



---

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА БИОЛОГИЯ**

---



Ръководител катедра: проф. Мария Казакова, дб

**Валентина Николова Михайлова**

**КЛЕТЪЧЕН МЕТАБОЛИЗЪМ ПРИ РЕВМАТОЛОГИЧНИ  
ЗАБОЛЯВАНИЯ**

**Автореферат**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор“

*по докторска програма „Медицинска биология“ в професионално  
направление 7.1. Медицина, от област на висше образование*

*7. Здравеопазване и спорт*

Научен ръководител: **проф. Мария Казакова, дб**

Научен консултант: **проф. д-р Виктория Сарафян, дмн**

**Пловдив – 2025**

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

**Въведение**

**I. Работна хипотеза**

**II. Цел и задачи**

**III. Материали и методи**

**IV. Резултати**

**V. Дискусия**

**VI. Заключение**

**VII. Изводи**

**VIII. Оригинални приноси**

**IX. Научни трудове, свързани с дисертационния труд**

**X. Участия в научни форуми**

**XI. Участия в проекти**

**Цитирания, свързани с дисертацията**

*Дисертационният труд е представен на 128 страници. Той е онагледен с 24 фигури и 13 таблици. Цитирани са 140 литературни източника. Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.*

*Дисертационният труд е обсъден от Разширен катедрен съвет в Катедрата по медицинска биология, МУ-Пловдив на 07.11.2025г.*

**Дисертацията е осъществена с финансовата подкрепа по проекти от МУ-Пловдив (НО 01/2022), European Union – NextGenerationEU, through the National Recovery and Resilience Plan of the Republic of Bulgaria, project № BG-RRP-2.004-0007-C01 и Българска асоциация за мускулно-скелетен ултразвук (БАМСУ).**

**Научно жури:**

Проф. д-р Росица Валериева Каралилова, дмн

Проф. д-р Делян Пенев Делев, дм, мзм

Доц. д-р Емилияна Илиева Конова, дм

Проф. д-р Ирена Манолова Манолова-Василева, дм

Доц. Люба Динева Митева, дб

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на .....  
от .....ч. в Медицински университет – Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15а, гр. Пловдив и са публикувани на интернет страницата на университета.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**АСРА** – Анти-цитрулинирани пептидни антитела

**BMI** – Индекс на телесната маса

**CRP** – С-реактивен протеин

**DAS28** – Disease Activity Score in 28 joints (Индекс на болестната активност, оценяващ 28 стави)

**DMNQ** – 2,3-диметокси-1,4-нафталендион

**DRB1** – Гени от HLA-DRB1 локус

**ELISA** – Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

**ETC** – Електрон-транспортна верига

**FCCP** – Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine

**FLS** – Фибробластоподобни синовиоцити

**GSUS** – Gray Scale Ultrasound (сивоскален ултразвук)

**HLA** – Човешки левкоцитен антиген

**IFN- $\gamma$**  – Интерферон гама

**IL-1 / IL-6** – Интерлевкини 1 и 6

**JAK** – Янус кинази

**JAKi** – Инхибитори на Янус киназите

**LAMP1 / LAMP2** – Лизозомно-асоциирани мембранни протеини 1 и 2

**MHC** – Главен комплекс на тъканна съвместимост

**MPC** – Митохондриален пируватен носител

**MTX** – Метотрексат

**NMOC** – Немитохондриална консумация на кислород

**NO / NOS** – Азотен оксид / Азотен оксид синтаза

**NLRP3** – Инфламазомен комплекс

**NK-клетки** – естествени клетки убийци

**OXPBOS** – Окислително фосфорилиране

**PBMCs** – Периферни мононуклеарни клетки

**PDH** – Пируват дехидрогеназен комплекс

**PDUS** – Power Doppler Ultrasound

**PTPN22** – Протеин тирозин фосфатаза нерецептор тип 22

**RF** – Ревматоиден фактор

**RNS / ROS** – Реактивни азотни / кислородни видове

**SRC** – Резервен респираторен капацитет

**TNF- $\alpha$**  – Тумор некрозис фактор алфа

**TOFA** – Тофацитиниб

**US7** – Ултразвукова скала за 7 стави

**WBC** – Бели кръвни клетки

**АДФ** – Аденозин дифосфат

**Аг** – Антиген

**АПК** – Антиген-представящи клетки

**АТР** – Аденозин трифосфат

**БПАРС** - болестопроменящи антиревматични средства

**НСПВС** – Нестероидни противовъзпалителни средства

**РА** – Ревматоиден артрит

**СУЕ** – Скорост на утаяване на еритроцитите

## Въведение

Основната реакция при иницирането на автоимунния процес при ревматоидния артрит (РА), е активацията на синовиалните ендотелни и имунни клетки. Активацията, пролифрацията и миграцията на част от ендотелните клетки, заедно с пролифрацията на синовиалните фибробласти, отключват серия от събития, които водят до деструкция на ставата. Нерегулираната синовиална микроваскулатура при РА причинява неефективна перфузия на кислород до синовиума, в комбинация с високите метаболитни изисквания на активираните клетки, иницира силна хипоксия на средата. Освен резидентните синовиални клетки, във възпалените стави има инфлукс и инфiltrация с левкоцити, които предизвикват свръх изисквания за енергия и хранителни вещества. Клетките адаптират своите метаболитни профили, за да генерират достатъчно енергия и да поддържат силно стимулираното си състояние на възпаление. Тази промяна в метаболитния капацитет на синовиалните клетки им позволява да произвеждат основните градивни елементи за подпомагане на тяхното активиране, пролифрация и инвазия. Освен това, натрупаните междинни продукти задействат сигнални пътища и допълнително провокират хроничен възпалителен отговор. Възпаленият синовиум наподобява тъкан, в която клетките се различават по своите метаболитни изисквания в зависимост от сложните междуклетъчни взаимодействия, снабдяването с хранителни вещества, междинните метаболитни продукти и транскрипционната регулация.

Патогенезта на РА е комплексен много-факторен процес, в който са въввлечени генетичната предиспозиция, имунната дисрегулация и епигенетични промени, отключващи хроничното синовиално възпаление. Участват също и метаболитните разстройства, митохондриалната

дисфункция и автофагията. Изясняването на индивидуалните вариации в клетъчните и молекулярните механизми, свързани с развитието на РА, промените в митохондриалния статус, въздействието на автофагията и окислителния стрес, значително ще подобри диагнозата и мониторинга на терапията при пациентите. Изследването на митохондриалните параметри и търсенето на нови биомаркери за автофагия, тъканно ремоделиране и окислителен стрес изискват време, финансов и методологичен ресурс. Необходими са анализи на голям контингент от хора с конкретна патология и подбор на обемни кохорти от здрави лица. Нужни са и скъпа техника и реактиви за анализиране и обобщаване на резултатите.

В последните години митохондриите се обсъждат като ключови играчи в патогенезата и развитието на ревматичните заболявания. Въпреки това, механизмът на митохондриална дисфункция при РА остава неясен, а усилията в тази насока биха подобрили мониторинга, клиничния подход и терапевтичните възможности.

## **I. Работна хипотеза**

В периферните мононуклеарни клетки (PVMCs) от пациенти с РА са налице увредено клетъчно дишане и понижена продукция на енергийни субстрати. В резултат на лечението се очаква подобряване на енергийните и метаболитните характеристики на клетките.

Предполагаме, че маркерите за възпаление, автофагия и оксидативен стрес са асоциирани с тежестта на заболяването. Използваните терапевтични режими влияят по различен начин върху митохондриалната функция, клетъчния метаболизъм и динамиката на възпалителния процес.

На базата на тези характеристики е възможно да се мониторира и индивидуализира лечението при всеки конкретен пациент.

### III. Цел и задачи

#### 1. Цел:

Да се изследват митохондриалната функция и панел от биомаркери, отразяващи възпаление, автофагия и оксидативен стрес, при пациенти с РА, преди и след терапия, в паралел с *in vitro* модел на заболяването.

#### 2. Задачи

За изпълнение на поставената цел са определени следните задачи:

1. Да се проведат диагностични клиничко-лабораторни изследвания и да се установят ултрасонографски параметри при всеки пациент с РА преди и след терапия.
2. Да се определят генната експресия и плазмените нива на панел от маркери за възпаление, автофагия и оксидативен стрес при пациенти с РА преди и след терапия.
3. Да се изследва митохондриален и метаболитен статус при пациенти с РА преди и след терапия и на контролната група.
4. Да се обобщят данните и да се потърсят корелационни връзки между митохондриалната активност, маркери за възпаление, автофагия и оксидативен стрес, в зависимост от проведената терапия.
5. Чрез *in vitro* анализ върху утвърден модел за РА, да се валидират *in vivo* експериментите.
6. Да се направи сравнителна оценка на ефективност на двете терапии и да се предложи комплексен клиничко-биологичен подход за персонализиран мониторинг на лечението.

## **IV. Материали и методи**

### **1. Материали**

#### **1.1. Пациенти**

В изследването са включени 24 новодиагностицирани пациенти с РА. Всеки от тях е преминал през оценка на ревматологичния статус, свързан с класификационните критерии за РА според ACR/EULAR 2010.

Подборът на пациентите, физикалният и ултрасонографският преглед са осъществени от проф. д-р Анастас Баталов, дм, проф. д-р Росица Каралилова, дмн, д-р Згуро Баталов, дм в Катедра по пропедевтика на вътрешните болести към МУ-Пловдив и Клиника по ревматология, УМБАЛ „Каспела“.

Средната възраст на участниците е  $57.7 \pm 11$  години. Броят на жените е  $n=21$ , а мъжете са  $n=3$ . Извършено е проследяване на пациентите след шест месечно лечение. Те са разделени в две групи, според приложения терапевтичен протокол.

#### **Включващите критерии:**

- възраст  $\geq 18$  години, диагноза РА според класификационни критерии на ACR/EULAR 2010
- Активно заболяване, оценено с DAS (disease activity score)  $28 > 5.1$ .

#### **Изключващи критерии:**

- ревматологични заболявания, различни от РА
- тежки застойни сърдечно-съдови заболявания – сърдечна недостатъчност клас III-IV по NYHA, кор пулмонале и остри и хронични възпалителни заболявания
  - онкологични заболявания.

Контролна група - тринадесет здрави индивиди, отговарящи на следните критерии:

- Възраст над 18 год.
- Липса на възпалителни, автоимунни и онкологични заболявания.

Разпределението на пациентите и контролите е представено в Табл. 1

*Таблица 1. Разпределение на контролна група и болни с РА по пол и възраст*

Контролна група	Общ брой (n)=брой пациенти	Жени/Мъже	Средна възраст (години)
	n=13		9/4
Пациенти с РА	n=24	21/3	57.7 ± 11
	MTX (n=10)	MTX (9/1)	59.6 ± 10
	TOFA (n=14)	TOFA (12/2)	52.5 ± 8

Проучването е одобрено от Етична комисия към МУ-Пловдив с протокол № 4/08.06.2022. Изследването е проведено в съответствие с Декларацията от Хелзинки. Участниците са подписали информирано съгласие (Приложение 1).

#### 1.1.2. Биологични материали

##### 1.1.2.1. Изолиране на плазма, PBMCS, WBCs, РНК и синтез на кДНК

Всички новодиагностицирани пациенти са проследени преди терапия и шест месеца след прилагане на метотрексат (MTX) и тофацитиниб (TOFA). Направена е венепункция и са изолирани следните биологични материали:

## **Плазма**

От всеки пациент се взема венозна кръв в EDTA – Vacutainer monovette (6 ml), при спазване на всички условия за венепункция. След центрофугиране в продължение на 10 минути при 1800 rpm, плазмата се отделя и замразява при  $-80^{\circ}\text{C}$ , за последващи анализи.

## **Периферни мононуклеарни клетки (PBMCs)**

След отделяне на плазмата, слойт от кръвни клетки се смесва с 2 ml фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS) ( $\text{pH}=7,4$ ) и се наслоява върху Histopaque (Sigma-Aldrich,  $d=1,077 \text{ g/ml}$ ) в съотношение 1:1, за градиентно центрофугиране. Провежда се в продължение на 30 минути при 1800 rpm с минимално ускорение и забавяне.

## **Бели кръвни клетки (WBCs)**

За изолиране на WBCs е използван методът на студен лизис на еритроцити с лизиращ разтвор, съдържащ амониев карбонат, амониев хлорид и EDTA. Към клетъчната утайка, получена след плазменото отделяне, се добавя лизиращ разтвор. Следва инкубиране при  $4^{\circ}\text{C}$  за 10 минути и центрофугиране за 10 минути при 1800 rpm при  $4^{\circ}\text{C}$ . Цикълът се повтаря до пълното лизиране на еритроцитите. Утайката от белите кръвни клетки се ресуспендира в PBS и се центрофугира за 10 минути при 1800 rpm при  $4^{\circ}\text{C}$ . Получените WBCs се използват за изолиране на РНК.

Алгоритъмът за изолирането на плазма, PBMCs и WBCs е представен на Фиг. 1.



2000 при дължина на вълната 260/280 nm. Пробите са съхранени на -80°C до последващ синтез на кДНК.

## Синтез на кДНК чрез RT – PCR

кДНК е получена чрез реакция на обратна транскрипция. ДНК се транскрибира от 2 µg РНК с помощта на Genaxon GreenMasterMix (Genaxon bioscienceGmbH, Ulm, Германия, Lot. Ne. M3023) според инструкциите на кита.

Новосинтезираната кДНК служи за последващ анализ за генна експресия на YKL-40, YKL-39, IL-1β, IL-6, LAMP1, LAMP2, MPC.

Използван е търговски кит RevertAidtm H Minus First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), като е спазен протокола за синтез на първа верига кДНК. Изготвена е реакционна смес, съдържаща матрица от иРНК с различен обем, спрямо установена концентрация 2 µg/µl, свободна вода от нуклеази и неспецифични oligo dT праймери 0,5 µg/µl. Към всяка проба е добавен мастър микс, съдържащ 5x реакционен буфер – 4 µl, RiboLocktm рибонуклеазен инхибитор (20 U/ µl) - 1 µl, 10 mM dNTP mix – 2 µl и ензими обратна транскриптаза RevertAidtm H Minus M-MuLV (200 U/ µl) – 1 µl.

Реакционната смес се инкубира за 1 час при 42 °C, след което реакцията се стопира чрез нагриване на 70°C за 5 min. Синтезираната кДНК се съхранява на -20°C.

