



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Лаборатория по вирусология



Даниел Ганчев Тодоров

Противовирусен ефект на природни продукти

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”,

по професионално направление 4.3. Биологични науки (Вирусология)

Научен ръководител:

Доцент, д-р Стоян Шишков

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 129 страници и съдържа 30 фигури и 17 таблици. Библиографската справка обхваща 238 литературни източника.

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Лаборатория по вирусология

Даниел Ганчев Тодоров

Противовирусен ефект на природни продукти

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”,

по професионално направление 4.3. Биологични науки (Вирусология)

Научен ръководител:

Доцент, д-р Стоян Шишков

София, 2016

Дисертационният труд е обсъден и приет на разширено заседание на Лабораторния съвет на Лаборатория „Вирусология“, Биологически факултет на Софийския университет „Св. Кл. Охридски“.

Дисертационният труд е разработен в Лаборатория „Вирусология“ на Биологически факултет на СУ “Св. Кл. Охридски“.

Използвани съкращения

МДБК - *Madin-Darby Bovine Kidney*

HSV - *Herpes Simplex Virus* (Херпес Симплекс вирус)

ТК - Тимидинкиназа

МНК - Максимално нетоксична концентрация

ЦК₅₀ - Цитотоксична концентрация 50%

ИК₅₀ - Инхибираща концентрация 50%

СИ - Селективен индекс

1. Увод

Едни от най-широко разпространените вируси в природата са представителите на семейство *Herpesviridae*. Изолирани от всички изследвани гръбначни животни, те предизвикват заболявания, протичащи с различна тежест и клинична картина - от безсимптомни инфекции и самоограничаващи се лезии по кожата до тежки генерализирани инфекции, менингити, енцефалити и злокачествени новообразувания. Сред над 90-те представителя на семейство *Herpesviridae*, човешките вируси са девет на брой.

Поразяващи човечеството от векове и причина за скрити пандемии от лабиален и генитален херпес, инфекциите от HSV-1/HHV-1/и HSV-2/HHV-2/, са едни от най-широко разпространените вирусни заболявания в глобален мащаб. Първичната HSV-1 инфекция се осъществява най-често до 5-годишна възраст и обикновено е асимптоматична. По последни данни над 500 млн. души по света са заразени с HSV-2 като ежегодно новозаразените са над 25 млн. HSV-1 е дори по-широко разпространен. В някои части на света серопревалентността му е над 90% (Bernstein D. et al., 2013). Още по-обезпокоителен е и фактът, че в 80% от случаите вирусът се предава при отсъствие на кожни лезии или други симптоми. Този феномен е известен като "асимптомно вирусно предаване". Рисков контингент за ново заразяване са новородените, при които инфекцията може да е фатална, като по данни на CDC за 2011 година подобни раждания са били 1 на всеки 3000 случая в САЩ. Друго социално значимо заболяване, свързано с HSV е Херпес-симплексия кератит. HSV-1 е най-честият причинител на слепота в Западния свят като само в САЩ годишно се съобщават за 300 000 нови случая на HSV-на очна инфекция (Томас Н. et al., 2008).

Въпреки наличната високоефективна терапия с препарати от групата на нуклеозидните аналози в клиничната практика нуждата от нови и ефективни лекарствени средства е все по-силно належаща. Основната причина за това е бързо развиващата се резистентност на вирусите към този клас препарати, като особено силно са засегнати имунокомпроментирани пациенти. В клиничната практика все по-често се срещат такива вирусни мутанти като за периода 2007 - 2011

година във Франция 46,5% от пациентите претърпели трансплантации на хематопоеични стволови клетки са развили тежки херпес симплекс вирусни инфекции причинени от щамове резистентни на терапията с Ацикловир (Frobert E. et al., 2014).

Алтернатива на разпространената в практиката химиотерапевтична терапия е използването на продукти с природен произход. Тези лекарствени препарати с често сложен химичен състав представляват сериозно предизвикателство за селекцията на резистентни вирусни мутанти предвид често многокомпонентния и многоцелеви механизъм на антивирусното си действие.

2. Цели и задачи

2.1 Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване на антихерпесния ефект на екстракти, получени от медицинското растение *Lamium album* L. като се сравни активността при различни методи на отглеждане на растението – в естествените му популационни ареали, лабораторно култивирано и реиндуцирани в естествени условия растения.

2.2 Задачи

За изпълнение на поставената цел са набелязани следните задачи:

- Определяне на цитотоксичната активност на екстрактите върху клетъчна култура – MDBK. Изчисляване на стойностите на ЦТК₅₀.

-Определяне на въздействието върху репликацията на HSV-1 и HSV-2 и основни химиотерапевтични показатели - ИК₅₀ и СИ. Сравнение на активността в зависимост различните методи на отглеждане.

-Определяне на вирусоцидното действие спрямо HSV-1.

-Определяне на въздействието върху началните етапи на вирусния жизнен цикъл (адсорбция и пенетрация) на HSV-1 в клетката гостоприемник.

-Определяне на въздействието върху кинетиката на вирусната репликация с цел уточняване на етапа от репликационния цикъл на HSV-1 с активно въздействие.

3. Материали и методи

3.1 Материали

3.1.1 Растителен материал

Изследвани са тринадесет екстракта от растението бяла мъртва коприва - *Lamium album* L. (сем. *Lamiaceae*) (Табл. 1). Екземплярите от растението, използвани за изготвянето на *in vivo* екстрактите са от растения събрани от тяхно естествено находище в Лозен планина край София в периода на цъфтеж (месец май). Растението е депозирано с ваучер SO 105183 в Хербариумът на СУ „Св. Климент Охридски“, София, България.

In vitro стъблена култура е индуцирана посредством стерилизиране на моно-нодални стъблени сегменти от диво растящите растения. Нарязаните експлантите се промиват под течаща вода и след това се подлагат на стерилизация с 0.1% HgCl_2 (живачен двухлорид) (w/v) за 8 минути. Следва трикратно промиване със стерилна дестилирана вода. В стерилни условия, експлантите се инокулират в основна MS-хранителна среда (Murashige T. & Skoog F., 1962), съдържаща 3% (w/v) захароза и 0.7% (w/v) агар без добавени растежни регулатори. Растенията се култивират *in vitro* при контролирани условия на заобикалящата ги среда, 16 h ден/8 h нощ, 60 $\mu\text{mol.}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD (Photosynthetic photon flux density), Philips TLD-33, температура 25 °C и 60–70% относителна влажност на въздуха. Надземната част на добре развитите експлантите се събира и суши на сянка с цел използването им за приготвяне на *in vitro* екстракти. Останалата част се използва за по-нататъчно микроразмножаване и *ex vitro* адаптация обратно в естествени условия. Тези растения се реиндуцират в естествените си находища в Лозенска планина, от където в следствие се вземат за направа на *ex vitro* екстрактите отново в периода на цъфтеж на растението.

3.1.2 Екстракция на растителните материали.

- Екстракция чрез апарата на *Soxhlet*.

Апаратът на *Soxhlet* се състои от екстрактор (30 мл), в който се поставя целулозен патрон с предварително поставен растителен материал, облодънна колба (100 мл), водна баня със статив, на който се закача апаратът, прав хладник и система от маркучи. Три грама сух растителен материал, предварително смлян на прах с машинка, се поставя в целулозен патрон (Whatman©) с размери 18 mm X 55 mm в диаметър и дължина 20 mm X 55 mm и се екстрахира най-напред с 30 ml хлороформ (CHCl_3) за 8 до 12 часа до пълно обезцветяване при температура 62°C. Хлороформът извлича неполярните вещества (въглеродороди, восъци, смоли, мазнини, хлорофил). Получената екстракционна течност се накапва в епруветки и се изпарява до сухо. След отстраняване на неполярните вещества се използва метанол за извличане на полярните вещества – феноли и флавоноиди. Следва второ екстрахиране с 30 ml CH_3OH при температура 65°C до пълно обезцветяване и процедурата до сухо се повтаря по описания по-горе начин.

-Екстракция в термостат.

Два грама растителен материал (*in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения) се залива с 20 ml CH_3OH и се поставя в термостат при 40°C за едно денонощие (Schinella G. et al., 2002). Полученият екстракт се филтрува на вакуум помпа и отново се залива с CH_3OH . Процедурата се повтаря два пъти. Екстрактите се обединяват и се изпаряват до сухо над камината в епруветки.

-Екстракция на лиофилизиран растителен материал.

Предварително 2 грама свеж растителен материал (*in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения) се лиофилизират в лиофилизатор Alpha 1 - 2 LD plus Christ (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, OsterodeamHarz, Germany, АгроБио Институт - София), при 1 atm, t =

- 55°C. Времето за лиофилизация зависи от състоянието на пробата и варира между 2 и 6 часа.

