also on X-rays and abdominal ultrasound. Only four of the patients diagnosed with intussusception were able to reduce undergoing airway reduction, and twenty needed to undergo surgery. The results show that intussusception is more common in children up to 3 years and usually appears after eating or after adding a new type of food, or during intestinal infection. Most of them have to undergo surgical treatment.

4. Петар Стамов, **Силвия Стамова**. A retrospective study for the total number of acute appendicitis before and during COVID-19 pandemic in pediatric surgery, *4th International conference on scientific research book, Ankara, Farabi publishing house, p. 546-549, 2021.*

Пандемията Covid-19 повлиява значително на спешното хирургично лечение, включително остър апендицит. Настоящото изследване има за цел да сравни клиничните показатели и общия брой на педиатричните пациенти в Клиниката по Детска хирургия-Варна, с

апендицит от периода 01.01.2019 г. – 31.12.2019 г. спрямо тези от периода 01.01.2020 г. – 31.12. 2020 г. Ретроспективното изследване за посочените периоди отчита следните данни: в първия период общият брой на пациентите с остър апендицит е 96, от които 9 с периапендикуларен абсцес и 28 с дифузен перитонит; във втория период общият брой на болните е 106, от които 16 с периапендикуларен абсцес и 38 с дифузен перитонит. В заключение, по време на пандемията се наблюдава леко увеличение на пациентите с остър апендицит и случаите на усложнени форми като перфорация и перитонит. Това е индикация, че пациентите, нуждаещи се от спешна оперативна намеса, не търсят навременна и подходяща помощ.

Petar Stamov, **Sylvia Stamova**. A retrospective study for the total number of acute appendicitis before and during COVID-19 pandemic in pediatric surgery, *4th International conference on scientific research book, Ankara, Turkey, Farabi publishing house, p. 546-549, 2021.*

Covid-19 pandemic has affected significantly the emergency surgical health delivery including acute appendicitis. This study aims to compare the clinical parameters and the total numbers of pediatric patients in the Department of Pediatric Surgery-Varna, with appendicitis from the period between 01.01.2019-31.12.2019 compared to those from the period between 01.01.2020-31.12.2020. The retrospective study for the specified periods reports the following data: in the first period, the total number of patients with acute appendicitis is 96, of which 9 with periappendicular abscess and 28 with diffusion peritonitis; in the second period the total number of patients is 106, of which 16 with periappendicular abscess and 38 with diffusion peritonitis. In conclusion, during the pandemic, there was a slight increase in the number of patients with acute appendicitis and cases of complicated forms such as perforation and peritonitis. This is an indication that patients requiring urgent surgical intervention are not seeking timely and appropriate care.

5. Калоян Михалев, **Силвия Стамова**, Надя Агова, Светлана Георгиева. Биологичната роля на флаваноидите. *International symposium on current developments in science, technology, and social sciences book, Biltek, vol.1, 75-78, 2021.*

Флавоноидите са най-голямата и широко разпространена група фенолни съединения в растенията. Те имат много структурни различия, но обединяващият знак е тяхният въглероден скелет C6-C3-C6. Молекулите на флавоноидите съдържат два ароматни фенилови радикала, свързани с пропанова алифатна верига. Те се синтезират и натрупват във всички растителни тъкани и органи обикновено като гликозиди. Заедно с други фенолни съединения флавоноидите имат важна роля за устойчивостта на растенията към различни инфекции. Техните биологични ефекти са изследвани чрез различни *in vitro* и *in vivo* експерименти и данните показват, че те притежават противовъзпалителни, антивирусни, антиоксидантни, антиалергични, противотуморни действия. Флавоноидите имат главно спазмолитични, хипотензивни и антибактериални ефекти, изофлавоноидите се характеризират с подобни на естрогена ефекти. Флавонолигнаните имат хепатопротективна активност, докато флаванолите имат антиоксидантни, диуретични и кардиотонични свойства. Напоследък настоящата пандемия може да доведе до откриване на нови терапевтични средства за лечение на вирусни и бактериални инфекции. Като алтернативна или допълнителна терапевтична стратегия, някои *in vitro* и софтуерни проучвания показват, че естествените полифенолни съединения могат успешно да бъдат включени в терапията на коронавируса. Целта на тази работа е преглед и обобщение на различните биологични свойства на някои флавоноиди.