### 1.2. Клетъчно култивиране

#### 1.2.1. PVMCs

PVMCs се култивират в среда RPMI-1640 (Gibco CAT#P04-18000), допълнена с 10% FBS, 1% пеницилин/стрептомицин. Те се отглеждат за една нощ в 24-ямкови плаки в инкубатор при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и висока влажност. Жизнеспособността и броят на клетките се определят с помощта

на автоматизиран клетъчен брояч "LUNA" (Logos Biosystems, Anyang, Корея). Клетките незабавно са използвани за провеждане на метаболитен анализ.

### 1.2.2. SW982

SW982 е човешка синовиална саркомна клетъчна линия, получена от синовиалната тъкан на колянната става. Линията е закупена от ATCC (LOT: 70054119) и е култивирана в среда Leibovitz`s L-15, Sigma Aldrich (кат. № 30-2008, LOT: 0000282233) с 10% FBS, Sigma Aldrich (LOT: 0001660391) и 1% пеницилин/стрептомицин, Biotech (LOT: 763018). Хранителната среда L-15 е предназначена за CO<sub>2</sub>-независими култури, което налага клетките да се отглеждат при 37°C в инкубатор без CO<sub>2</sub>. Хранителната среда се сменя на всеки 2-3 дни. За експериментите са използвани клетки от пасажи 3 до 7.

## 2. Методи

### 2.1. Ултрасонографски методи

Ултрасонографската оценка на китки, длани и пръсти е извършена с ултрасонограф GE Logic E9 с ML6-15-D Matrix Array линейен трансдюсер за оценка на стави/сухожилия. Проведена е двуизмерна ултрасонография (B-mode/Gray Scale US) и Power Doppler US. Честотата на GSUS е 11-15 MHz в зависимост от изследваната става, GSUS gain е нагласен спрямо ставния регион и пациента, със средна стойност 50%. За PDUS са използвани следните настройки: честота 8,3 MHz; pulse repetition frequency (PRF) 600–800 Hz; PDUS gain се нагласяше в зависимост от ставния регион и пациента със средна стойност около 50%; нисък wall filter. Приложен е немския US7-скор. Изследвахме с GSUS и PDUS 7 стави от доминиращата клинично ръка/крак, които са по-оточни или болезнени, използвайки немския US7 скор (гривнена, втора и трета МКФ, втора и трета ПИФ стави, втора и пета МТФ стави) (Backhaus et al., 2009). Няколко параметра са измерени според

дефинициите и стандартизираните протоколи на Outcome measures in rheumatology (OMERACT), включително наличието на синовит, теносиновит и ерозии.

Всички изследвани структури са оценени чрез GSUS и PDUS. Теносиновит/ паратенонит и ерозии са документирани като налични (1) или отсъстващи (0). Скорът на GSUS синовит варира в диапазона 0-27, на GSUS теносиновит/паратенонит 0-7, на PDUS синовит 0-39, на PDUS теносиновит/паратенонит 0-21 и 0-14 за ерозиите. US7 скорът е изчислен като сума от общия GSUS скор за синовит, теносиновит/паратенонит и ерозии и PDUS скор за синовит и теносиновит.

## 2.2. Лабораторни методи

На кохортата пациенти с РА, с оглед диагностично уточняване, са изследвани клинично-лабораторните показатели ПКК, СУЕ, CRP, RF, анти-CCP (при диагностицирането и шест месеца след терапия).

Всички ултрасонографски изследвания и клинично-лабораторни анализи са проведени в УМБАЛ „Каспела“.

## 2.3. Метаболитен анализ на живи клетки в реално време

*Mito Stress Test*, официално обозначен като *Seahorse XF Cell Mito Stress Test* (каталожен номер 103015-100; Agilent Technologies), представлява стандартизирана аналитична платформа за функционална оценка на митохондриалната респирация в живи клетки. Методологията се базира на високочувствителни оптични измервания на скоростта на кислородна консумация (oxygen consumption rate, OCR), регистрирани в реално време чрез апаратура от серията *Seahorse XFp*. Тези устройства използват микрооптични кислородни сензори, интегрирани в т.нар. sensor cartridge, което позволява неинвазивно проследяване на динамичните промени в митохондриалната активност при строго контролирани клетъчни условия.

Аналитичната концепция на теста се основава на последователна фармакологична модулация на ключови елементи от митохондриалната електроннотранспортна верига. Тестовият комплект включва олигомицин (селективен инхибитор на комплекс V/АТР-синтазата), FCCP (протонно разединяващ агент, предизвикващ максимално стимулирана респирация на митохондриалния мембранен потенциал), както и комбинацията ротенон/антимицин А (инхибитори съответно на комплекс I и комплекс III). Добавянето на модулаторите се извършва автоматично чрез вградените инжекционни порти на устройствата от серията XF, което осигурява висока възпроизводимост, прецизност и елиминира експерименталната вариабилност, характерна за ръчните методи.

Типичният аналитичен профил на Mito Stress Test включва измерване на базална OCR, последвано от редукция на АТР-свързаната респирация след добавяне на олигомицин. Прилагането на FCCP индуцира максимална дихателна активност, което позволява определяне на максималната респирация и оценка на резервния респираторен капацитет. Финалният инхибиторен етап с ротенон/антимицин А елиминира митохондриалната кислородна консумация и дефинира нивото на немитохондриална респирация. Комбинацията от тези параметри дава възможност за изчисляване на ключови показатели като АТР, протонен теч, максимален и резервен респираторен капацитет и общо митохондриално функционално състояние.

Управлението на експерименталния протокол, мониторингът на сигналите и последващият количествен анализ се осъществяват чрез специализирания софтуер *Seahorse Wave*, предоставящ възможности за конфигуриране на инжекционни секвенции, автоматична калибрация на сензорния картридж и комплексна обработка на OCR кривите. За разширена статистическа обработка и визуализация могат да бъдат използвани и

облачните аналитични инструменти *Seahorse Analytics*, интегриращи алгоритми за нормализация, параметрична оценка и графични представяния на митохондриалните функционални индекси.

В този контекст *Seahorse XF Cell Mito Stress Test* се утвърждава като референтен метод за количествено определяне на митохондриалната функция, комбиниращ прецизна оптична технология, специфична фармакологична модулация и интегрирана цифрова аналитика. Това го прави подходящ както за фундаментални изследвания в областта на клетъчния метаболизъм, така и за приложни биомедицински анализи, включително фармакологичен скрининг, оценка на токсичност и метаболитно фенотипиране.

Ролята и ефектът на инхибиторите върху митохондриалната активност са обобщени в Таблица 2.

*Таблица 2. Роля и ефект на инхибиторите, използвани за определяне на митохондриалната активност.*

<b>Инхибитор</b>	<b>Роля</b>	<b>Ефект</b>
Олигомицин	Инхибира АТФ синтазата, намалява електронния поток през ЕТВ.	Намалява нивата на АТФ.
FCCP Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine	Нарушава митохондриалния мембранен потенциал.	Увеличава скоростта на клетъчната кислородна консумация.
Ротенон и Антимидин А	Инхибира комплекс III на ЕТВ.	Потиска митохондриалното дишане.

Биоенергетичният тест е представен графично на фигура 2.



Фигура 2. Графично представяне на Mito stress test

#### 2.4. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)

Плазмените нива на YKL-40, YKL-39, IL-1  $\beta$ , IL-6, LAMPs, MPC и 4-HNE са измерени за всички пациенти, контроли и супернатанти от всички третирания на SW982 клетки чрез ELISA, с търговски китове.

Методът се основава на количествения ензимно-свързан имуносорбентен сандвич анализ и е извършен съгласно инструкциите на производителя. **Моноклонално антитяло**, специфично насочено към търсения антигена е имобилизирано по дъното и стените на ямките на полистеренова 96 ямкова плака. В определените за целта ямки са накапани стандартите и контролите от кита, както и пробите за анализ. Следва инкубационен период, в който имобилизираното антитяло се свързва с антигена. След приключване на инкубацията, ямките се промиват с **Wash buffer**. Добавя се **вторично поликлонално антитяло**, срещу първичното антитяло, конюгирано с ензим **пероксидаза** или **алкална фосфатаза**.

Следва нов инкубационен период, през който вторичното антитяло свързва първичното антитяло в комплекс с антигена. Плаката се промива и в ямките се накапват с ензимен **субстрат**. Наблюдава се получаването на жълто оцветяване в следствие образуването на цветен продукт от взаимодействието на ензима със субстрата в ямките, съдържащи търсения антиген. Ензимната реакция се прекъсва с добавянето на **стоп разтвор**, при което се променя цвета на разтвора в ямките. Анализите са проведени в дубликат. Оптичната плътност е измерена при 450 nm на спектрофотометър TECAN SUNRISE. Коефициентите на вариация (CV) в рамките на анализа са 10%, а CV между анализите са <12%.

*Таблица 3. Основни характеристики на използваните ELISA търговски китове*

<b>Маркер</b>	<b>Диапазон</b>	<b>Линейност</b>	<b>Производител</b>	<b>Кат. №</b>
<b>YKL-40</b>	0-300 ng/ml	6.6/6.8	Quidel Corporation	8020
<b>YKL-39</b>	37.5-2400 pg/ml	4.4/6.6	CyrcuLex	CY-8087
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	5.0-50 ng/ml	4.2/6.2	LEGEND MAX	437007
<b>IL-6</b>	7.8-500 pg/ml	4.2/6.4	LEGEND MAX	430507
<b>LAMP1</b>	0.156-10 ng/ml	8/10	DEVELOP	DL-LAMP1- Hu
<b>LAMP2</b>	62.5-4000 pg/ml	10/12	DEVELOP	DL-LAMP2- Hu
<b>MPC</b>	0.156-10 ng/ml	8/10	Assay Genie	HUDL00356
<b>4-HNE</b>	31.25-2000 pg/ml	8/10	Assay Genie	HUFI01747

## 2.5. Количествена полимеразна верижна реакция (qPCR).

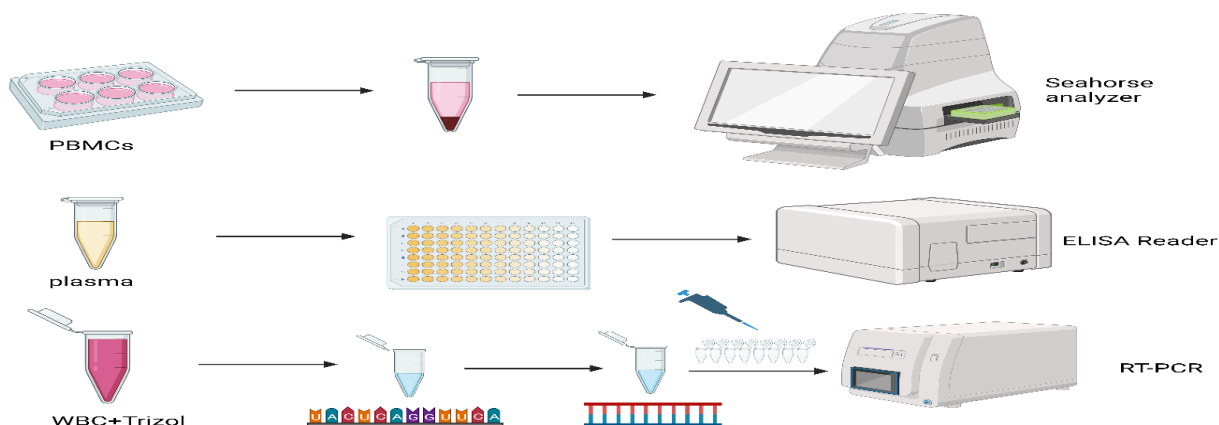
За да се направи оценка на генната експресия на маркерите, които са обект на интерес в проучването (YKL-40, YKL-39, IL-1 $\beta$ , IL-6, LAMP1, LAMP2, MPC), е проведен qPCR анализ. Приложени са подходящи праймерни сонди и референтни гени *hUBC*, *ACTIN*, *GAPDH*. За протичане на реакцията е използван мастър микс GreenMasterMix (2x) (Genaxxon bioscience GmbH, Germany), който включва SuperHotStart Taq DNA полимеразен ензим, PCR буфер, MgCl<sub>2</sub>, dNTP и Syber Green. Миксовете за всяка индивидуална реакция съдържат 1  $\mu$ l кДНК, 2  $\mu$ l прави и обратни праймери за съответните гени, 10  $\mu$ l GreenMasterMix (2x) и вода свободна от нуклази, като крайният работен обем е 20  $\mu$ l.

Анализът е проведен на апарат за количествен qPCR – RotorGene Q 6000. Използван е двустепенен режим на работа, стартиращ с иницираща денатурация - 15 min при 95 °C, 40 цикъла на денатурация -15 s на 95 °C, амплификация – 60 s на 58 °C и завършва с последно удължаване – 2 min. на 72 °C.

Таблица 4. Секвенции на използваните двойки праймери

Праймер	Прав	Обратен
<b>YKL-40</b>	5'-GAC CAC AGG CCA TCA CAG TCC-3'	5'-TGT ACC CCA CAG CAT AGT CAG TGT-3'
<b>YKL-39</b>	5'-CGGCAAGCTTACAAACTGGTTTGCTAC-3'	5'-ACATACGCGTCATCTTGCCTGCTTCT-3'
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	5'-CCA CAG ACC TTC CAG GAG AAT G-3'	5'-GTG CAG TTC AGT GAT CGT ACA GG-3'
<b>IL-6</b>	5'-CTA TGC ACT CCT TCT CCA CAA GCG-3'	5'-GGG CGG CTA CAT CTT TGG AAT C-3'
<b>LAMP1</b>	5'-CTC TAA TGT CTG CAG CTC AAG G-3'	5'-TGT ACA CAG CGC AGA ACA GG-3'
<b>LAMP2</b>	5'-ACA ACA GTG GAT CAG ACA GTA GG-3'	5'-AGC AGC AAG CAT CAG TTC TTC -3'
<b>MPC</b>	5'-CAATGGAAAAGGAAGAACAAGG-3'	5'-AGGCAGCAGAGAGTTGGTTTAG-3';
<b>ACTIN-<math>\beta</math></b>	5'-AGT GTG ACG TGG ACA TCC GGA-3'	5'-GCC AGG GCA GTG ATC TCC TCCT-3'
<b>GAPDH</b>	5'-AGG TCC ACC ACT GAC ACG TTG-3'	5'-AGC TGA ACG GGA TGC TCA CT-3'
<b>hUBC</b>	5'TCCTCAGGCAGAGGTTGATCTT-3'	5'-GGACCAAGTGCAGAGTGGACTCTT-3'

На Фигура 3 е обобщен алгоритъма на използваните методи.