Таблица 1. Вид на получените екстракти и съкратеното им наименование

Вид на екстракта	Абревиатура
Хлороформен соксклетен екстракт от лабораторно култивирано растение	ChSr
Хлороформен соксклетен екстракт от диворастящо растение	ChSv
Хлороформен соксклетен екстракт от адаптирани <i>ex vitro</i> растение	ChSe
Метанолов соксклетен екстракт от лабораторно култивирано растение	MeSr
Метанолов соксклетен екстракт от диворастящо растение	MeSv
Метанолов соксклетен екстракт от адаптирани <i>ex vitro</i> растение	MeSe
Метанолов термостатен екстракт от лабораторно култивирано растение	MeTr
Метанолов термостатен екстракт от диворастящо растение	MeTv
Метанолов термостатен екстракт от адаптирани <i>ex vitro</i> растение	MeTe
Етанолов екстракт от лабораторно култивирано растение	Er
Етанолов екстракт от диворастящо растение	Ev
Воден лиофилизиран екстракт от лабораторно култивирано растение	Wr
Воден лиофилизиран екстракт от лабораторно култивирано растение	Wv

Материалите са любезно предоставени от проф. д-р Венета Капчина-Тотева, катедра Физиология на растенията към Биологически факултет към Софийски университет „св.Климент Охридски“, София.

3.1.3 Клетъчни линии

За всички експерименти е използвана монослойна клетъчната линия *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK), получена от бъбрек на нормален възрастен бик.

3.1.4 Хранителни среди

Клетките са култивирани в среда Eagle's MEM (Dulbecco modified) – DMEM (Biochrom), обогатена с FCS – 7,5% при растежната и 2,5% при поддържащата хранителна среда, антибиотик (Gentamycin 0.008 мг/мл) и 10 mM HEPES (като буферно вещество). рН на средата се коригира с 7% разтвор на NaHCO₃ и 1% разтвор на HCL.

3.1.5 Вирусни модели

При проведените от нас експерименти са използвани вирусни щамове от колекцията на лабораторията:

- Вирус херпес симплекс тип 1(HSV-1), щам Vic;
- Вирус херпес симплекс тип 2(HSV-2), щам Va
- Вирус херпес симплекс тип 2(HSV-2), ацикловир-резистентен щам DD

Вирусните модели са ни предоставен от Националната референтна лабораторията по херпес вирусни инфекции към

НЦЗПБ. Вирусните щамове са култивирани в 24-часова монослойна култура на клетъчна линия MDBK с поддържаща хранителна среда. За целта в матраци за клетъчно култивиране (OrangeScientific) с площ 25 cm² се разлива по 15 мл клетъчна суспензия с концентрация 1,5x10⁵ клетки/мл. След формиране на монослой се инокулира с 0.2 мл неразредена вирусна суспензия. След един час адсорбция в термостат (Memmert) при температура 37°C се добавя 15 мл поддържаща хранителна среда. Матраците се инкубират в термостат (Memmert) при температура 37°C. Цитопатичният ефект (ЦПЕ), предизвикан от вируса, се отчита ежедневно. При обхващане на приблизително 75% от клетъчния монослой (+++) – матраците се замразяват. След еднократно замразяване и размразяване полученият вирусен сток се титрира по метода на Reed-Muench (Reed L. & Muench H., 1938) и разпределя в равни количества в отделни епендрофки, които се съхраняват при температура -70°C.

3.1.6 Работен разтвор на МТТ {(3-4, 5 диметилтиазолов-2-ил)-2,5дифенилтетразолов бромид (Sigma)}.

Разтворът (с концентрация 5 мг/мл) се приготвя като 5 мг суха субстанция МТТ се разтваря в 1 млPBS, след което се филтрира през милипоров филтър (размер на порите 0.22 µm) и съхранява при - 20°C до момента на употребата му. Лизиращ разтвор за МТТ теста – DMSO (диметилсулфоксид).

3.2 Методи

3.2.1 Пасиране на клетъчната линия

Средата, в която клетките са култивирани, се отстранява. Монослоят се промива трикратно с фосфатно солеви буфер (PBS) за 1-2 минути, след което разтворът се отстранява. Добавя се разтвор на трипсин-версен темперирани, предварително на 37°C. Клетките се третират около 3-10 мин докато започнат да се окръглят и дисоциират. Разтвора на трипсин-версен се заменя с малък обем

растежна хранителна среда и се ресуспендира. Клетките от суспензията се преброяват и се довеждат до определен обем с плътност $1,5 \times 10^5$ кл/мл, след което се разливат в матраци (Orange Scientific) или плаки за клетъчно култивиране. Клетките се инкубират в термостат (Memmert) при температура 37°C.

3.2.2 Определяне на цитотоксичната концентрация 50 (ЦТК₅₀) и максималната нетоксична концентрация (МНК).

Цитотоксична концентрация 50 (ЦТК₅₀) се дефинира като концентрацията на изследваното вещество, при която 50% от клетките на монослоя умират в резултат на токсичното действие на веществото.

Максимална нетоксична концентрация (МНК) се дефинира като най-високата концентрацията на изследваното вещество, която не предизвиква морфологично увреждане или смърт на третираните клетки.

За определяне на МНК микроскопски се следи за появата на морфологични изменения в монослоя на третираните клетки в продължение на 96 часа.

За определяне на ЦТК₅₀ се използва МТТ методът, описан от Mosmann (Mosmann T., 1983). МТТ е водно-разтворима тетразолиева сол, придаваща жълтеникав цвят на разтвора. Поставен в хранителната среда на клетките, МТТ преминава в клетъчния цитозол, достига до митохондриите, където митохондриалните дехидрогенази откъсват тетразолиевия пръстен и превръщат разтворимата жълта сол в неразтворим във вода син формазанов продукт. Способността на клетките да редуцират МТТ е показател за митохондриалната цялост и активност, което се интерпретира като мярка за жизнелост и/или числеността на жизнеспособните клетки. Мъртвите клетки не участват в това превръщане, поради нефункциониране на митохондриите им. Количеството на

трансформирания МТТ до неразтворими формазанови кристали е правопрпорционално на броя на живите клетки. За да бъде измерено количество на формазана, клетките се обработват с разтвор, който ги лизира и едновременно с това разтваря сините формазанови кристали. Количеството на последните се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната 540 nm.

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда. Следва разсяване на клетъчната суспензия, с концентрация $1,5 \times 10^5$ кл/мл в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific) (по 0.2 мл за ямка). Поради данни, получени експериментално, че в крайните редове и колони понякога се получава намаляване на обема при по-дълготрайно култивиране, в тях не се посяват клетки. Там се накапва само хранителна среда без серум. Когато клетъчният монослой достигне между 90 – 100% конfluентност (обикновено след 24 часа), надстоящата течност се отдекантира и се прибавя по 0.1 мл поддържаща хранителна среда и по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания за всяко вещество. Със всяко едно разреждане на веществото се накапват поне 3 ямки. В няколко ямки се накапва само хранителна среда без вещество (по 0.2 мл) и служат за клетъчна контрола. Тъй като използваният обем вещество (с дадена концентрация) при накапване в ямката се разрежда два пъти, реалната концентрацията на всяко добавено разреждане е два пъти по-ниска от предварително приготвената. Така обработената плака се инкубира в термостат (Memmert) при температура 37°C в продължение на 72 часа. В края на третия ден във всяка ямка (с изключение на крайните редове и колони) се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МТТ (като крайната му концентрация в ямката става 0,5мг/мл), след което плаката се инкубира в термостат (Memmert) при 37°C в продължение на 4 часа. Хранителната среда с разтвореното в нея МТТ след инкубацията се отстранява, след което се добавя 0.2 мл от лизиращия разтвор. Така обработената плака се отчита спектрофотометрично при 540 nm с помощта на ELISA reader Multiscan MX.

Клетъчната преживяемост се определя като % на живите клетки в ямките, третирани с различни концентрации от изследваното вещество, в сравнение с контролните нетретирани с вещество клетки. За целта се използва следната формула:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = \frac{\text{A540 оптична плътност на третираните клетки}}{\text{A540 оптична плътност на контролите}} \times 100$$

От построената крива “доза (концентрация)-клетъчна преживяемост” е възможно да се изчисли ЦТК₅₀.

3.2.3 Определяне на инфекциозен титър чрез метод на Reed-Muench (Reed L. & Muench H., 1938):

Непосредствено преди работа се приготвят десетократни падащи разреждания на вирусната суспензия в поддържаща хранителна среда. Когато клетъчният монослой достигне между 90 – 100% конfluентност (обикновено след 24 часа), хранителната среда в ямките се отстранява. Клетъчният монослой се заразява с приготвените вирусни разреждания в обем 0.1 мл. С всяко едно вирусно разреждане се заразяват по 4 ямки. Вирусът адсорбира за един час в термостат (Memmert) при температура 37°C, след което към всяка ямка се добавя по 0.1 мл поддържаща хранителна среда. За

клетъчна контрола служат четири ямки, в които само се сменя хранителната среда със свежа поддържаща среда. Така обработената плака се инкубира в термостат (Memmert) при температура 37°C. Резултатите се отчитат микроскопски на 48-ия час от инфектирането на клетките. Инфекциозният вирусен титър се определя по наличието или липсата на вирусен цитопатичен ефект по следната формула:

$$T = (\log \text{ от разреждането, при което \% заразени е над } 50\%) + (\text{фактор на пропорционалност} \times \log \text{ от фактора на разреждане}).$$
$$\text{Фактор на пропорционалност} = [(\% \text{ заразени над } 50\%) - 50\%] / [(\% \text{ заразени над } 50\%) - (\% \text{ заразени под } 50\%)]$$

3.2.4 ЦПЕ инхибиращ тест. Определяне на Инхибиращата концентрация 50 (ИК₅₀) и Селективен индекс (СИ)

Антивирусното действие на изследваните екстракти се определя чрез разработения от *Mosmann* МТТ тест (*Mosmann T.*, 1983) за определяне на клетъчната преживяемост, модифициран от *Takeuchi* за бърз скрининг на съединения за анти-херпесно действие (*Takeuchi H. et al.*, 1991). Под въздействие на цитопатичното действие на вируса, клетките загиват. Определянето на клетъчната жизнестойност чрез МТТ – тест на заразени с вирус и третирани с вещество клетки, е показателно за антивирусното действие на самото вещество.