Kaloyan Mihalev, **Sylvia Stamova**, Nadya Agova, Svetlana Georgieva. The biological role of flavonoids, *International symposium on current developments in science, technology, and social sciences book, Biltek, vol.1, 75-78, 2021.*

Flavonoids are the biggest and widespread group of phenolic compounds in plants. They have many structural differences, but the unifying sign is their C6-C3-C6 carbon scaffold. The molecules of flavonoids contain two aromatic phenyl radicals connected with three carbon aliphatic chains. They are synthesized and accumulated in all plant's tissues and organs usually as glycosides. Together with other phenolic compounds the flavonoids have significant role for resistance of plants to various infections. Their biological activities are improved by variety *in vitro* and *in vivo* experiments and the data show that they possess anti-inflammatory, antiviral, antioxidant antiallergic, anticancer activities. The flavones have mainly spasmolytic, hypotensive, and

antibacterial effects, the isoflavones are characterized with estrogen similar effects. Flavonolignans have hepatoprotective activities while flavanols have antioxidant, diuretic and cardiogenic properties. Recently, the present pandemic situation could lead to discover new therapeutic agents for treatment of viral and bacterial infections. As an alternative or additional therapeutic strategy, some in vitro and software based studies demonstrate that natural polyphenolic compounds could be successfully include in therapy of coronavirus. The aim of this work is to review and summarize the different biological properties of some flavonoids.

6. Калоян Михалев, **Силвия Стамова**, Надя Агова. Светлана Георгиева. Резюме на фармакологичните свойства на някои индоламини. *International symposium on current developments in science, technology, and social sciences book, Biltek. vol.1, 82-86, 2021.*

Индоламините, заедно с катехоламините и производните на етиламин, образуват важна група моноаминови невротрансмитери. Индоламинът е заместено индолово съединение, което съдържа аминогрупа. Примери за индоламини са лизергамиди и производни на триптофана- серотонин, мелатонин. Мелатонинът (5-метокси-N-ацетилтриптамин) е епифизен хормон, който се произвежда от L-триптофан в четиристепенен процес. Мелатонинът е изолиран предимно от епифизната жлеза, но много изследвания показват, че този хормон присъства в различни тъкани, включително ретината, плацентата, бъбреците, дихателните пътища и чревната лигавица. Мелатонинът се използва най-често за регулиране на циркадния ритъм, безсъние и за подобряване на нарушенията на съня. Напоследък все повече се изследва физиологичната роля на мелатонина, произвеждан в храносмилателната система. Това се дължи на факта, че луминалният мелатонин е мощен стимулант на дуоденалната секреция на бикарбонат и също така участва в регулирането на храносмилателния мотилитет и е в състояние да ускори чревния транзит след хранене. Целта на тази статия е да обобщи ефектите на някои индолови производни и индоламини.

Kaloyan Mihalev, **Sylvia Stamova**, Nadya Agova, Svetlana Georgieva. Review of pharmacological activities of some indolamines, *International symposium on current developments in science, technology, and social sciences book, Biltek- Vol.1, 82-86, 2021.*

Indoleamines, along with catecholamines and ethylamine derivatives form an important group of monoamine neurotransmitters. Chemically, indoleamine is a substituted indole compound that contains an amino group. Examples of indoleamine include lysergamides, tryptophan derivative serotonin, melatonin. Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) is a pineal hormone, which is produced from L-tryptophan in four-steps process. Melatonin has been isolated primarily from the pineal gland, but many studies have shown that this hormone is present in different tissues including retina, placenta, kidneys, respiratory tract, and intestinal mucosa. Melatonin is most commonly used for regulation of circadian rhythm, insomnia and to improve sleep disorders. Recently, the physiological role of melatonin produced in the digestive system has been increasingly studied. This is due to the fact that luminal melatonin is a potent stimulant of duodenal bicarbonate secretion and also has been implicated in the regulation of digestive motility and is able to accelerate intestinal transit after feeding. The purpose of this article is to review and summarize the effects of some indole derivatives and indoleamines.