Фигура 3. Алгоритъм на проведени изследвания за метаболитен анализ, генна и протеинова експресия

## 2.6. Високоефективна течна хроматография с мас детекция

Хроматографското разделяне се извършва чрез градиентно елуиране на аналитична колона Accucore™ RP-MS 100 x 2.1 mm, 2.6 µm пълнеж тип твърда сърцевина (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Колоната се temperира при 25°C. Подвижните фази В и D се състоят от 0.1% мравчена киселина в метанол и 0.1% мравчена киселина в метанол/вода (55:45, v/v). Хроматографското разделяне се постига чрез градиентно елуиране: 0-6 min 20% В, 6-8 min 20-95% В, 8-15 min 95-100% В, 15-16 min 20% В и задържане при 20% В до края. Общото време за работа е 30 минути. Thermo Xcalibur™ (V 2.2 SP1.48) е приложен за контрол на системата, събиране и обработка на данни. За откриване на аналита е използвана йонизация с електроспрей (HESI) в режим на отрицателна йонизация с оптимизирани параметри – напрежение на спрея – 3000; температура на изпарителя 280°C; обгръщащ газ, 40 единици; капилярна температура 275°C. Депротонираните аналитични молекули и вътрешни стандарти са приложени като прекурсорни йони за селективен мониторинг на реакцията (SRM) с преход от  $m/z$  353 → 193 за 8-isoPGF2alpha и 357 →

197 за 8-isoPGF2alpha-d4. Като колизионен газ се използва аргон; енергията на сблъсък е 28 V. Концентрацията е изчислена с помощта на метода на изваждане на фона (Tomova Z. et al., 2022). Допълнителни характеристики на метода са калибровъчен диапазон 25 - 329 pg/mL, линейност ( $R^2$ ) > 0.995, LOD = 10 pg/mL, LLOQ = 25 pg/mL, нормализиран матричен ефект - в рамките на 89.7 и 113.5%, прецизност на възстановяване в серия между 2.3 - 4.4%, и между сериите 2.4 и 5.4%, стабилност при замразяване-размразяване между 89.7 и 106.6% и пост-препаративна стабилност - между 102.6 - 113.2%. Всички измервания са извършени чрез системата Dionex Ultimate 3000 LC, състояща се от кватернерна помпа, автосамплер и колонен термостат, свързан към TSQ Quantum Access Max троен квадруполен масспектрометър (Thermo Fisher Scientific, MA, САЩ). Методът е извършен благодарение на разработката и адаптирането му към дизайна на изследването от д-р Десислав Томов, дм.

### 2.7. *In vitro* проучване върху синовиална сертифицирана клетъчна линия SW982

За да сравним и допълним проведените изследвания *in vivo* при пациенти с РА, проведохме проучване върху сертифицирана синовиална клетъчна линия SW982. С извършените анализи оценихме влиянието на два от най-прилаганите терапевтични протоколи за контролиране на РА (MTX и TOFA) върху клетъчната линия *in vitro*. Анализирахме ефекта върху маркери за митохондриална функция, възпаление и оксидативен стрес.

### 2.7.1. Оценка на клетъчната виталност - МТТ анализ

За да изберем точните концентрации за последваща оценка на ефекта на МТХ и ТОФА върху митохондриалната функция и оксидативния стрес в клетъчния модел, направихме МТТ анализ. МТТ-тестът е колориметричен метод, използван за измерване на клетъчната жизнеспособност, пролиферация и цитотоксичност. Метаболитно активните живи клетки трансформират жълтата тетразолиева сол МТТ в лилави формазанови кристали, разтворими в DMSO, катализирани от митохондриални дехидрогенази.

Клетките SW982 се посяват при плътност от  $2 \times 10^4$  клетки/ямка в 96-ямкови плаки за клетъчна култура.

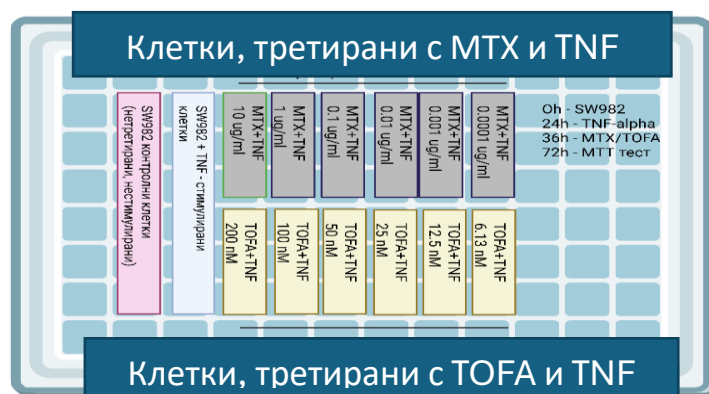
TNF- $\alpha$  се използва за индуциране на възпаление в клетъчната линия, за да се имитира модел на РА. Двадесет и четири часа след стимулация, клетките се проследяват морфологично. Наблюдаваната пролиферация се документира микроскопски.

SW982 са култивирани за 24 часа и след това са инкубирани с TNF- $\alpha$  при концентрация от 10 ng/ml за следващите 24 часа. Следва прилагане на МТХ и ТОФА в шест различни концентрации за 24 часа. След третирането с лекарствата, разтворът на МТТ се добавя към ямките при крайна концентрация от 0,5 mg / ml и клетките се инкубират в продължение на 3 часа при 100% атмосферен въздух при 37 ° C. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично при 490 nm на Tecan SUNRISE.

Абсорбцията на контролните нетретираните клетки се приема за 100%, а клетъчната жизнеспособност на третираните проби е калкулирана по формулата: % = (А от експерименталните ямки/А от контролните ямки)  $\times$  100.

След проведения МТТ тест и на база предварителни проучвания в научната литература концентрациите на МТХ и ТОФА, които използвахме за следващите експерименти следните крайни концентрации - 1  $\mu\text{g/ml}$  МТХ и 100 nM ТОФА. И двете концентрации са в съответствие с разрешените *in vivo* дози за приложение на терапевтиците (Dowty ME. et al., 2019) и осигуряват жизнелост на клетките от около 87%. В нашия експериментален дизайн целта не е да индуцираме клетъчна смърт, а да оценим специфичния биологичен ефект на даден стимул, лекарствен агент или модулатор при условия на висока клетъчна виталност. Ето защо се използват субцитотоксични концентрации, които запазват нормалната физиологична активност на клетките. По този начин се осигурява стабилна клетъчна популация, минимизира се фоновият стрес и се избягват неспецифични ефекти, произтичащи от увредените или умиращи клетки. Дизайнът на анализа е представен на Фиг. 4.

В допълнение към МТТ теста, е оценена клетъчната жизнеспособност чрез автоматизиран клетъчен анализатор LUNA.



Фигура 4. Дизайн на МТТ тест

### 2.7.2. Третиране на клетъчната култура с MTX и TOFA

Концентрацията от 1  $\mu\text{g/mL}$  MTX е избрана въз основа на публикувани фармакокинетични данни при пациенти с РА.

Концентрацията от 100 nM TOFA е избрана въз основа на нейния фармакокинетичен профил и докладваната *in vitro* активност. MTX, Cayman (Кат. № 22378) е използван в следните концентрации: 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001  $\mu\text{g/ml}$ .

- TOFA, Cayman (Кат. № 25046) е приложен в концентрации: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,13 nM.

Концентрациите на двете лекарства са съобразени с публикуваните данни (Dowty ME. et al., 2019). Те са в съответствие с разрешената доза, за да имитират *in vivo* приложението. Ние разширихме обхвата им, като добавихме още две концентрации към най-ниската и към най-високата концентрации, цитирани в наличната литература.

### 2.7.3. Оценка на митохондриална функция

Метаболитният анализ е осъществен съгласно описания протокол (виж 2.3.). След оценка на клетъчната жизнеспособност и броя на клетките, плаките се посяват при концентрация от  $2 \times 10^4$  клетки/ml в основна среда на Leibovitz L-15. На следващия ден клетъчната култура се визуализира с помощта на инвертен микроскоп, за да се провери стабилното разпределение на клетките и прилепването им към ямките. След това, част от клетките се третират в продължение на 24 часа с 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , за да се предизвика възпаление. Терапевтиците в съответните концентрации се добавят след 24 часа. Култивирането с лекарствата продължава още 24 часа.

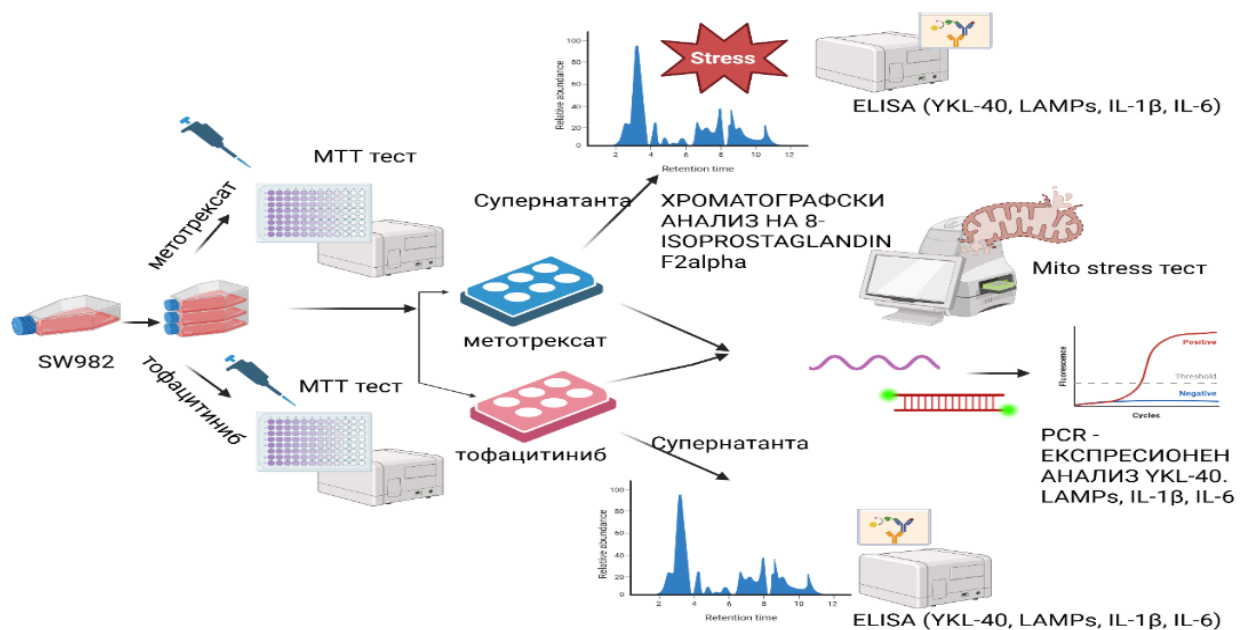
Непосредствено преди анализа, основната културална среда е заменена с RPMI1640–Seahorse. Тестът е проведен три пъти в

последователни серии с най-стриктно изпълнение на една и съща експериментална процедура.

#### 2.7.4. Високоэффективна течна хроматография с мас детекция за определяне на 8-IS.OPGF2alpha

Клетъчна линия SW982 се посява в 6-ямкови плаки при концентрация от  $2 \times 10^5$  клетки/ямка. Те се стимулират с TNF- $\alpha$  и третиран с MTX и TOFA, аналогично на предишните тестове. Супернатантите са събрани, както следва: 1- контролната SW982 клетъчна линия, 2- клетки, стимулирани с TNF- $\alpha$ , и 3,4- клетъчния модел, третиран и с двата терапевтика. Използвани се за последващ хроматографски анализ.

Работният процес при *in vitro* анализите с клетъчна линия SW982 е обобщен на Фиг. 5.



Фигура 5. Алгоритъм на работа при *in vitro* проучване с клетъчна линия SW982

### 3. Статистически анализ

Анализът на данните е проведен чрез статистически програма Graph Pad Prism 10 и Wave. Използвани са различни алгоритми за оценка, сравнение и корелации между отделните клиничко-лабораторни, енергийни и молекулни параметри. Статистическите анализи са подбрани според разпределението на данните.

Получените резултати от *in vitro* проучването са статистически обработени чрез софтуера Graph Pad Prism, версия 10. За сравнения в рамките на групите е използван еднофакторен ANOVA с post-hoc Tukey тест. Нивата на статистическа значимост на нулевата хипотеза са  $p < 0,05$ . Данните от метаболитния анализ са обработени с помощта на софтуера Wave.