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда. Следва разсяване на клетъчните суспензии, с концентрация $1,5 \times 10^5$ кл/мл, в стерилни 96-ямкови плаки (*Orange Scientific*) (по 0.2 мл за ямка. Когато клетъчният монослой достигне между 90 – 100% конфлуентност (обикновено след 24 часа), надстоящата течност във всяка ямка се отдекантира. Следва заразяване на клетъчния монослой с вирус. Обемът на инокулума за

ямка е 0.1 мл, при работна доза 100 ТКИД₅₀ (и за двата типа херпесни вируси). В няколко ямки (поне три) се накапва по 0.1 мл само поддържаща хранителна среда и служат като клетъчна контрола. Вирусът адсорбира за един час в термостат (Memmert) при температура 37°C. По време на вирусната адсорбция се приготвят разреждания на изследваните екстракти. След изтичане на времето за вирусната адсорбция плаката се обработва както следва:

- Клетъчна контрола (незаразени с вирус и нетретирани с вещество клетки) – към ямките, определени за клетъчна контрола (поне три), се накапват поддържаща хранителна среда.
- Вирусна контрола (заразени с вирус и нетретирани с вещество клетки) – към ямките, определени за вирусна контрола (поне 3), се накапва по 0.1 мл поддържаща хранителна среда.
- Въздействани клетки – (заразени с вирус и третирани с различни разреждания на изследваните екстракти клетки) – в ямки се накапва по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания на изследваните екстракти като с всяко разреждане се накапват поне по три ямки.

Така обработената плака се инкубира в термостат (Memmert) при температура 37°C до достигане до 100% разрушаване на монослоя в ямките на вирусната контрола. През времето на инкубация непрекъснато се следи развитието на цитопатичният ефект във вирусната контрола.

Клетъчната жизнелост както в пробите, така и в контролите се определя с използване на МТТ тест.

Активността на веществото изразяваше като % протекция се определя по формулата:

$$[OD_B - OD_{KB}]$$

-----x 100 (%), където:

$$[OD_{KKL} - OD_{KB}]$$

OD_B - Оптична плътност на заразените и третирани с вещество клетки

OD_{KB} - Оптична плътност на заразените с вирус клетки (вирусна контрола без вещество)

OD_{KKL} - Оптична плътност на незаразени и не третирани с вещество клетки (клетъчна контрола).

Инхибиращата концентрация 50 ($ИК_{50}$) е концентрацията на изследваното вещество, която инхибира с 50% вирус-индуцирания цитопатичен ефект, като се определя директно от кривата "доза-отговор".

За да се определи селективността на антивирусния ефект на едно вещество се изчислява и селективният индекс (СИ). Това е отношението на $ЦТК_{50}$ и $ИК_{50}$.

$$ЦТК_{50}$$

$$СИ = \frac{ЦТК_{50}}{ИК_{50}}$$

$$ИК_{50}$$

3.2.5 Вирусоцидно въздействие.

Равни обеми (по 150 μ l) неразредена суспензия и хранителна среда с вещество в МНК се култивират на 37°C за 5', 15', 30', 60', 120', 240' и 360 мин. За вирусна контрола се използват равни обеми неразредена вирусна суспензия и поддържаща хранителна среда култивирани в термостат за същите времеви интервали (Hayashi K. et al., 1997). От всеки интервал пробите и контролите се замразяват и се определят титрите им по метода на Reed-Muench (Reed L. & Muench H., 1938).

3.2.6 Въздействие върху най-ранните етапи от вирусния жизнен цикъл (адсорбция и пенетрация).

С равни обеми неразредена вирусна суспензия и инхибитор в МНК, при контрола от равни обеми неразредена вирусна суспензия и среда, се инокулира конфлуентен клетъчен монослой за 15', 30', 45', 60' и 120 минути в термостат (Memmert) при температура 37°C. След изтичане на съответния времеви интервал, пробите се отдекантират и монослоя се промива двукратно, след което се покрива с поддържаща хранителна среда. На 48-я час, всички проби и контроли се замразяват и се титрират за определяне на инфекциозния титър по метода на Reed-Muench (Yarmolinsky L. et al., 2009; Reed L. & Muench H., 1938).

3.2.7 Тест за определяне на кинетиката на антивирусния ефект.

Конфлуентен монослой от 24 часова клетъчна култура се заразява с вирус при множественост на инфекцията 10. След едночасова адсорбция в термостат (Memmert) при температура 37°C, клетъчния монослой се промива с PBS и се покрива с поддържаща

среда. На 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15 и 16 час след инфекцията поддържащата среда се изсмуква и се заменя с такава съдържаща екстракта в определена нетоксична концентрация. За всеки интервал се залага и вирусна контрола. На определения час пробата и контролата от всеки интервал се третират, като се отстранява средата, трикратно се промива и се добавя поддържаща среда. Съответните проби се замразяват на определените интервали до 16-я час включително, размразяват се и се определя инфекциозният им вирусен титър. Резултатите се изразяват като разлика в титрите за съответния интервал.

3.2.8 Статистическа обработка на резултатите:

Получените в дисертационната работа стойности са резултат от три независими експеримента с минимум три повторения в един опит. Данните са обработвани с компютърна програма Origin9.1™ и са представяни като средни стойности след изчисляване на квадратична грешка за всеки от резултатите.

4. Резултати и обсъждане

4.1 Изследвания върху цитотоксичността на екстрактите.

4.1.1 Определяне на МНК:

Използвани са концентрации в граници от 100 $\mu\text{g/ml}$ до 3000 $\mu\text{g/ml}$ за определяне на максималната нетоксична концентрация (табл. 2). Хлороформните и етаноловите екстракти цялостно показват по-силно изразена токсичност в сравнение с метаноловите и водните такива, повлиявайки клетъчната морфология при концентрации 1000 $\mu\text{g/ml}$ - 1200 $\mu\text{g/ml}$.

Метаноловите екстракти, изготвени по соксклетната методика, показат ясно изразена зависимост от източника на растителния материал. Определените стойности на максималната нетоксична концентрация са 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$ и 2600 $\mu\text{g/ml}$ съответно за лабораторно култивираните (MeSr), диворастящите (MeSv) и адаптираните *ex vitro* (MeSe) растения.

Отчетеното въздействие на метаноловите термостатни екстракти е относително по-слабо. Стойността на максималната нетоксична концентрация е 1500 $\mu\text{g/ml}$ за екстракта от лабораторно култивираното растение (MeTr). МНК на другите два типа екстракти (MeTv и MeTe) са едакви и най-високи - 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Влиянието върху третираните клетки на лиофилизираните водни екстракти е сходно и не зависи от вида на изходния материал. Експериментално определените им максимални поносими концентрации също са 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Таблица 2. Стойности на МНК на изследваните екстракти.

Растителен екстракт	МНК [$\mu\text{g/ml}$]
ChSr	1000
ChSv	1200
ChSe	1200
MeSr	1000
MeSv	1500
MeSe	2600
MeTr	1500
MeTv	2000
MeTe	2000
Er	1000
Ev	1000
Wr	2000
Wv	2000

Експериментите показват, че проявената токсичност от водните (2000 µg/ml) и етаноловите екстракти (1000 µg/ml) не зависи от вида на изходния материал.

Според проявената токсичност на екстрактите може да се определи следният йерархичен ред:

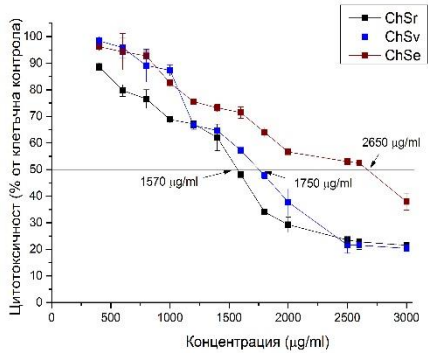
ChSr=MeSr=Er=Ev<ChSv=ChSe<MeSv=MeTr<MeTv=MeTe=W_r=W_v
<MeSe

4.1.2 Определяне на 50% цитотоксична концентрация (ЦТК₅₀):

От използвания МТТ-тест са получени дозо-зависими криви на въздействието върху жизнеността на клетъчния монослой на приложените екстракти. ЦТК₅₀ бе определена, най-висока стойност по този показател има MeSr екстрактът - 1090 µg/ml. Най-слабо въздействие показва водният екстракт от диво растение (W_v) - 5000 µg/ml.