Резултатите от генната експресия бяха анализирани чрез метода  $\Delta\Delta Ct$ , като експресията на таргетните гени беше нормализирана спрямо три вътрешни контролни гена. Получените  $\Delta Ct$  стойности бяха сравнявани с тези на контролната група, а относителните нива на експресия бяха изчислявани чрез  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## V. Резултати

### 1. *In vivo* проучване при пациенти с РА на два терапевтични режима

#### 1.1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ И УЛТРАСОНОГРАФСКИ ДАННИ

Следвайки целта на проучването, първоначално е подбран контингент от болни с РА, при спазване на изискванията и класификацията на EULAR 2010. Извършени са физикален преглед, клиничко-лабораторни изследвания, включващи СУЕ, CRP, RF, анти-CCP. Пациентите са оценени ултрасонографски чрез скалата GUS7 на база брой оточни стави и с DAS28/CRP за определяне на болестната активност. Всички показатели са отчетени при поставяне на диагнозата РА и шест месеца след провеждане на лечението. Данните са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Средни стойности на клиничко-лабораторни параметри и ултрасонографски данни преди и след терапия с MTX и TOFA

Параметър	Преди терапия (Mean ± SD)	След терапия с MTX (Mean ± SD)	След терапия с TOFA (Mean ± SD)
<b>CRP (mg/l), &lt; 5</b>	51.62 ± 12.9	32.7 ± 4.9	27.6 ± 2.6
<b>RF (IU/ml), &lt; 10</b>	36.06 ± 8.2	10.17 ± 3.35	6.43 ± 1.28
<b>ESR (mm/h), &lt; 15</b>	129.4 ± 25.77	87.18 ± 29.09	69.84 ± 11.5
<b>Anti-CCP-Ab (IU/ml), &lt; 17</b>	739.9 ± 157	471.8 ± 430.2	271.7 ± 172.5
<b>DAS28/CRP, score</b>	5.63±0.16	3.59±0.23	3.50±0.20
<b>GUS7 score, (0- 108)</b>	26.06 ± 1.65	11.29 ± 1.08	10.29 ± 0.90

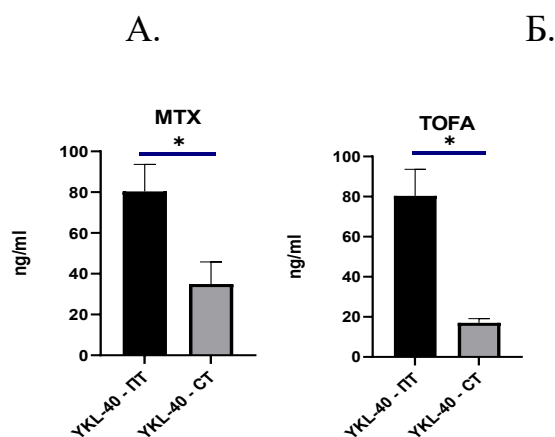
Легенда: DAS28/CRP, ремисия  $\leq 2.6$ , Ниска болестна активност  $> 2.6 - 3.2$ , Средна болестна активност  $> 3.2 - 5.1$ , Висока болестна активност  $> 5.1$

Наблюдава се очаквано подобрене на клиничко-лабораторните параметри след лечение. При сравнение на двата терапевтика се установява по-значително повлияване на показателите след прилагане на TOFA. Този извод е основан на сравнение на средните стойности, без провеждане на статистическа оценка на разликите.

1.2. Генна и протеинова експресия на маркери за възпаление (YKL-39, YKL-40, IL-1, IL-6), автофагия (LAMP1, LAMP2), оксидативен стрес (4-HNE) и митохондриален статус (MPC)

Изследвани са експресионните нива на избрани биомаркери, свързани с възпаление, автофагия и окислителен стрес, както на генно, така и на протеиново ниво.

При анализа на плазмените концентрации на YKL-39 преди (1.73 ng/ml) и след (2.98 ng/ml) провеждане на терапия с MTX не се установява статистически значима промяна ( $p=0.06$ ), както и при третиране с TOFA – преди (1.73 ng/ml) и след (2.14 ng/ml;  $p=0.23$ ), което предполага, че този биомаркер не се повлиява съществено от лечението с използваните терапевтични средства. За разлика от него, нивата на YKL-40 демонстрират очаквано понижение след терапевтична интервенция и с двата прилагани медикамента. Този спад е по-изразен при пациентите, лекувани с TOFA (от 80.35 ng/ml на 17.05 ng/ml), което може да свидетелства за по-силен противовъзпалителен ефект на този клас лекарства спрямо алтернативната терапия с MTX, при която след лечение стойностите на YKL-40 са 35 ng/ml. Резултатите са представени във Фиг. 6.



Фигура 6. Плазмени нива на YKL-40 преди и след терапия с MTX (A) и TOFA (B)

Легенда: ПТ- преди терапия; СТ - след терапия;

\*  $p < 0.05$ ; Резултатите са представени, като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение

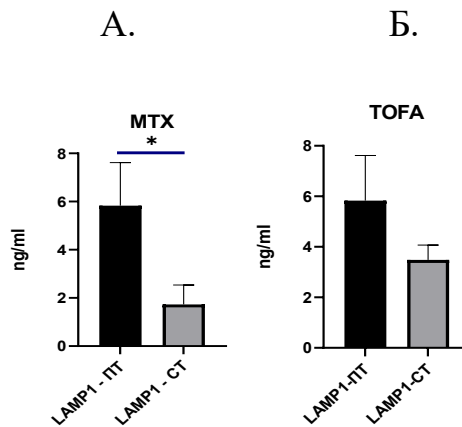
С цел отчитане на възпалителния отговор са определени плазмените нива на два ключови провъзпалителни цитокина: интерлевкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и интерлевкин-6 (IL-6). Получените резултати показват тенденция към понижение в концентрациите им след проведеното лечение и в двете изследвани групи, като обаче разликите при пациенти лекувани с МТХ не достигат статистическа значимост (Таблица 6). Наблюдаваните промени са в съответствие с установеното понижение на нивата на YKL-40 след терапия с използваните медикаменти.

Таблица 6. Плазмени нива на IL-1 $\beta$  и IL-6 преди и след терапия с МТХ и ТОФА

Параметър	Пациенти с РА преди терапия	Пациенти след терапия с МТХ	Статистическа значимост „р“	Пациенти след терапия с ТОФА	Статистическа значимост „р“
IL-1 $\beta$ , pg/ml	1.53 $\pm$ 0.6	0.99 $\pm$ 0.4	0.9	0.32 $\pm$ 0.2	0.03*
IL-6, pg/ml	46.42 $\pm$ 1.2	26.55 $\pm$ 0.2	0.16	29.95 $\pm$ 1.0	0.4

Легенда: Данните са представени като средни стойности в група  $\pm$  стандартно отклонение

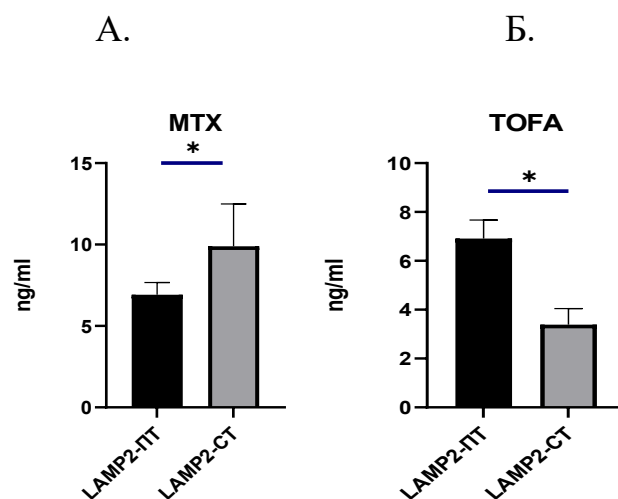
За оценка на автофагичните процеси са изследвани LAMP молекулите. Данните за плазмените им концентрации показват понижение на LAMP1 след терапия, като статистическа значимост се наблюдава при пациенти лекувани с МТХ (p=0.02) (Фиг. 7А). Аналогична тенденция се забелязва при болни на терапия с ТОФА (Фиг. 7Б). Легенда: Данните са представени като средни стойности в група  $\pm$  стандартно отклонение.



Фигура 7. Плазмени нива на LAMP1 преди и след терапия с MTX (A) и TOFA(Б)

Легенда: ITT – преди терапия; CT – след терапия, \*  $p < 0.05$ ; Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение

На Фиг. 8 са представени нивата на LAMP2 при пациенти, лекувани с MTX и TOFA, преди и след терапия. При пациенти, третирани с MTX, се наблюдава тенденция към повишаване на нивата на маркера след лечение от 6.9 ng/ml на 9.9 ng/ml ( $p=0.04$ ). От друга страна, в групата на болните, третирани с TOFA, се установява статистически значим спад на LAMP2 след терапия от 6.9 ng/ml на 3.9 ng/ml ( $p=0.03$ ). Това предполага възможна асоциация с ефекта на лечението върху автофагичните процеси.



Фигура 8. Плазмени нива на LAMP2 преди и след терапия с MTX (А) и TOFA (Б)

Легенда: ПТ - преди терапия; СТ - след терапия, \*  $p < 0.05$ ; Резултатите са представени като средни стойности  $\pm$  стандартно отклонение

За нас представляваше интерес дали и как се променя оксидативният стрес при пациенти с РА, в зависимост от използваната терапия. Изследвахме 4-HNE като един от утвърдените показатели за оценка на окислителен стрес. Нашите данни не показват значителна динамика в средните стойности след терапията с двата медикамента (Таблица 7).

За да определим метаболитния статус на пациентите с РА, приложихме метод, считан за златен стандарт при оценката на митохондриалната функция. Преди това, обаче, проследихме MPC – биомаркер, който участва в транспортирането на пируват през вътрешната митохондриална мембрана, подготвяйки го за включване в реакцията, катализирана от пируват дехидрогеназния комплекс. Интересна находка в полза на терапията с TOFA е повишаването на нивата на MPC след лечението, докато при пациенти, лекувани с MTX, протеинът не беше отчетен в плазмата (Таблица 7). Това наблюдение предизвика значителен

научен интерес, което ни мотивира да потърсим потенциална корелация между нивата на MPC и специфични митохондриални параметри.

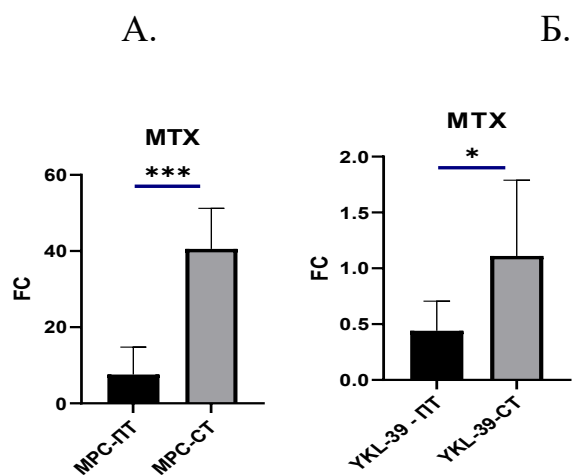
*Таблица 7. Стойности на 4-HNE и MPC преди и след терапия с MTX и TOFA*

Параметър	Пациенти с РА преди терапия	Пациенти след терапия с <i>MTX</i>	Статистическа значимост „р“	Пациенти след терапия с <i>TOFA</i>	Статистическа значимост „р“
<b>4-HNE, pg/ml</b>	1465.5 ± 78	1462 ± 49.9	0.5	1439 ± 36	0.7
<b>MPC, ng/ml</b>	0.12 ± 0.05	0	0.01*	0.18 ± 0.09	0.2

*Легенда: Данните са представени като средни стойности в група ± стандартно отклонение*

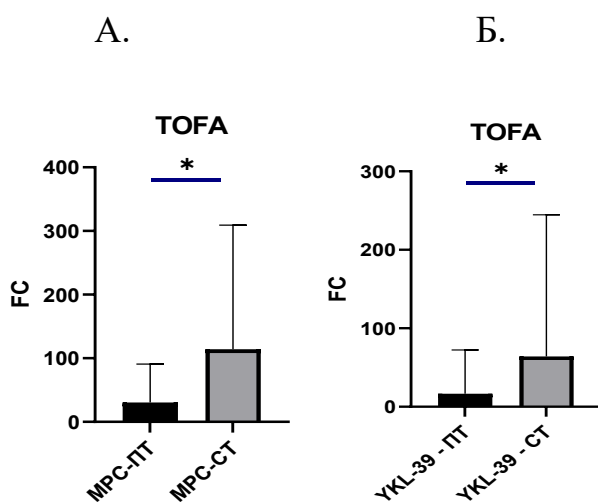
След като определихме плазмените нива на YKL-39, YKL-40, IL-1, IL-6, LAMP1, LAMP2, 4-HNE, MPC, пристъпихме към оценка на генната експресия на същите маркери при двата терапевтични режима.

След обобщаване на данните от експресионните анализи, изразени като fold change (FC), се установи статистически значимо повишение при MPC и YKL-39 и при двете терапии (Фиг. 9) и (Фиг. 10).



Фигура 9. Генна експресия на MPC (А) и YKL-39 (Б) преди и след терапия с MTX

Легенда: ИТТ – преди терапия; СТ – след терапия, \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$



Фигура 10. Генна експресия на MPC (А) и YKL-39 (Б) преди и след терапия с TOFA

Легенда: ИТТ - преди терапия; СТ - след терапия, \*  $p < 0.05$ ;

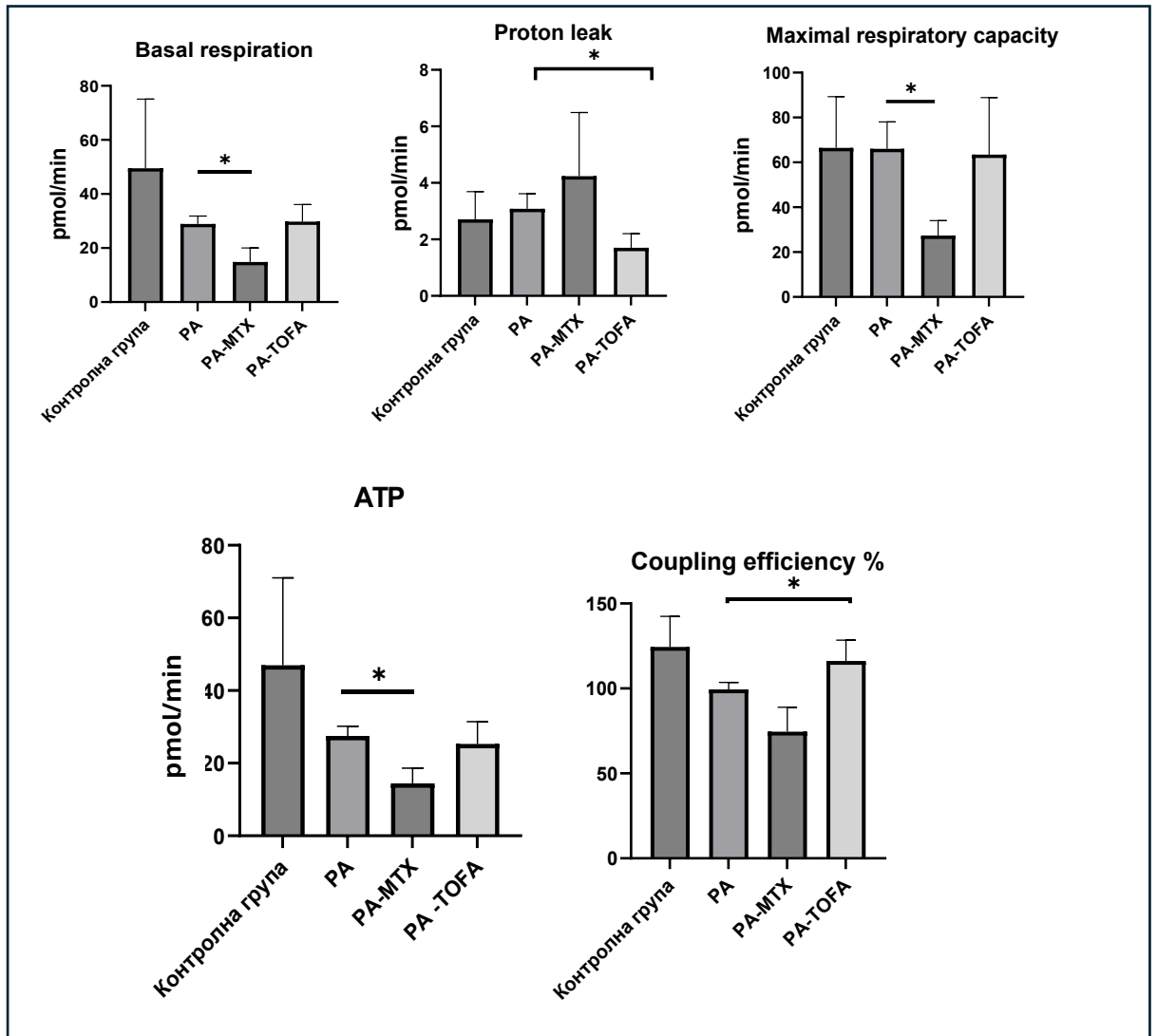
### 1.3. Оценка на клетъчния метаболизъм