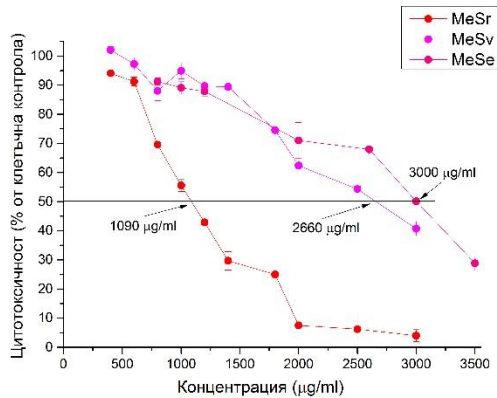
Два от хлороформени екстракти (Фиг. 1) проявяват близка активност спрямо клетъчната линия MDBK със стойности на ЦТК₅₀ съответно 1570 µg/ml и 1750 µg/ml. При екстракта от реиндуцираното растение този показател е 2650 µg/ml. Единствено третият екстракт има по-значимо различие при проявяване на цитотоксичност.

Както и при определянето на МНК и тук се наблюдава тенденция за по-висока токсичност на екстрактите от лабораторно култивирани растения в сравнение с тези отглеждани в естествени условия или адаптираните. Вероятната причина за това са значими разлики в химичния състав на екстрактите с различен произход.



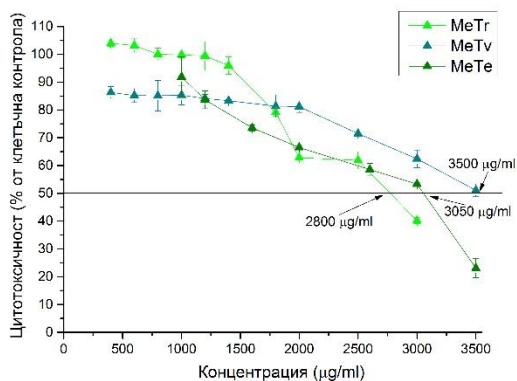
Фигура 1. Цитотоксичност на хлороформните екстракти от *L. album*

При метаноловите екстракти (фиг. 2) от *L. album* получени по соксклетна методика, се наблюдава голяма разлика между цитопатичността на екстракта, който е получен от лабораторно култивирани (MeSr) растения, в сравнение с другите два. При него стойността на ЦТК₅₀ е 1090 µg/ml. Двата екстракта от растения, отглеждани в естествени условия, проявяват по-ниска токсичност. Стойностите на ЦТК₅₀ са 2660 µg/ml и 3000 µg/ml съответно за екстрактите от диворастящи (MeSv) и адаптирани растения (MeSe).



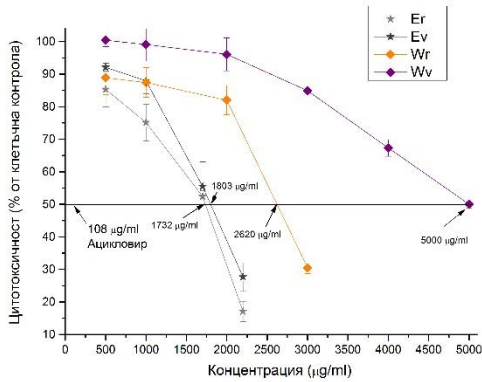
Фигура 2. Цитотоксичност на метаноловите екстракти от *L. album*, получени по соксклетна методика.

Екстрактите получени чрез метанол и термостатна методика (Фиг. 3) проявяват сходна цитотоксичност върху използваната клетъчна линия. Впечатление прави ниската токсичност на MeTv в сравнение с другите изследвани екстракти – при него ЦТК₅₀ се достига при прилагането му в концентрация 3500 µg/ml. Запазва се и тенденцията наблюдавана при другите екстракти за по-висока токсичност на екстрактите от лабораторно култивирани растения.



Фигура 3. Цитотоксичност на метаноловите екстракти от *L. album*, получени по термостатна методика

Проявената от етаноловите екстракти цитотоксичност (фиг. 4) е сходна в стойностно отношение с тази, отчетена при хлороформните екстракти. ЦТК₅₀ стойностите са много близки – 1732 µg/ml и 1803 µg/ml съответно са лабораторно култивираното (Er) и нативното растение (Ev). Най-слабо въздействащият на клетките екстракт от всичките е водния лиофилизиран екстракт от нативно култивираното растение (Wv) със стойност на ЦТК₅₀ от 5000 µg/ml.



Фигура 4. Цитотоксичност на водни и етанолови екстракти от *L. album*,

Според появената токсичност на екстрактите може да се определи следният йерархичен ред (Табл. 3):

Таблица 3. Йерархичен ред на екстрактите според тяхната цитотоксичност.

Екстракт	MeSr	ChSr	Er	ChSv	Ev	Wr
ЦТК ₅₀	1090	1570	1732	1750	1803	2620
/µg/ml/						
ChSe	MeSv	MeTr	MeSe	MeTe	MeTv	Wv
2650	2660	2800	3000	3050	3500	5000

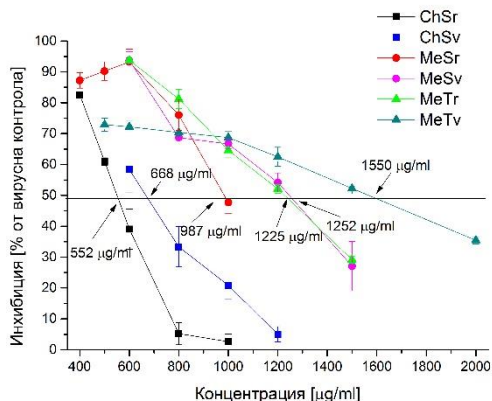
4.2 Антивирусна активност.

Екстрактите бяха изследвани за ефекта върху вирусния цитопатичен ефект спрямо HSV-1 щам Vic, HSV-2 щам Ва и ацикловир резистентния HSV-2, щам DD.

4.2.1 Определяне на ефекта върху репликацията върху HSV-1, щам Vic:

За изследване ефекта на изследваните екстракти върху репликацията на HSV-1, те са използвани в концентрации в граници от 100 µg/ml до 2000 µg/ml, като са построени дозозависими криви за определяне на инхибиторната концентрация, водеща до 50% инхибиция на вирусния цитопатичен ефект (ИК₅₀). От тринадесетте изследвани екстракта осем проявяват инхибиращо действие върху херпес вирусната репликация. Данните са представени на фигура 5 за хлороформните и метанолови екстракти и фигура 6 за водните такива.

При проведените експерименти за ефекта върху вирус индуцирания цитопатичен ефект нито един екстрактите, получени от адаптирани *ex vitro* растения, както и екстрактите, получени чрез етанол не показва ефект спрямо трите изследвани щама на HSV - Vic, Ва и ацикловир-резистентния DD.



Фигура 5. Антивирусен ефект на хлороформни и метанолови екстракти от *L. album* спрямо репликацията на HSV-1, щам Vic.

Експерименталните данни разкриват различен ефект на осемте активни екстракта спрямо репликацията на третираните щамове. Хлороформните екстракти (Фиг. 5) проявяват висока активност със стойности на ИК₅₀ от 552 µg/ml и 668 µg/ml съответно за лабораторно култивираното (ChSr) и нативното растение (ChSv). Изчислените на база ЦТК₅₀ селективни индекси са 2,85 и 2,62 съответно.

Приложени в максималната поносима концентрация тези хлороформни екстракти водят до инхибиране на вирусния цитопатичен ефект над 95%.

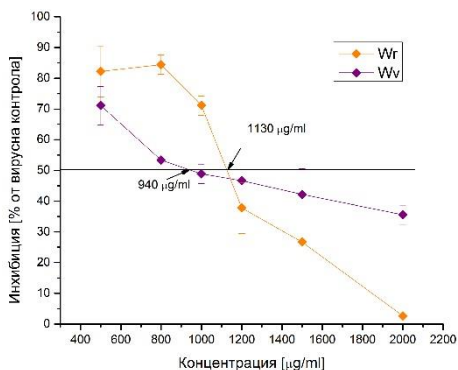
Въпреки относително по-слабият си ефект и съответно по-високи стойности на ИК₅₀ - 940 µg/ml и 1130 µg/ml - водните екстракти също имат по-високи селективни индекси 2,32 и 5,32 на база значително по-ниската си токсичност (Фиг. 6) в сравнение с другите екстракти.

Тук трябва да се отбележи най-високия от постигнатите селективни индекси - на Wv екстрактът, който обаче в МНК достига

до едва 67% инхибиране. Приложен в МНК екстрактът W_r инхибира вирусния цитопатичен ефект над 95%.

Метаноловите соксклетни екстракти MeS_r и MeS_v имат стойности на ИК₅₀ съответно - 987 µg/ml и 1252 µg/ml.

Най-слаб антивирусен ефект проявяват метаноловите екстракти, получени по термостатна методика. Изчислените стойности за 50% инхибция на вирусния цитопатичен ефект е 1225 µg/ml (MeT_r) и 1550 µg/ml (MeT_v). Определените селективни индекси - 2,29 и 2,26 съответно са сходни с тези на екстрактите, получени по хлороформната методика поради значително по-ниската цитотоксичност, проявена от тези екстракти (Табл. 4).



Фигура 6. Ефект на водни екстракти от *L. album* спрямо репликацията на HSV-1, щам Vic.