В изпълнение на последната задача, оценка на митохондриалната активност, проведохме метаболитен тест върху РВМСs при здрави лица и

при пациенти с РА, преди и след съответното лечение. За целта използвахме три инхибитора, които постепенно блокират ЕТВ и позволяват изчисление на няколко ключови параметъра на митохондриалната функция. След анализиране на данните при пациенти на ТОФА, се открива редукция на протонното изтичане ( $p=0.03$ ). Установява се повишен Coupling efficiency % ( $p=0.05$ ), показател отразяващ АТФ в %, нормализиран спрямо базалното дишане на РВМСs.

При болните, третирани с МТХ, се наблюдава спад в три основни показателя – базално дишане ( $p=0.03$ ), максимално респираторно дишане ( $p=0.05$ ) и произведен АТФ ( $p=0.03$ ). Тези данни показват понижена митохондриална функция, обратно на очакванията, въпреки повишената генна експресия на МРС. Този резултат заслужава по-задълбочено изследване, за да се изяснят точните механизми на митохондриалния статус при лечение с МТХ.

За да се анализира динамиката на параметрите, е проведен ANOVA тест за сравнение на четири групи, а именно: контролна, пациенти с РА - преди стартиране на терапия, пациенти след лечение с МТХ, и болни, третирани с ТОФА. Резултатите са представени на Фиг. 11.



Фигура 11. Сравнителен междугрупов анализ за АТФ продукция, базално дишане, протонно изтичане, максимален дихателен капацитет и Coupling efficiency % показател отразяващ АТФ в %, нормализиран спрямо базалното дишане.

Легенда: Данните са представени като средни стойности в група  $\pm$  стандартно отклонение

**PA** - пациенти с PA, **PA - MTX** – пациенти с PA, третирани с MTX

**PA - TOFA** - пациенти с PA, третирани с TOFA

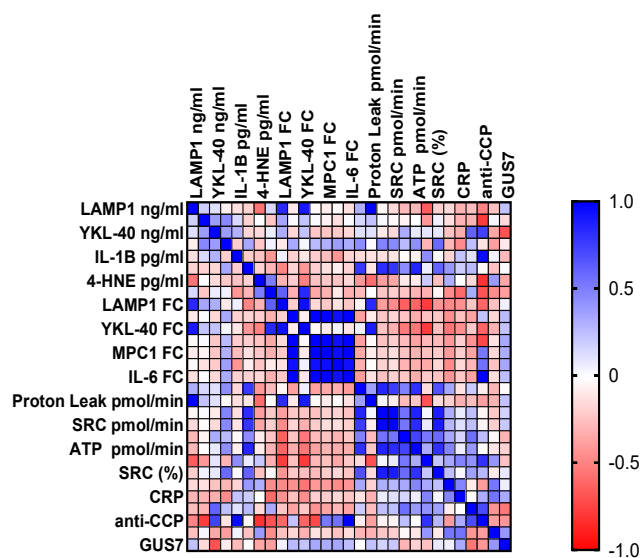
#### 1.4. Корелационен анализ

Потърсени са корелационни зависимости между клинично-биологичните индикатори, ултрасонографските данни и митохондриалните параметри преди и след проведените терапии.

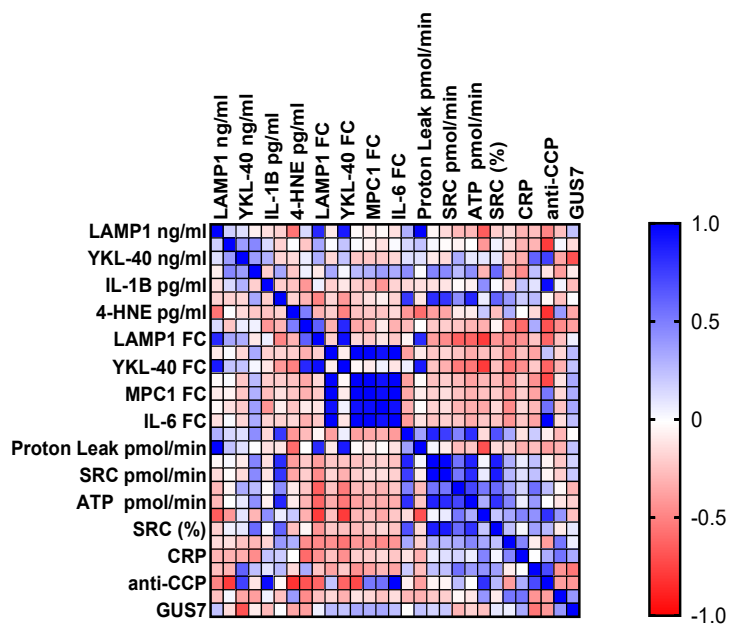
При лечение с TOFA се наблюдават корелации между различни биомаркери и клинични параметри. Преди терапия се установяват умерена положителна корелация между YKL-40 и SRC ( $r_s = 0.458$ ,  $p = 0.032$ ), умерена отрицателна корелация между 4-HNE и SRC ( $r_s = -0.445$ ,  $p = 0.043$ ), висока положителна корелация между генната експресия на YKL-40 и SRC ( $r_s = 0.715$ ,  $p = 0.003$ ) и значителна положителна корелация между MPC и SRC ( $r_s = 0.615$ ,  $p = 0.013$ ) (Фиг. 12А). Допълнително се доказват умерена положителна корелация между RF и YKL-40 ( $r_s = 0.615$ ,  $p = 0.019$ ) и умерена отрицателна корелация между 4-HNE и LAMP1 ( $r_s = -0.545$ ,  $p = 0.044$ ).

След терапия се установява много висока положителна корелация между LAMP1 и протонното изтичане ( $r_s = 0.992$ ,  $p < 0.0001$ ) и значителна положителна корелация между YKL-40 и GUS7 ( $r_s = 0.680$ ,  $p = 0.007$ ) (Фиг. 12Б).

A.



Б.



Фигура 12. Корелационен матрикс между клиничко-биологичните индикатори, ултрасонографските данни и митохондриалните параметри преди (А) и след (Б) терапия с TOFA.

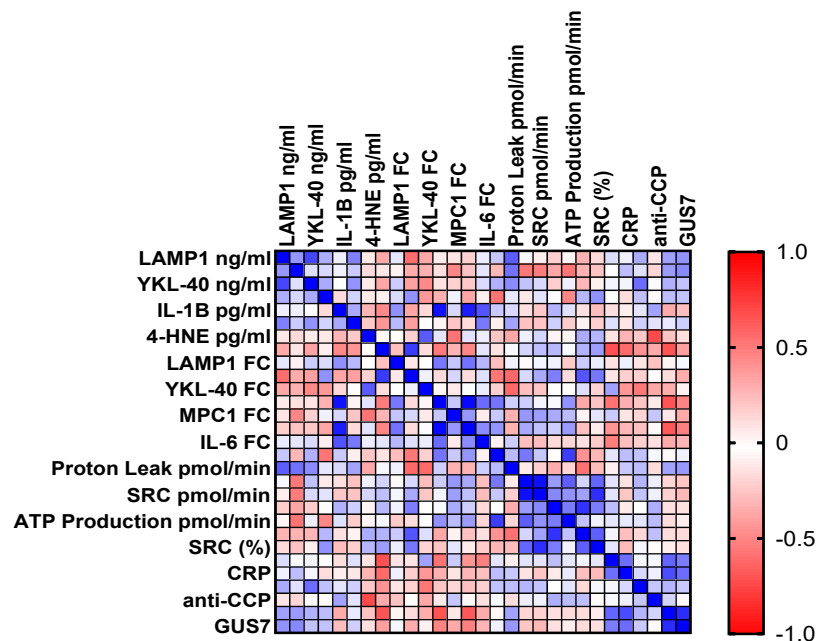
Легенда: SRC- резервен дихателен капацитет

В групата на пациенти, лекувани с МТХ, се наблюдават корелации между различни биомаркери и клинични показатели. Преди терапия се установяват висока положителна корелация между YKL-40 и LAMP1 ( $r_s = 0.724$ ,  $p = 0.00004$ ), значителна положителна корелация между CRP и GUS7 ( $r_s = 0.576$ ,  $p = 0.003$ ) и умерена отрицателна корелация между YKL-39 и базално дишане ( $r_s = -0.544$ ,  $p = 0.009$ ).

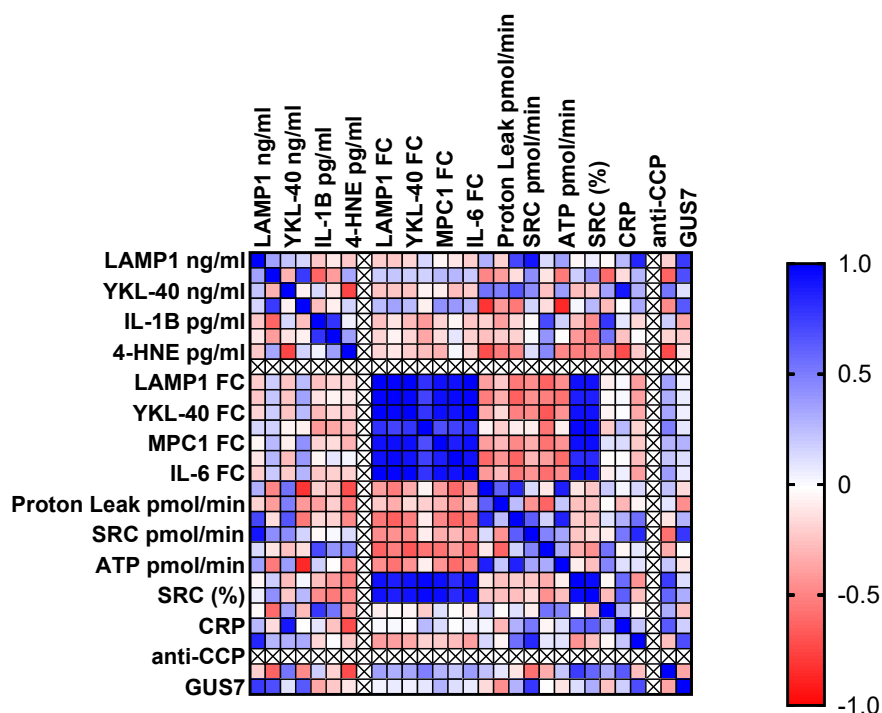
След лечение се наблюдават висока отрицателна корелация между YKL-40 и 4-HNE ( $r_s = -0.730$ ,  $p = 0.017$ ), висока положителна корелация между YKL-39 и LAMP2 ( $r_s = 0.772$ ,  $p = 0.009$ ), както и висока отрицателна корелация между CRP и 4-HNE ( $r_s = -0.703$ ,  $p = 0.023$ ).

Всички резултати са визуализирани чрез корелационен матрикс, представен на Фиг. 13, който демонстрира силата и посоката на зависимостите преди и след терапия с МТХ.

A.



Б.



Фигура 13. Корелационен матрикс между клинично-биологичните индикатори, ултрасонографските данни и митохондриалните параметри преди (А) и след (Б) терапия с МТХ

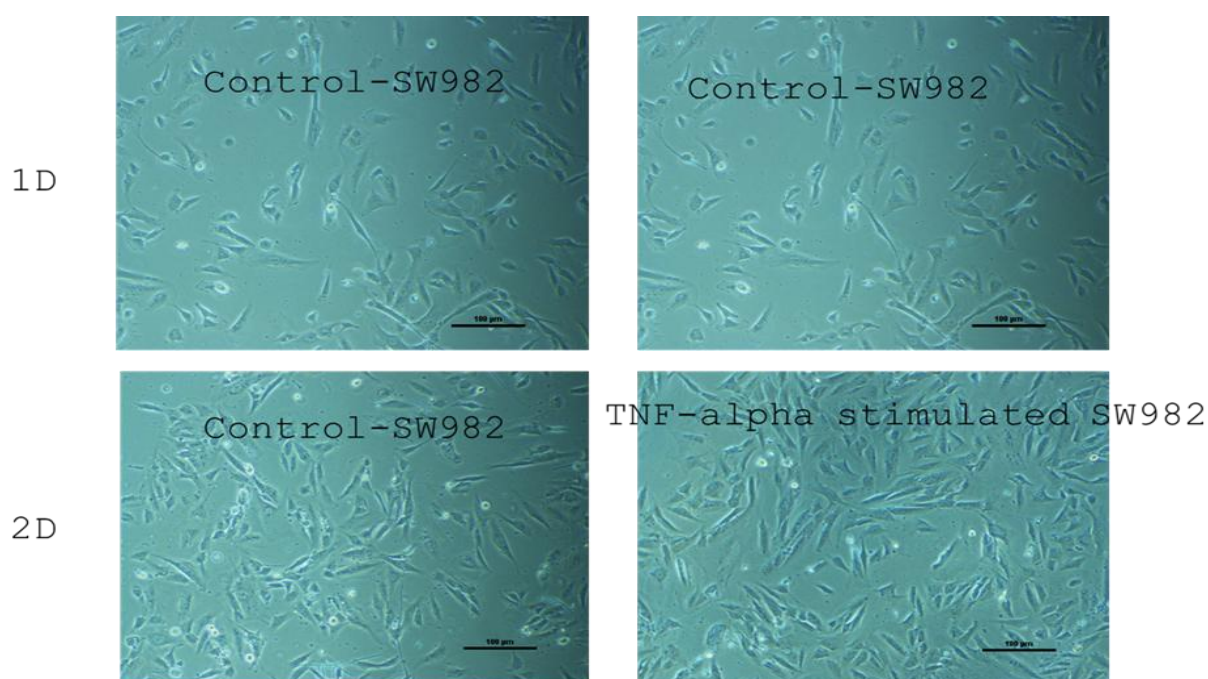
Легенда: SRC- резервен дихателен капацитет

## 2. *In vitro* проучване върху моделна клетъчна линия SW982

За да проследим процесите на клетъчно ниво, пресъздадохме артритен модел върху синовиална клетъчна линия SW982, чрез стимулиране с TNF- $\alpha$ . Третирането на клетките с МТХ и ТОФА е съобразено с *in vivo* дозите и анализите следват същия алгоритъм.