Получените данни за ефекта върху цитопатичния ефект на HSV-1, щам Vic от екстрактите на *L. album* по всяка вероятност се дължат на богатия им химичен състав с множество компоненти с описана в литературата антивирусна активност. Двата метанолови екстракта са богати на хлорогенова киселина (Chiang L. et al., 2002),

както и на флаваноидите лутеолин и мирецитин (Lyu S. et al., 2005). При MeS екстрактите също така се открива ванилова киселина – също с описана в литературата активност към вируса (Chiang L. et al., 2002). Според химичния състав всичките открити активни компоненти са в по-големи количества при извличането им от нативно култивирани растения, което се потвърждава и от получените от нас данни за антихерпесната им активност. При хлороформните екстракти също са открити активни субстанции. От стеролите такива са β -ситостерола (Alvarez A. et al., 2015) и *a*-токоферола (Hendler S. et al., 1992), като първият е в по-голямо количество в нативните растения, докато вторият присъства само в лабораторно култивираните. От тази група вещества трябва да се отбележи и наличие на сквален при ChSr, който въпреки, че няма пряк ефект върху вирусния цитопатичен ефект, има данни, че действа синергично с други антивирусни препарати (Sarpietro M. et al., 2009). От групата на мастните киселини с антивирусна активност в екстракта са открити линолова киселина (Thomar H. et al., 1987) – в по-голямо количество при нативните растения, както и по-слабо активната палмитинова киселина, като тя се открива основно при лабораторно култивираните растения (Isaacs C. et al., 1991).

4.2.2. Определяне на ефекта върху репликацията на HSV-2 щам Ва:

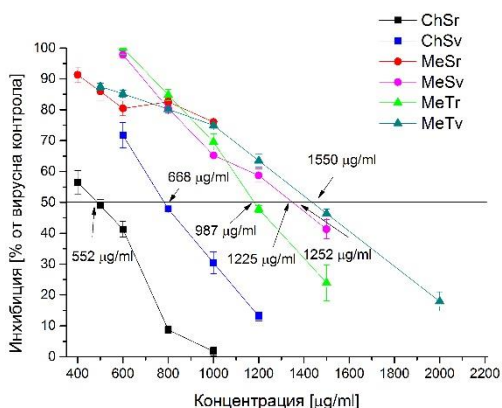
Екстрактите са изследвани за ефект върху репликацията на HSV-2, щам Ва в концентрационните граници, използвани при HSV-1, щам Vic. Експерименталните данни показани на фигура 7 за хлороформните и метаноловите екстракти и фигура 8 за водните такива разкриват относително сходен ефект спрямо репликацията на третирания щам. Единствено екстрактът MeSr не повлиява вируса достатъчно, за да бъде определена стойността на ИК₅₀. При останалите 7 екстракта ефективността е сходна с показаната спрямо HSV-1. Стойността на ИК₅₀ и изчисленият селективен индекс за ChSr е 487 $\mu\text{g/ml}$ (3,22). Това показва незначително повишение на

ефективността спрямо първи тип на вируса. За разлика от него при ChSv тази стойност е 780 $\mu\text{g/ml}$ (2,24), което е по-ниска активност в сравнение със същата срещу първи тип на вируса. При MeSv стойностите са 1350 $\mu\text{g/ml}$ (1,97), също незначително по-ниски спрямо проявеното към тип 1 на вируса.

Стойностите на ИК₅₀ и изчислените селективни индекси за метаноловите термостатни екстракти са съответно MeTr - 1178 $\mu\text{g/ml}$ (2,38) и MeTv - 1420 $\mu\text{g/ml}$ (2,47). И при двата екстракта ефектът е незначително по-силен в сравнение с този при първи тип на вируса, щам Vic.

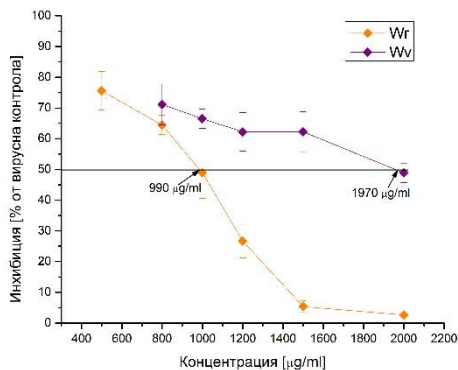
Наблюдаваната активност на водния екстракт от лабораторно култивираното растение Wr - 990 $\mu\text{g/ml}$ (2,65), е близка, макар и по-висока в сравнение с тази спрямо HSV-1, щам Vic.

От осемте екстракта, с ефект върху вирусната репликация най-сериозна е разликата по отношение на антивирусният ефект, спрямо първи и втори тип на HSV, при Wv с ИК₅₀ - 1970 (2,54), което е повече от 50% намаление на ефекта върху вирусния цитопатичен ефект. Селективния индекс от 5,32 намалява на 2,54.



Фигура 7. Ефект на екстракти от *L. album* спрямо репликацията на HSV-2, щам Va.

По литературни данни само част от активните субстанции в изследваните екстракти проявяват ефекта си както срещу HSV-1, така и срещу HSV-2 вируса. Двата активни флаваноида, открити при метаноловите екстракти – мирецитин и лутеолин имат активност само срещу HSV-1 (Lyu S. et al., 2005). В метаноловите екстракти изготвени по термостатна методика се открива р-кумаровата киселина, която е активна само спрямо HSV-2 (Chiang L. et al., 2002). Предвид сравнително близката активност срещу двата вирусни модела, може да се спекулира, че коктейлът от активни субстанции е достатъчно богат, за да компенсира тези разлики във ефекта спрямо вирусния цитопатичен ефект на HSV-1 и HSV-2.

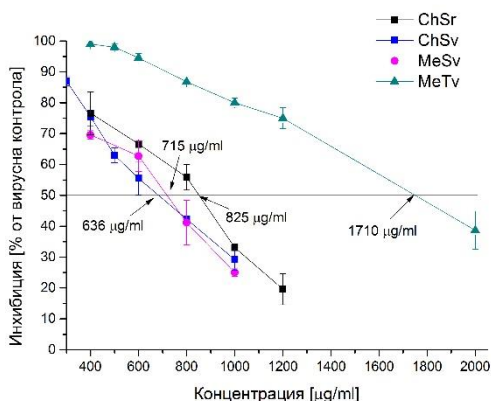


Фигура 8. Ефект на водни екстракти от *L. album* спрямо репликацията на HSV-2, щам Ва.

4.2.3. Определяне на ефекта върху репликацията на ацикловир - резистентен HSV-2 .

Важен показател за всеки нов антивирусен препарат е ефекта му срещу щамове, резистентни на разпространените вече лекарствени

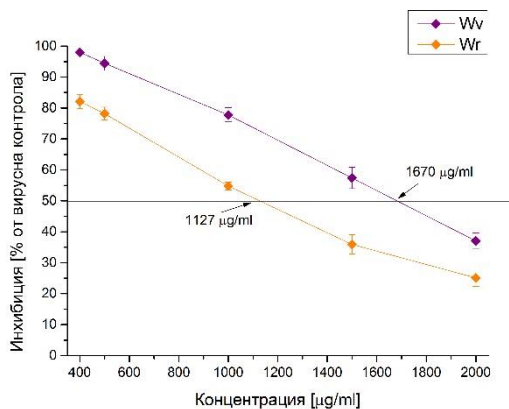
средства. При изследване на инхибиращия им ефект спрямо репликацията на такъв ацикловир-резистентен мутант на HSV-2 (щам DD) активност проявиха шест от изследваните екстракти. Въз основа на получените резултати са построени дозозависими криви показани на фигура 9 за хлороформните и метанолови екстракти и на фигура 10 за водните такива. Двата хлороформни и двата нативни метанолови екстракти повлияват по-слабо вируса като приложени в МНК отчетената инхибиция е между 60% и 82%. ИК₅₀ стойностите на трите екстракта ChSr (825 µg/ml), ChSv (636 µg/ml) и MeSv (715 µg/ml) са близки. Единствено MeTv проявява забележимо по-ниска активност с ИК₅₀ от 1710 µg/ml. Сравнявайки ефекта на екстракта върху ацикловир чувствителния и ацикловир-резистентния щам се вижда, че както ИК₅₀ стойностите така и ефектът от максималната приложена доза са сходни с изключение на случая при MeSv, където се наблюдава близо двукратно засилване на ефекта.



Фигура 9. Ефект на екстракти от *L. album* спрямо репликацията на HSV-2, щам DD.

При двата водни екстракта активността е сходна с тази спрямо чувствителния щам на същия вирус. При Wt ефекта е сходен, макар и по-слаб. ИК₅₀ е 1127 µg/ml срещу 990 µg/ml, при Va, като също така в

МНК инхибицията е 75%. При екстракта получен от нативно култивираното растение, наблюдаваният ефект спрямо резистентния щам е по-силен сравнен с този при чувствителния. ИК₅₀ на Wv е 1670 $\mu\text{g/ml}$ срещу 1970 $\mu\text{g/ml}$, при Va.



Фигура 10. Ефект на водни екстракти от *L. album* спрямо репликацията на HSV-2, щам DD.

Шест от изследваните тринадесет екстракта показаха активност спрямо трита използвани моделни щам на HSV. От останалите седем – пет нямаха ефект върху вирус индуцирания цитопатичен ефект, MeSr показа активност само спрямо щам Vic на HSV-1, а MeTr не въздейства ацикловир резистентния щам DD на HSV-2 (Табл. 4).

Таблица 4. Антивирусна активност на екстракти от *L. album*.

Екстракт	ЦТК ₅₀	HSV-1 щам		HSV-2 щам		HSV-2 щам DD	
		ИК ₅₀	СИ	ИК ₅₀	СИ	ИК ₅₀	СИ
ChSr	1570	552	2,84	487	3,22	636	2,47
ChSv	1750	668	2,62	780	2,24	825	2,12
ChSe	2650	н.е.	-	н.е.	-	н.е.	-
MeSr	1090	987	1,1	н.е.	-	н.е.	-
MeSv	2660	1252	2,13	1350	1,97	715	3,72
MeSe	3000	н.е.	-	н.е.	-	н.е.	-
MeTr	2800	1225	2,29	1178	2,38	н.е.	-
MeTv	3500	1550	2,26	1420	2,47	1710	2,05
MeTe	3050	н.е.	-	н.е.	-	н.е.	-
Er	1732	н.е.	-	н.е.	-	н.е.	-
Ev	1803	н.е.	-	н.е.	-	н.е.	-
Wr	2620	1130	2,32	990	2,65	1127	2,32
Wv	5000	940	5,32	1970	2,54	1670	3

4.3. Въздействие върху екстрацелуларната форма на вируса.

При следващата серия от експерименти целта беше определяне на въздействието на екстрактите с ефект върху вирус индуцирания цитопатичен ефект върху етапите от съществуване на вируса извън клетката гостоприемник – чистата вирусоцидна активност, както и по време на навлизането на вируса в клетката гостоприемник - процесите на адсорбция и пенетрация. При тези експерименти екстрактите получени от реиндуцирани растение, както и етаноловите такива показаха пълната липса на въздействие върху екстрацелуларната форма на вируса, както и в тестовете за инхибиране на вирусния цитопатичен ефект.

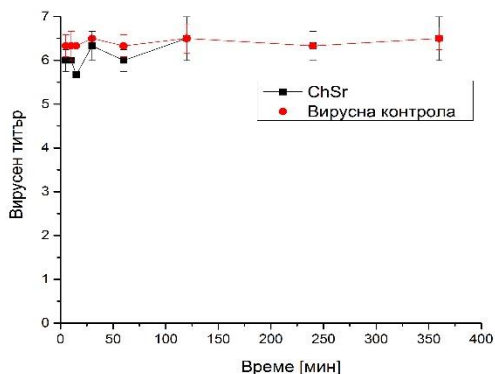
4.3.1. Вирусоцидна активност на хлороформните екстракти спрямо HSV-1, щам Vic.

С цел да изследваме дали растителните екстракти проявяват въздействие върху екстрацелуларния вирус ние проследихме вирусоцидния ефект на екстрактите спрямо HSV-1 щам Vic. По време на експериментите използвахме растителните екстракти в тяхната МНК.

Растителният екстракт ChSr показва несъществено въздействие от самото начало на контакт до 60-тата минута. В следващите интервали от време не се отчита промяна във вирусните титри на пробата и вирусната контрола (табл. 5, фиг. 11).

Таблица 5. Вирусоциден ефект на растителен екстракт ChSr спрямо HSV-1, щам Vic.

Интервали	Вирусен титър на Пробата	Вирусен титър на контролата	$\Delta \log$
5 мин.	6,0	6,33	0,33
10 мин.	6,0	6,33	0,33
15 мин.	5,67	6,33	0,5
30 мин.	6,33	6,5	0,17
60 мин.	6,0	6,33	0,33
120 мин.	6,5	6,5	0
240 мин.	6,33	6,33	0
360 мин.	6,5	6,5	0



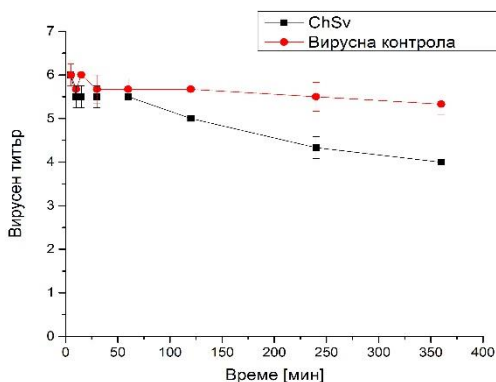
Фигура 11. Вирусоцидно действие на растителния екстракт ChSr спрямо нетретирана вирусна контрола

При проведените аналогични изследвания с нативния растителен екстракт ChSv се очертават сравнително по-добри резултати. Инактивиращият ефект започва да се проявява на 10-тата

минута на контакт и се засилва осезаемо от 120-тата до 360-тата минута. Стойностите на $\Delta\log$ са над единица при прилагане на екстракта на последните два интервала (Табл. 6, Фиг.12).

Таблица 6. Вирусциден ефект на растителен екстракт ChSv спрямо HSV-1, щам Vic.

Интервали	Вирусен титър на Пробата	Вирусен титър на контролата	$\Delta\log$
5 мин.	6,0	6,0	0
10 мин.	5,5	5,67	0,17
15 мин.	5,5	6,0	0,5
30 мин.	5,5	5,67	0,17
60 мин.	5,5	5,67	0,17
120 мин.	5,0	5,67	0,67
240 мин.	4,33	5,5	1,17
360 мин.	4,0	5,33	1,33



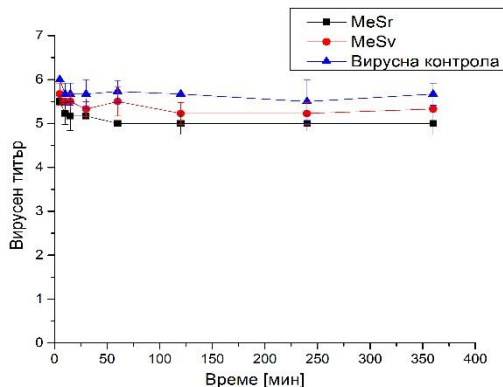
Фигура 12. Вирусцидно действие на растителния екстракт ChSv спрямо нетретирана вирусна контрола

4.3.2. Вирусцидна активност на метаноловите соксклетни екстракти спрямо HSV-1, щам Vic.

Екстрактите MeSr и MeSv проявяват слаба инактивираща активност спрямо първи тип на херпесния вирус. Инактивацията и при двата екстракта не надвишава 90% спрямо вирусната контрола (Табл. 7, Фиг. 13).

Таблица 7. Вирусцидно въздействие на метаноловите соксклетни екстракти.

Интервали	Вирусен титър при прилагане на MeSr	Вирусен титър при прилагане на MeSv	Вирусен титър на контролата	$\Delta \log$ MeSr	$\Delta \log$ MeSv
5 мин.	5,5	5,67	6	0,5	0,33
10 мин.	5,23	5,5	5,67	0,44	0,17
15 мин.	5,17	5,5	5,67	0,5	0,17
30 мин.	5,17	5,33	5,67	0,5	0,34
60 мин.	5	5,5	5,73	0,73	0,23
120 мин.	5	5,23	5,67	0,67	0,44
240 мин.	5	5,23	5,5	0,5	0,27
360 мин.	5	5,33	5,67	0,67	0,34



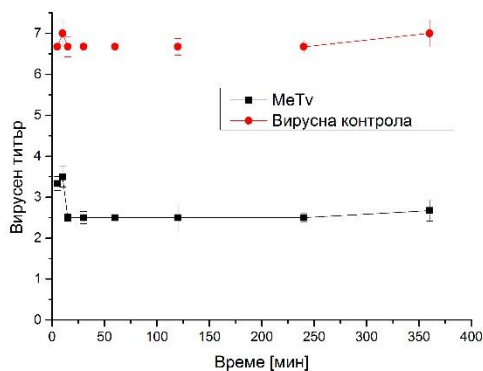
Фигура 13. Вирусоцидно действие на метаноловите соксклетни екстракти спрямо HSV-1, щам Vic.

4.3.3. Вирусоцидна активност на метаноловите термостатни екстракти спрямо вирус HSV-1, щам Vic.

Резултатите от прилагането на MeTv показват изключително висока вирусоцидна активност, което се отчита още на 5-та минута от началото на контакта. Понижаването на вирусния титър е устойчиво – то се запазва до края на изследвания интервал (6 часа след прилагане). (Табл. 8, Фиг. 14). Разликата от титрите на пробата и контролата на 5-та и 10-та минута е над 3 log. От 15-та минута нататък тя се увеличава, като инактивацията достига до над 4 log. Този резултат показва инхибиция над 99,99% на екстрацелуларния HSV-1.

Таблица 8. Инактивиращ ефект на MeTv спрямо HSV-1, щам Vic.

Интервали	Вирусен титър на Пробата	Вирусен титър на контролата	$\Delta \log$
5 мин.	3,33	6,67	3,34
10 мин.	3,5	7	3,5
15 мин.	2,5	6,67	4,17
30 мин.	2,5	6,67	4,17
60 мин.	2,5	6,67	4,17
120 мин.	2,5	6,67	4,17
240 мин.	2,5	6,67	4,17
360 мин.	2,67	7	4,33



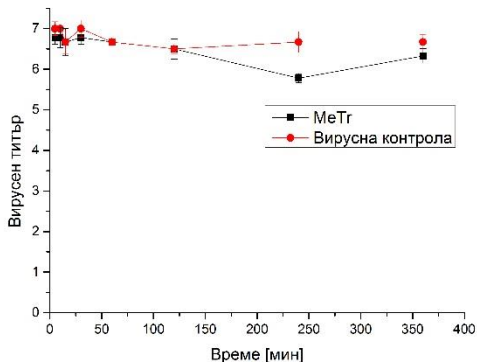
Фигура 14. Вирусоцидно действие на MeTv спрямо HSV-1, щам Vic.