## 2.1 Оценка на клетъчната гъстота - след третиране с TNF- $\alpha$

Микроскопският анализ разкри значителна гъстота на клетките 24 часа след стимулирането им с TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), в сравнение с контролната група. Морфологични промени в клетките не се наблюдават; установява се единствено нарастване на конфлуентността. Представените микрофотографии илюстрират морфологичното състояние на клетките в началния момент (конфлуентност – 30%) и пролиферативния ефект 24 часа след експозицията – (конфлуентност – 85%) (Фиг. 14).



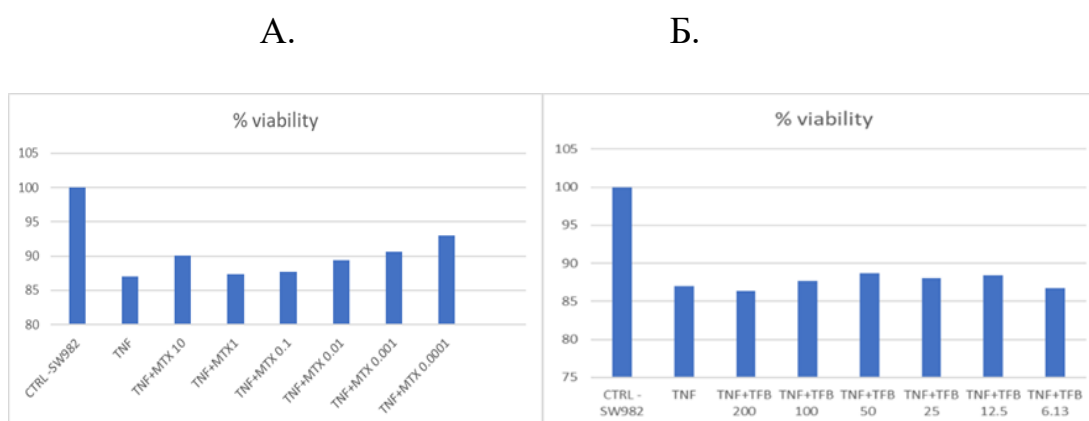
Фигура 14. Микроскопска оценка на пролиферацията на клетъчна линия SW982 след стимулиране с TNF- $\alpha$

## 2.2. МТТ тест за цитотоксичност

За да стартираме с анализите, първоначално тествахме клетъчния модел с МТТ-тест за цитотоксичност на използваните терапевтици. SW982 клетки са третирани с различни концентрации на МТХ и ТОФА в продължение на 24 часа след предварително 24 часово стимулиране с 10 ng/mL TNF- $\alpha$ . Клетъчната жизнеспособност след двете третирувания (Фигура

15) варира между 86 и 100%, което доказва липсата на цитотоксичност на лекарствата в концентрациите, използвани върху клетъчния модел.

Данните от автоматичното апаратно броене показват сравнима дозо-зависима тенденция между измерванията с МТТ и трипаново синьо, което потвърждава валидността на нашите наблюдения.

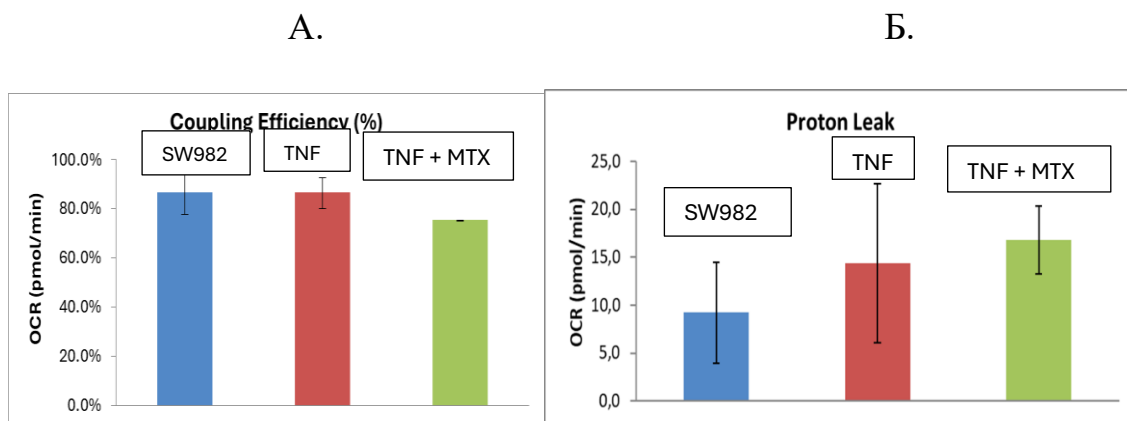


Фигура 15. МТТ тест - Виталност (%)

Легенда: *TNF- $\alpha$* -стимулирани SW982 клетки след третиране с MTX (10, 1, 0.1, 0.1, 0.001, 0.0001  $\mu\text{g/ml}$  (А) и TOFA (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.13 nM) (Б)

### 2.3. Митохондриална функция (Mito Stress Test)

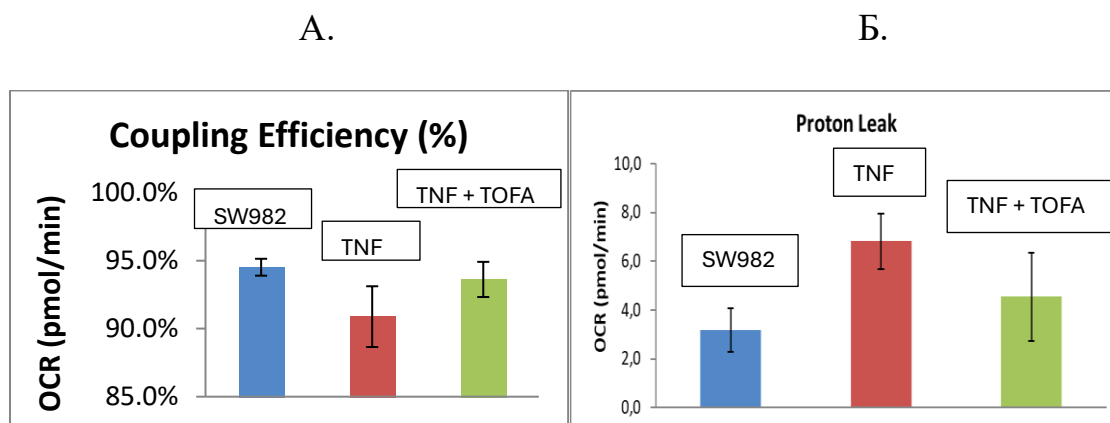
За да се определи как приложените терапевтични средства влияят на митохондриалната функция в синовиалната клетъчна линия, е проведен Mito Stress Test. Данните показват намалено производство на АТФ (%) ( $p=0.013$ ) (Фигура 16А) и повишени нива на изтичане на протони ( $p=0.0011$ ) (Фигура 16 Б) в третираните с MTX клетки в сравнение с клетки, стимулирани само с *TNF- $\alpha$* .



Фигура 16. Coupling efficiency (%) (ATФ%) (А) и Proton leak (pmol/min) (Б) при SW982 клетъчна линия

Легенда: Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SD; Ефективността на свързване % е производството на АТФ в %, нормализирано върху базалното дишане. Сини - контролни SW982 клетки (нетретирани, нестимулирани), червени - TNF- $\alpha$  - стимулирани SW982 клетки и TNF- $\alpha$  - стимулирани SW982 клетки, третирани с MTX - 1  $\mu$ g/ml.

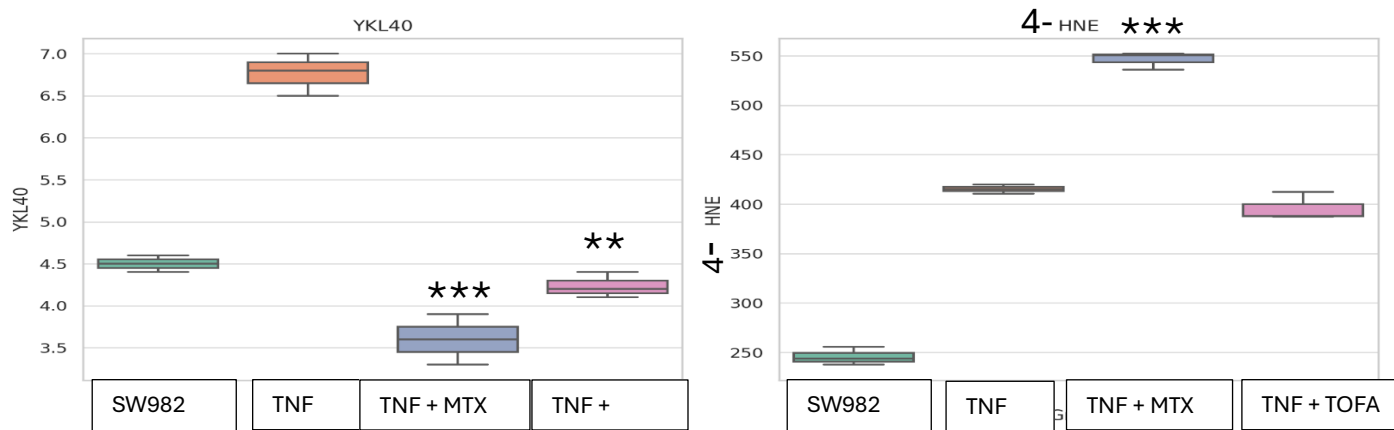
Обратната тенденция, повишено ниво на АТФ ( $p=0.0018$ ) (Фигура 17 А.) и намаляване на изтичането на протони ( $p=0.0001$ ) (Фигура 17 Б.) се наблюдава в клетки, третирани с TOFA.



Фигура 17 В. Coupling efficiency (%) (АТФ %) (А) и Proton leak (pmol/min) (Б) при SW982 клетъчна линия

Легенда: Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SD; Ефективността на свързване % е производството на АТФ в %, нормализирано към основното дишане; Сини - контролни SW982 клетки (нетретирани, нестимулирани), червени - TNF- $\alpha$  стимулирани SW982 клетки и TNF- $\alpha$  стимулирани SW982 клетки, третирани с TOFA – 100nM.

## 2.4 Секретомен анализ на супернатанти от третирани клетки SW982



Фигура 18. Нива на YKL-40 и 4-HNE в супернатанта от клетъчна линия SW982

Легенда: Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение.

Установена е редукция на YKL-40, след третиране с MTX ( $p=0.0003$ ) и TOFA ( $p=0.002$ ) и повишени нива на 4-HNE, след въздействие с MTX ( $p=0.0001$ ). Данните са обобщени в таблица 8.

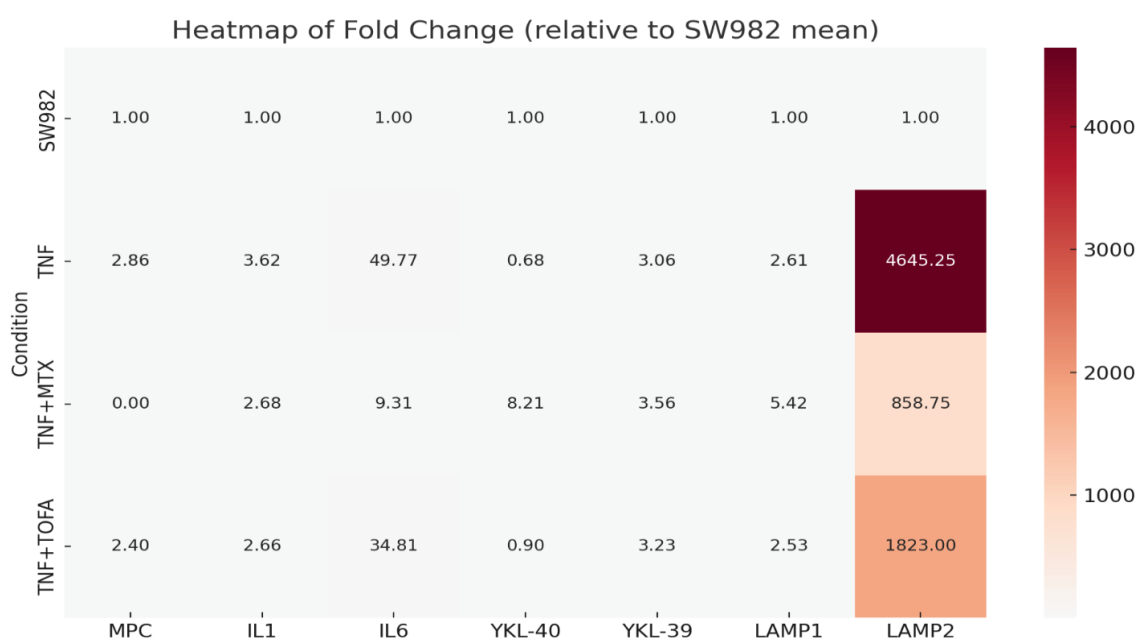
Таблица 8. Числови стойности от секретомен анализ - *in vitro* експеримент

	<i>YKL-40, ng/ml</i>	<i>4-HNE, pg/ml</i>
<b>SW982</b>	4.5±0.6	255.6±12.6
<b>SW982+TNF</b>	6.7±0.5	410.5±11.0
<b>SW982+MTX</b>	3.6±0.09	550.5±18.9
<b>SW982+TOFA</b>	4.1±0.2	398.3±15.4

Легенда: SW982 – контролни (нетретиран) клетки; SW982+TNF-стимулирана клетъчна линия с TNF; SW982+MTX – третирана, стимулирана клетъчна линия с MTX; SW982+TOFA-третирана, стимулирана клетъчна линия с TOFA. Данните са представени като средни стойности ±стандартно отклонение.