Резултатите от изследването на ефекта на метаноловия термостатен екстракт от лабораторно култивираното растение показват пренебрежим вирусоциден ефект като се наблюдава слабо

завишаване на 4-я час от началото на експеримента, което обаче не достига дори 1 log инактивация и следователно няма приложен характер (Табл. 9; Фиг. 15).

Таблица 9. Инактивиращ ефект на MeTr спрямо HSV-1, шам Vic.

Интервали	Вирусен титър на Пробата	Вирусен титър на контролата	$\Delta\log$
5 мин.	6,78	7	0,22
10 мин.	6,78	7	0,22
15 мин.	6,67	6,67	0
30 мин.	6,78	7	0,22
60 мин.	6,67	6,67	0
120 мин.	6,5	6,5	0
240 мин.	5,78	6,67	0,89
360 мин.	6,33	6,67	0,34



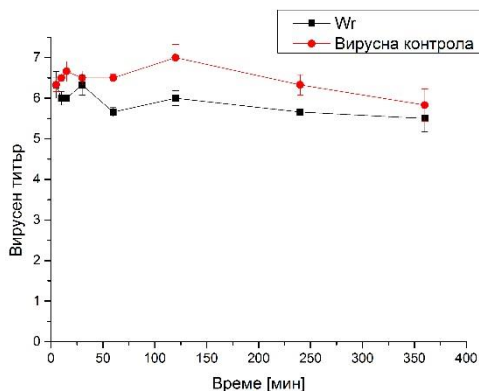
Фигура 15. Вирусцидно действие на MeTr спрямо HSV-1, шам Vic.

4.3.4. Вирусцидна активност на водните екстракти спрямо вирус HSV-1, щам Vic.

Ефектът върху извънклетъчния вирус, проявен от екстракт Wr е слаб. От десетата минута е отчетено слабо повишение на разликата в отчетените титри. Измененията са до 1 log с пик около 120-та минута - инактивация 90% (Табл. 10, Фиг. 16).

Таблица 10. Вирусциден ефект на Wr екстракта спрямо HSV-1, щам Vic.

Интервали	Вирусен тигър на Пробата	Вирусен тигър на контролата	$\Delta \log$
5 мин.	6,33	6,33	0
10 мин.	6	6,5	0,5
15 мин.	6	6,66	0,66
30 мин.	6,33	6,5	0,17
60 мин.	5,66	6,5	0,84
120 мин.	6	7,0	1
240 мин.	5,66	6,33	0,67
360 мин.	5,5	5,83	0,33

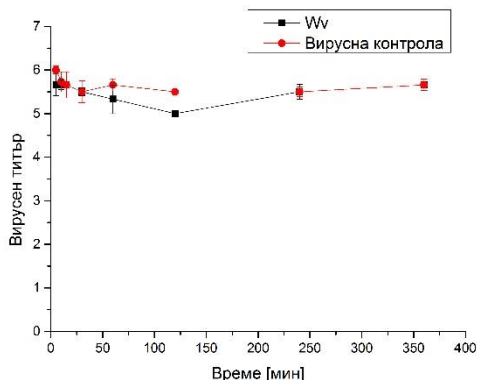


Фигура 16. Вирусцидно действие на Wr спрямо HSV-1, щам Vic.

На фигура 17 и таблица 11 е представено несъществено колебаещо се понижаване на вирусния титър при въздействие с Wv спрямо титъра на нетретираната контрола между 5та и 10та минути и между 60та и 120та минути. Данните показват, че екстрактите оказват незначителен ефект върху екстрацелуларния вирус.

Таблица 11. Вирусциден ефект на Wv екстракт спрямо HSV-1, щам Vic.

Интервали	Вирусен титър на Пробата	Вирусен титър на контролата	$\Delta \log$
5 мин.	4,66	5	0,34
10 мин.	4,66	4,73	0,07
15 мин.	4,66	4,66	0
30 мин.	4,5	4,5	0
60 мин.	4,33	4,66	0,17
120 мин.	4	4,5	0,5
240 мин.	4,5	4,5	0
360 мин.	4,66	4,66	0



Фигура 17. Вирусоцидно действие на Wv екстракта спрямо вирус HSV-1, щам Vic.

4.3.5. Ефект върху началните етапи от вирусния жизнен цикъл – адсорбция и пенетрация.

Двата метанолови термостатни екстракта – MeTr и MeTv, поради проявения инактивиращ ефект, от този получен от нативното растение, бяха изследвани за въздействие на навлизането на HSV-1. В експериментите беше включен и Wr (вирусоцидна активност) и ChSr екстракта, поради силното му въздействие върху вирусната репликация, като и четирите активни екстракта бяха приложени в МНК.

Само екстрактът MeTv блокира напълно тези етапи от вирусния жизнен цикъл. Единствено на първия интервал на въздействие се отчита минимално количество вирус - $\Delta \log$ е 3,83. Това отговаря на 99,98% блокиране. От 30-та минута до края на въздействието процесите на адсорбция и/или пенетрация са напълно прекратени

(Табл. 12 и Фиг. 18). Това напълно корелира със силния вирусоциден ефект на този екстракт.

При направената литературна справка не са открити данни за подобно силно въздействие на вещества с растителен произход върху адсорбцията на вируса в клетката гостоприемник. Като възможен механизъм може да се предположи взаимодействие на някой от компонентите на екстракта с повърхностни рецептори на вириона или вирусните рецептори по повърхността на клетката.

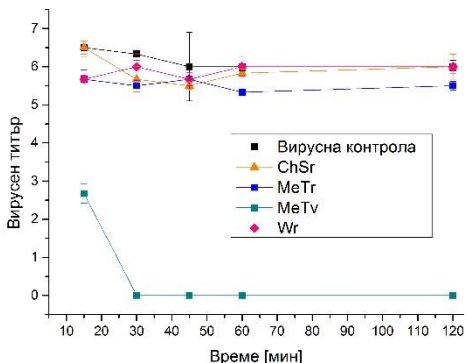
Останалите изследвани екстракти - MeTr, ChSr и Wr, слабо повлияват навлизането на HSV-1 щам Vic, като понижението на вирусния титър е с 0,83-0,17 log.

Заедно със силното вирусоцидно въздействие, ефекта върху блокирането на началните етапи на вирусния жизнен цикъл от MeTv екстрактът са най-важните от практикческата гледна точка резултати. Тези резултати представени на Първия средиземноморски симпозиум за медицински и ароматни растения в Газимагоза, Турска република на северен Кипър, привлякоха и вниманието на частната компания „Биохербес“ ЕООД. Беше решено да се създаде козметичен препарат, в който основната активна субстанция да е именно този екстракт от растението с цел терапия и превенция на развитието на изяви на херпес симплексния вирус тип 1 у ползвателите на продукта „Фитохерпан“. След период на разработка и регистрация на продукта в средата на 2015 година първите партии на козметичния крем бяха пуснати в търговската мрежа.

Таблица 12. Блокиране на началните етапи на вирусния жизнен цикъл на HSV-1, щам Vic.

Минута	Титър на вирусната контрола	Титър при третиране с:							
		ChSr		MeTr		MeTv		Wr	
15	6,5	6,5	0*	5,67	0,83*	2,67	3,83*	5,67	0,83*
30	6,33	5,67	0,66*	5,5	0,83*	0	6,33*	6	0,33*
45	6	5,5	0,5*	5,67	0,33*	0	6*	5,67	0,33*
60	6	5,83	0,17*	5,33	0,67*	0	6*	6	0*
120	6	6	0*	5,5	0,5*	0	6*	6	0*

*- Длог спрямо вирусна контрола



Фигура 18. Блокиране на адсорбцията на HSV-1, щам Vic.

4.4. Влияние върху кинетиката на вирус HSV, щам Vic.

4.4.1. Влияние на метаноловия термостатен екстракт от нативно култивирано растение върху кинетиката на вирус HSV, щам Vic.

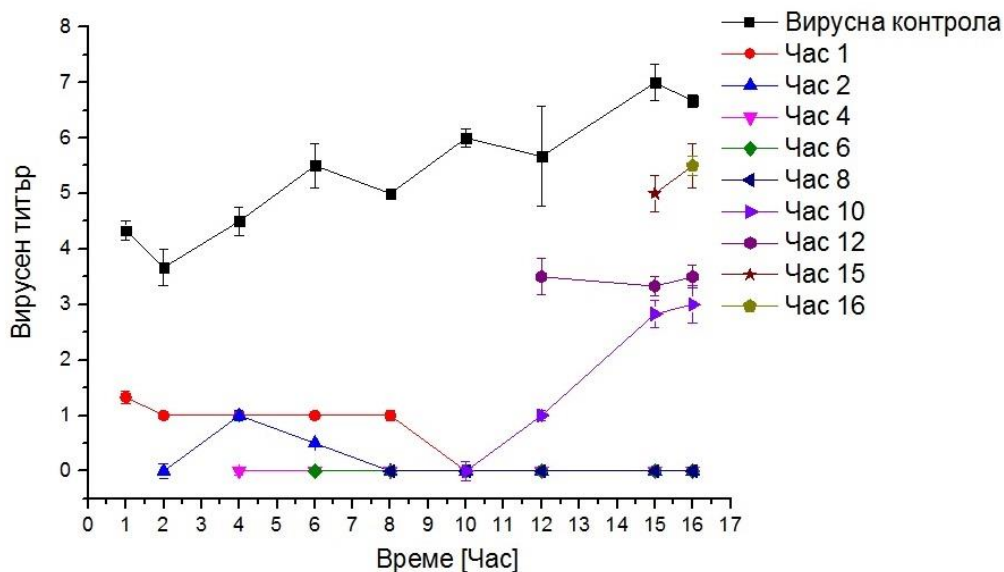
С цел да се определи механизма на антихерпесното действие изследвахме кинетиката на антивирусното въздействие срещу HSV-1,

щам Vic на MeTv екстракт при концентрация 1000 µg/ml (Табл. 13, Фиг. 19).