## 2.5. Експресионен анализ на третиран склетки SW982

На фигура 19 са представени резултатите от гена експресия на клетъчна линия SW982, изразени като FC.

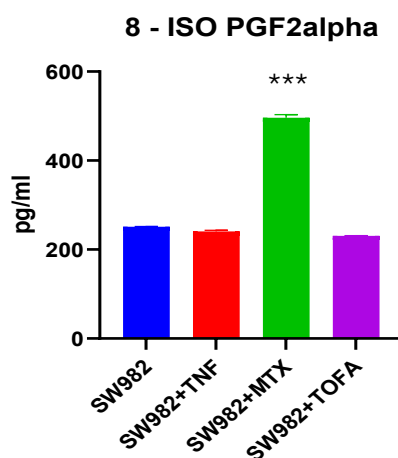


Фигура 19. *Fold Change* на маркерите (*MPC*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *YKL-40*, *YKL-39*, *LAMP1*, *LAMP2*), нормализирани спрямо *SW982*

## 2.6. Оксидативен стрес (хроматографски анализ за откриване на 8-ISOPGF2alpha)

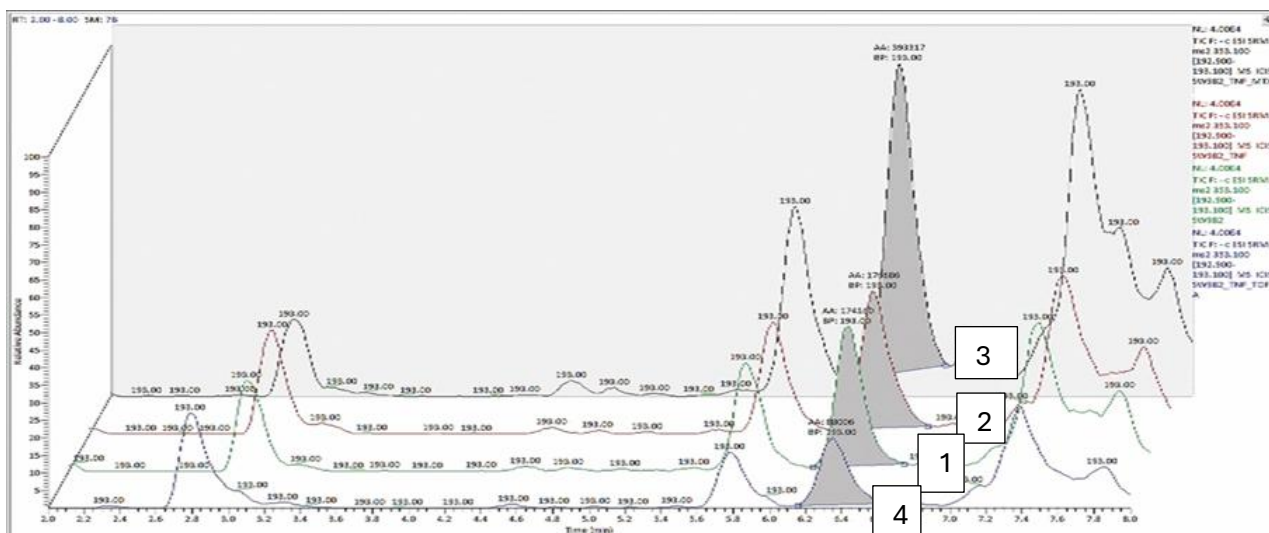
Търсейки връзка между нарушената динамика на митохондриите и промените в изтичането на протони, нивото на оксидативен стрес е оценено чрез изследване на маркера 8-ISOPGF2alpha.

Увеличаване на 8-ISOPGF2alpha е установено само в супернатанти от клетки, стимулирани с TNF- $\alpha$  и третирани с MTX ( $p=0.0001^{***}$ ). Не се наблюдава статистически значима разлика в другите групи (Фигура 20). На Фигура 20 са представени графиките от проведените хроматографски тестове за 8-ISOPGF2alpha.



Фигура 20. Нива на 8-isoPGF2alpha в супернатанта от клетъчна линия *SW982*

Легенда: Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SD; *Сини* - контролни *SW982* клетки (нетретирани, нестимулирани), *червени* - TNF- $\alpha$  стимулирани *SW982* клетки, *зелени* - TNF- $\alpha$  стимулирани *SW982* клетки, третирани с 1  $\mu$ g/ml MTX, *лилави* - TNF- $\alpha$  стимулирани *SW982* клетки, третирани със 100 nM TOFA.



Фигура 21. Хроматографско определяне на нивата на 8-isoPGF2alpha

Легенда:

Контролни-нетретиранни SW982 клетки (1)

TNF- $\alpha$  стимулирана клетъчна линия SW982 (2)

TNF- $\alpha$  стимулирана клетъчна линия SW982 и третирана с 1  $\mu\text{g/ml}$  MTX (3)

TNF- $\alpha$  стимулирана клетъчна линия SW982 и третирана със 100 nM TOFA (4)

## VI. Дискусия

Настоящото изследване предлага интердисциплинарен анализ на ключови патогенетични механизми при РА, като проследява едновременно възпалителната активност, автофагичните процеси, митохондриалната функция и оксидативния стрес в контекста на лечението с МТХ и ТОФА. Получените резултати очертават ясно, че въпреки различията в механизма им на действие, и двата медикамента успяват да модулират основни патофизиологични пътища, като това се отразява както на класическите клинични показатели, така и на молекулярните и клетъчните маркери.

В началото на лечението пациентите демонстрират характерно за РА повишение на възпалителните цитокини IL-6 и IL-1 $\beta$  и на биомаркера YKL-40. След провеждането на терапия с МТХ, и ТОФА водят до значително редуциране на CRP, СУЕ, RF и anti-CCP антителата, което съответства на клиничното подобрене. Въпреки това, динамиката на някои маркери разкрива отчетливи различия между двете терапии. ТОФА, чрез директното потискане на JAK-STAT сигнализацията, понижава значително IL-6 и YKL-40 – два ключови медиатора, свързани със синовиалното възпаление и ремоделиране. Този ефект, който надвишава наблюденията при МТХ, демонстрира по-прякото въздействие на ТОФА върху клетъчната активация в синовиалната тъкан. МТХ, напротив, повлиява възпалението по-скоро индиректно чрез аденозин-зависими механизми, което води до по-леко редуциране на YKL-40 и обяснява ограниченото му въздействие върху локалната синовиална хиперплазия.

По отношение на автофагията различията между двете терапии са още по-ясни. Маркерите LAMP1 и LAMP2, които отразяват автофагично-лизозомната активност, демонстрират противоположни модели на промяна. При пациентите, лекувани с МТХ, се наблюдава редукция на LAMP1 и едновременно повишаване на LAMP2. Тази комбинация може да бъде интерпретирана като понижаване на активиранията имунна инфилтрация (LAMP1) и засилване на компенсаторната автофагична регулация (LAMP2), свързана с AMPK и p53 сигнализацията. При ТОФА и двата маркера намаляват, което предполага потискане на автофагията в резултат на редуцираното възпалително стимулиране. По този начин МТХ изглежда предизвиква адаптивен автофагичен отговор, докато ТОФА води до по-цялостно нормализиране на автофагичните процеси, успоредно с редукция на възпалението.

Разликите между двете терапии са още по-видими на нивото на митохондриалната функция. MPC – ключов транспортер, осигуряващ навлизането на пируват в митохондриите, показва повишени плазмени нива

при пациенти на ТОФА, докато при МТХ протеинът не се открива, въпреки че генната експресия на MPC е увеличена. Това разминаване подчертава сложната посттранслационна регулация. Вероятно при МТХ пируватният метаболизъм остава нарушен, което се потвърждава и от установената митохондриална дисфункция: спад в базалното дишане, АТР продукцията и максималния респираторен капацитет. Обратно, при ТОФА се установява подобрен биоенергиен профил – по-ниско протонно изтичане и повишени АТФ нива. Това показва преминаване от гликолитичен към оксидативен метаболизъм и по-добра митохондриална ефективност, която вероятно е следствие от потиснатата активация на имунната среда и директните ефекти на JAK-STAT инхибицията върху клетъчния метаболизъм.

По отношение на оксидативния стрес *in vivo* се наблюдава стабилност на 4-HNE независимо от терапията, което може да означава, че хроничният оксидативен фон при РА е труден за повлияване в кратки терапевтични периоди. В контраст, *in vitro* експериментите демонстрират значимо повишаване на оксидативните маркери след МТХ, докато ТОФА води до тяхната редукция. Тази различна посока на ефектите отразява известната митохондриална токсичност на МТХ и потвърждава благоприятното действие на ТОФА върху клетъчния оксидативен баланс.

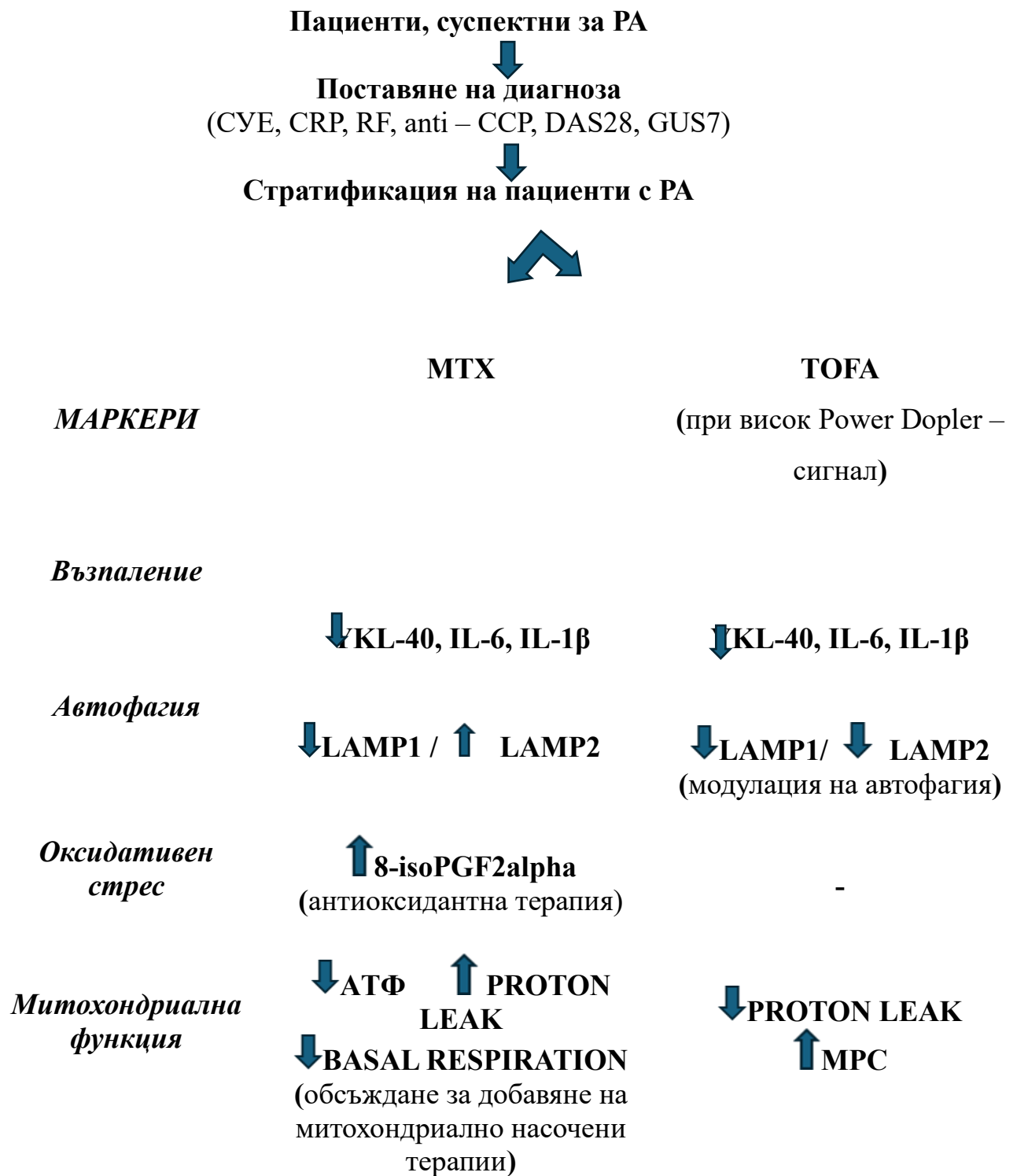
Корелационният анализ допълнително подчертава наблюдаваните разлики. При ТОФА преди терапия YKL-40 корелира положително със SRC, което може да се разглежда като адаптивна митохондриална активация в условия на силно възпаление. След терапия се появява силна асоциация между LAMP1 и протонното изтичане, което вероятно отразява връзката между автофагичната активност и митохондриалната мембранна стабилност. При МТХ отрицателната корелация между YKL-40 и 4-HNE след терапията предполага, че въпреки успешното потискане на възпалението, МТХ засилва оксидативния стрес – ключово наблюдение, което има значение за оценката на страничните ефекти.

*In vitro* моделът със SW982 клетки напълно подкрепя клиничните наблюдения: МТХ увеличава протонното изтичане и оксидативния стрес и понижава АТФ, докато ТОФА води до възстановяване на митохондриалната функция и редукция на автофагичната активност. Тези паралелни находки показват, че наблюдаваните механизми при пациентите не са случайни, а представляват директен клетъчен отговор към терапията.

Обобщено, изследването установява, че макар и двата медикамента да намаляват възпалението, техните ефекти върху клетъчната биология се различават съществено. ТОФА оказва по-силен ефект върху синовиалната активност, митохондриалната биоенергетика и оксидативния баланс, докато МТХ влияе в по-голяма степен върху автофагичните механизми, но може да

бъде свързан и с оксидативно увреждане. Тези различни профили подчертават значението на персонализирания подход при проследяването и оптимизацията на лечението. Прилагането на комплексен биомаркерен панел, включващ възпалителни, автофагични, митохондриални и оксидативни показатели, в комбинация с клинична и ултразвукова оценка, би позволило по-прецизно профилиране на пациентите и ранно идентифициране на терапевтичен успех или резистентност. Така очертаната перспектива е в съответствие с концепцията за прецизна медицина при РА и открива възможности за нови терапевтични комбинации. Използването на антиоксиданти или модулатори на автофагията за предотвратяване на структурни увреди и подобряване на дългосрочния контрол на заболяването се очертават като надеждни перспективи.

Примерен многофакторен подход за мониторинг и оптимизация на лечението е изложен схематично на Фиг. 22.



Фиг. 22 Многофакторен подход за мониторинг и оптимизация на лечението

Легенда: ↑ - повишена експресия или секреция; ↓ - понижена експресия или секреция

## VI. Изводи

1. Наблюдаваното подобрене в клиничко-лабораторните и ултрасонографските показатели (DAS28/CRP, GUS7) потвърждава тяхната приложимост като чувствителни инструменти за мониториране на терапевтичния отговор при пациенти с РА.
2. Генната експресия на маркерите за възпаление, автофагия и оксидативен стрес (YKL-39, YKL-40, IL-1, IL-6, LAMP1/2, MPC, 4-HNE) е значително повишена при пациентите с РА преди началото на терапията и частично се нормализира, според вида на приложеното лечение.
3. Плазмените концентрации на маркерите за възпаление, автофагия и оксидативен стрес (YKL-39, YKL-40, IL-1, IL-6, LAMP1/2, MPC, 4-HNE) показват съществено намаляване след терапията, което отразява редуциране на възпалителната и автофагичната активност при пациентите с РА.
4. TOFA подобрява митохондриалната функция при РА, а МТХ я потиска, което е индикация за различен механизъм на действие на медикаментите и метаболитна клетъчна адаптация към терапията.
5. Установяват се силни корелации между степента на митохондриална дисфункция и нивата на възпалителни и оксидативни маркери, което потвърждава взаимовръзката между клетъчния енергиен баланс, хроничното възпаление и автофагичните процеси при РА.
6. *In vitro* експерименталният модел показва сходни промени в генната експресия и митохондриалния профил с тези, наблюдавани *in vivo*.

7. Комбинираният клинико-биологичен подход подпомага мониторинга на терапията, създавайки основа за персонализирано лечение на РА чрез оценка на молекулни и функционални клетъчни биомаркери.

## IX. Оригинални приноси

1. За първи път в българска популация е направена сравнителна оценка на клетъчния метаболизъм в РВМСs от пациенти с РА преди и след лечение с МТХ и ТОФА.
2. Представени са нови данни за продукцията на АТФ и протонното изтичане, които са индикация за по-изразена биоенергийна и метаболитна нормализация на РВМСs след лечение с ТОФА.
3. Апробиран е нов *in vitro* протокол на базата на установен клетъчен модел на РА, чрез който е предложен панел от биомаркери за персонализиран мониторинг на терапията при пациенти с РА.

## X. Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Kostova, Ts., **Mihaylova, V.**, Kazakova, M., Batalov, Z., Karalilova, R., Batalov, A. (2022). Mitochondrial dysfunction and biological therapy: a new look at rheumatoid arthritis, *Rheumatology*, XXX, №1, 58-65 <https://doi.org/10.35465/30.1.2022.pp51-65> IF=1.12; Q2
2. **Mihaylova, V.**, Kazakova, M., Batalov, Z., Karalilova, R., Batalov, A., Sarafian, V. (2024). JAK inhibitors improve ATP production and mitochondrial function in rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatology International*, 44(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00296-023-05501-4> IF=2.9; Q2
3. **Mihaylova, V.**, Karalilova, R., Batalov, Z., Kazakova, M., Batalov, A., & Sarafian, V. (2024). Inflammation, mitochondrial and lysosomal dysfunction as key players in rheumatoid arthritis? *International Immunopharmacology*, 141, 112919. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112919> IF= 4.7; Q1
4. **Mihaylova, V.**, Tomov, D., Karalilova, R., Batalov, Z., Batalov, A., Sarafian, V., Kazakova, M. (2025) Effects of Methotrexate and Tofacitinib on Mitochondrial Function and Oxidative Stress in Human Synovial Cells In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 8173. <https://doi.org/10.3390/ijms26178173> IF = 4.9; Q1
5. **Mihaylova, V.**, Batalov, Z., Karalilova, R., Batalov, A., Kazakova, M., Sarafian V. (2025) A Pilot Study on Mitochondrial Dysfunction, Autophagy, and Inflammation in Rheumatoid Arthritis Patients on Methotrexate Treatment. *Orthop Surg Trauma*,1(2) <https://doi.org/10.14744/ortst.2025.81545> ORTST

## **XI. Участия в научни форуми**

1. **Михайлова В.**, Баталов З., Каралилова Р., Казакова М., Баталов А., Сарафян В. Енергиен метаболизъм като параметър за оценка на терапевтичния ефект при ревматоиден артрит - Конференция „Наука и младост“, 21-23.04.2023, Пловдив
2. **Михайлова В.**, Баталов З., Каралилова Р., Казакова М., Баталов А., Сарафян В. Проучване на ефекта от лечението при пациенти с ревматоиден артрит върху ключови показатели на митохондриалната функция - XIV-та Национална конференция по медицинска биология, 02-04.06.2023, Варна
3. **Михайлова В.**, Баталов З., Каралилова Р., Казакова М., Баталов А., Сарафян В. Ефект на Тофацитиниб върху митохондриалната функция при пациенти с ревматоиден артрит – пилотно проучване - Национален конгрес по ревматология, 28.09 – 01.10.2023, Правец
4. **Михайлова В.**, Баталов З., Каралилова Р., Казакова М., Баталов А., Сарафян В. Сравнителна оценка на митохондриалната функция при пациенти с ревматоиден артрит на два терапевтични режима – Първа научна сесия за студенти, докторанти и млади научни работници - Медицински науки, 12-13.04.2024, Бургас
5. **Михайлова В.**, Баталов З., Каралилова Р., Казакова М., Баталов А., Сарафян В. Маркери за възпаление и автофагия при пациенти с новодиагностициран ревматоиден артрит – Конференция „Наука и младост“, 19-21.04.2024, Пловдив

6. **Mihaylova V.**, Kazakova M., Batalov Z., Karalilova R., Batalov A., Sarafian V. JAK inhibitors improve ATP production and mitochondrial function in rheumatoid arthritis – a pilot study - 14th International congress on Autoimmunity, 17-20 May 2024, Любляна, Словения

7. **Mihaylova V.**, Kazakova M., Batalov Z., Karalilova R., Batalov A., Sarafian V. Динамика в параметрите на митохондриална функция и възпаление при ревматоиден артрит – XXXIV International scientific on-line conference, 6th – 7th June 2024, Stara Zagora, Bulgaria

8. **Mihaylova V.**, Karalilova R, Batalov Z., Kazakova M., Batalov A., Sarafian V Inflammation, mitochondrial and lysosomal dysfunction in rheumatoid arthritis – 14th SEEC conference on infections and cancer, 3th - 6th October 2024, Ohrid, North Macedonia

9. Tomov D., Levterova B., **Mihaylova V.**, Troev D., Orbetsova M – HILIC chromatography for the quantification of tmao in human plasma by LS-MS/MS – 6<sup>th</sup> International Scientific and Practical Internet Conference – 6th – 7th February 2025, Dnipro, Ukraine

10. **Михайлова В.**, Вергов Б., Казакова М., Баталов З., Каралилова Р., Баталов А., Сарафян В. - Митохондриална функция и клетъчен метаболизъм като параметри за оценка на терапевтичния ефект при ревматоиден артрит“ -Дни на медицинската наука, МУ-Пловдив – 9 - 11.05.2025, Пловдив

11. **Mihaylova V.**, Tomov D., Batalov Z., Karalilova R., Kazakova M., Batalov A., Sarafian V. - In vitro activity of methotrexate and tofacitinib

on mitochondrial function and oxidative stress in human synovial cells -  
Конференция „Наука и младост“, 09 -11.05.2025, Пловдив

12. **Mihaylova V.**, Kazakova M., Batalov Z., Karalilova R., Batalov A.,  
Sarafian V. - gene and protein profiles of CHI3L1 and CHI3L2 in patients  
with rheumatoid arthritis – XV Национална конференция по  
медицинска биология – 6 – 8.06.2025, Стара Загора

13. **Mihaylova V.**, Tomov D., Batalov Z., Karalilova R., Kazakova M.,  
Batalov A., Sarafian V. - Effects of methotrexate and tofacitinib on  
mitochondrial function and oxidative stress in rheumatoid arthritis - an in  
vitro model - Rheumatic and Autoimmune disorders conference - 17<sup>th</sup>-18<sup>th</sup>  
June,2025, Barcelona, Spain

## **ХІІ. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд и в други направления**

1. "Митохондриална функция и клетъчен метаболизъм като параметри за оценка на терапевтичния ефект при ревматоиден артрит **НО 01/2022**, МУ-Пловдив

2. "Biobanking and BioMolecular resources Research Infrastructure – European Research Infrastructure Consortium"- BMMRI-ERIC, Contract **D01- 165/28.07.2022**

3. "Маркери за повишен чревен пермеабилител и системно възпаление при хроничен автоимунен тиреоидит на Хашимото" - **НО 06/2023** МУ-Пловдив

4. „Програма за стратегически изследвания и иновации за развитие на МУ – Пловдив (ПСНИИР-МУП)“, Стълб 2: Създаване на мрежа от изследователски висши училища на Програмата за ускоряване на икономическото възстановяване и трансформация чрез наука и иновации от компонент „Иновативна България“ на Националния план за възстановяване и устойчивост с Договор № **BG-RRP-2.004-0007-S01**, финансиран от ОП НОИР

5. "Иновативен перфузионен 3Д биопринтиран модел на метастатичен колоректален карцином като платформа за персонализиране на фармако- и електрохимиотерапия" - **КП-06-Н83/9 -ФНИ**

6. „Транскрипционен и протеинов профил на маркери за автофагия и възпаление при пациенти с ревматоиден артрит на два терапевтични режима “- **НО 15/2025**, МУ— Пловдив

**Цитирания, свързани с дисертацията**

1. Kostova, Ts., Mihaylova, **V.**, Kazakova, M., Batalov, Z., Karalilova, R., Batalov, A. (2022) Mitochondrial dysfunction and biological therapy: a new look at rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, vol. XXX, №1, 58-65 <https://doi.org/10.35465/30.1.2022.pp51-65>

ЦИТИРАНА 1 ПЪТ ОТ:

- 1.1. Malik, S., Chakraborty, D., Agnihotri, P., Sharma, A., & Biswas, S. (2024). Mitochondrial functioning in Rheumatoid arthritis modulated by estrogen: Evidence-based insight into the sex-based influence on mitochondria and disease. *Mitochondrion*, 76, 101854. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101854>
2. **Mihaylova, V.**, Kazakova, M., Batalov, Z., Karalilova, R., Batalov, A., & Sarafian, V. (2024). JAK inhibitors improve АТФ production and mitochondrial function in rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatology International*, 44(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00296-023-05501-4>

ЦИТИРАНА 3 ПЪТИ ОТ:

- 2.1. Wang, D., Li, Q., Diao, X., & Wang, Q. (2025). Mitochondrial Oxidative Stress Related Diagnostic Model Accurately Assesses Rheumatoid Arthritis Risk Stratification and Immune Infiltration Characterization. *Biotechnology journal*, 20(2), e202400615. <https://doi.org/10.1002/biot.202400615>
- 2.2. Konal, O., Bölen, F., Güvenç, T. S., Pehlivan, Ö., Batıbay, S., Özcan, F. B., Paralı, A., Aksu, F., Kul, Ş., & Çalışkan, M. (2025). Gout and rheumatoid arthritis are associated with subclinical vascular damage, reduced brachial vasoreactivity and coronary microvascular dysfunction:

a case-control study. *Rheumatology international*, 45(5), 117.  
<https://doi.org/10.1007/s00296-025-05868-6>

2.3. Agnihotri, P., Malik, S., Saquib, M., Chakraborty, D., Kumar, V., & Biswas, S. (2024). Exploring the impact of 2-hydroxyestradiol on heme oxygenase-1 to combat oxidative stress in rheumatoid arthritis. *International journal of biological macromolecules*, 283(Pt 4), 137935.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137935>

3. **Mihaylova, V.**, Karalilova, R., Batalov, Z., Kazakova, M., Batalov, A., & Sarafian, V. (2024). Inflammation, mitochondrial and lysosomal dysfunction as key players in rheumatoid arthritis?. *International Immunopharmacology*, 141, 112919.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112919>

ЦИТИРАНА 2 ПЪТИ ОТ:

3.1. Rizzollo, F., & Agostinis, P. (2025). Mitochondria-Lysosome Contact Sites: Emerging Players in Cellular Homeostasis and Disease. *Contact (Thousand Oaks (Ventura County, Calif.))*, 8, 25152564251329250.  
<https://doi.org/10.1177/25152564251329250>

3.2. Geetha, D., & Skaria, T. (2025). Cathepsin S: A key drug target and signalling hub in immune system diseases. *International immunopharmacology*, 155, 114622.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.114622>

## **Благодарности:**

- На моя научен ръководител ПРОФ. МАРИЯ КАЗАКОВА, ДБ, за ценните напътствия през целия работен процес.
- На моя научен консултант ПРОФ. Д-Р ВИКТОРИЯ САРАФЯН, ДМН, за професионализма, задълбочените съвети и моралната подкрепа.
- На ПРОФ. Д-Р АНАСТАС БАТАЛОВ, ДМ, за ползотворното сътрудничество и ценните идеи.
- На Д-Р ДЕСИСЛАВ ТОМОВ, ДМ, за методичната подкрепа.
- На рецензентите на дисертационния труд, за отделеното време и оценката на труда ми.
- На колегите от Катедра „Медицинска биология“, за помощта и вдъхновението.
- На семейството ми за толерантността и подкрепата.