MeTv проявява както значителна вирусоцидна активност, така и инхибира вирусния цитопатичен ефект. Това дава основание за задълбочаване на изследвания на неговото въздействие върху HSV-1 чрез определяне влиянието му върху кинетиката на HSV-1, щам Vic.

Таблица 13. Ефект на MeTv спрямо кинетиката на HSV-1, щам Vic.

Час на отчитане от началото на инфекцията	Час на прилагане на екстракта от началото на инфекцията									
	Вирусна контрола	1	2	4	6	8	10	12	14	16
2	4,33	1,33								
3	3,67	1	0							
5	4,5	1	1	0						
7	5,5	1	0,5	0	0					
9	5	0,5	0	0	0	0				
11	6	0	0	0	0	0	0			
13	5,67	0	0	0	0	0	1	3,5		
16	7	0	0	0	0	0	2,83	3,33	5	
17	6,67	0	0	0	0	0	3	3,5	5,5	5,5



Фигура 19. Влияние на MeTv спрямо кинетиката на репликация на HSV-1, щам Vic.

Прилагането на екстракта непосредствено след адсорбцията води първоначално до силно инхибиране на вируса до 9-я час. От 11-я час до края на репликативния цикъл не се отчита наличие на активен вирус, като \log е средно 6 при пробите въздействани от началото на експеримента. При прилагането му на по-късните ентервали ефектът е по-слаб - \log варира от 2,67 до 4,5 съпоставено с нетретираната вирусна контрола.

Този резултат говори за непосредствено въздействие върху началните етапи на вътреклетъчното развитие на вируса и съвпада с получените данни за въздействие върху процесите на адсорбция и пенетрация. Ефектът се отразява и на останалите етапи от репликационния цикъл. Прилагането на екстракта в следващите 4

интервала 2-8 час показва пълно инхибиране на тези началните етапи от цикъла. Това е резултат вероятно от блокиране на експресията на и/или транслацията на α и β белтъците. Към тях спадат вирусни белтъци с контролни ензимни функции необходими както за ДНК синтезата и репликацията на вирусния геном, така и за синтезата на следващите класове белтъци. Имайки предвид, че генната експресия започва още на 1-вия час след инфекцията по време на което се синтезират белтъците - ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 и ICP47, които имат регулативна роля и контролират експресията на ранните и късните гени. Промени в процеса на експресия на гените повлиява също така геномната репликация. Резултатът от прилагането след 10-я час на екстракта показва потискане на репликацията, но в по-ниска степен. Въздействието постепенно отзвучава до 16-я час.

Тези данни могат да се обяснят по-скоро с въздействие върху синтезата на структурните белтъци или върху механизмите на сглобяване на вирусното потомство и напускане на инфектираните клетки.

Въз основа на данните от химичния състав на метаноловите екстракти, с които разполагаме (Димитрова М. 2014), може да потвърдим наличието на 3 активни по литературни данни субстанции съдържащи се в *L. album* – хлорогеновата фенолна киселина и флаваноидите – лутеолин и мирицетин (Chiang L. et al., 2002; Lyu S. et al., 2005).

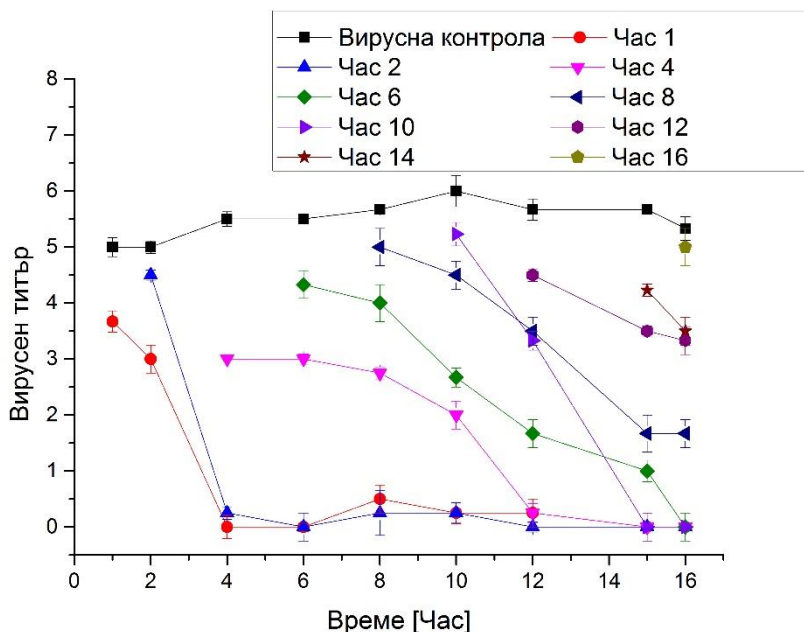
4.4.2. Влияние на водния екстракт от нативно култивирано растение върху кинетиката на вирус HSV, щам Vic.

С цел да се определи механизма на антихерпесно действие на водните екстракти от нативно култивираното растение изследвахме кинетиката на антивирусното въздействие срещу HSV-1, щам Vic в присъствие на екстракта при концентрация 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Табл. 14, Фиг. 20).

Изследванията на екстата Wv показват значителна активност върху вирусния цитопатичен ефект. Това даде основание за задълбочаване на изследвания на неговото въздействие върху HSV-1 чрез определяне на кинетиката му на действие.

Таблица 14. Влияние на Wv спрямо кинетиката на HSV-1, щам Vic.

Час на отчитане от началото на инфекцията	Час на прилагане на екстракта от началото на инфекцията									
	VK	1	2	4	6	8	10	12	14	16
2	5	3,67								
3	5	3	4,5							
5	5,5	0	0,25	3						
7	5,5	0	0	3	4,33					
9	5,67	0,5	0,25	2,75	4	5				
11	6	0,25	0,25	2	2,67	4,5	5,23			
13	5,67	0,25	0	0,25	1,67	3,5	3,33	4,5		
16	5,67	0	0	0	1	1,67	0	3,5	4,23	
17	5,33	0	0	0	0	1,67	0	3,33	3,5	5



Фигура 20. Влияние на Wv спрямо кинетиката на репликация на HSV-1, щам Vic.

Прилагането на екстракта непосредствено след адсорбцията води до постепенно инхибиране на вируса през целия изследван интервал. Забелязва се по-силен и бърз ефект в ранните часове на прилагане, като се отчита пълна инхибиция на репликацията при прилагане до 10-ия час от началото на експеримента. За следващите интервали активността е в пряка зависимост от времето на прилагане. Наблюдаваният ефект може да бъде отдаден на блокиращо въздействие на екстракта върху експресията на гените за белтъци от α , β и γ класовете и/или върху тяхната транслация. Към тях спадат белтъци с контролни, ензимни и структурни функции, необходими както за репликацията на вирусния геном, така и за сглобяване на вирусната частица и напускане на клетката-гостоприемник. Експресия на вирусния геном започва още на 1-вия час след

инфекцията по време на синтезата на белтъците от α класа - ICR0, ICR4, ICR22, ICR27 и ICR47 - които изпълняват важна регулативна роля по време на геномната репликация, както и в активиране на експресията на следващите два белтъчни класа, може да се заключи, че екстракта повлиява всички по-горе описани стадии от вътреклетъчния цикъл на развитие на вируса - до напускане на клетката-гостоприемник.

По литературни данни от растението са изолирани биологичноактивни вещества като: бензоксаноиди, иридоиди, глюкозиди, флавоноиди, феноли, фенилпропаноиди, полизахариди, тритерпенни сапонини, танини, слюзни и дъбилни вещества, сапонини и етерични масла, биогенни амини, холини, тирамини и хистамини (Станева Д., и съавт. 1986). Някои от тях имат доказан антивирусен ефект.

Това подкрепя становището ни, че експерименталните данни отразяват въздействието на няколко активни вещества с различни мишени на действие, т.е. действащи на различните етапи на вирусния репликационен цикъл.

Изводи

I. Изследвана е цитотоксичната активност на 13 хлороформни, метанолови, етанолови и водни екстракти, получени чрез соксклетна, термостатна методика или чрез лиофилизация, от нативни, лабораторно култивирани и реиндуцирани екземпляри от растението *Lamium album* L. спрямо клетъчна линия MDBK:

1. Определени са МНК на изследваните екстракти.
2. Определени са стойностите на ЦТК₅₀.

II. Определено е въздействието на екстрактите върху репликацията на HSV-1, щам Vic, HSV-2, щам Ba и HSV-2, ацикловир резистентен щам DD. Изчислени са стойностите на химиотерапевтичните показатели - ИК₅₀ и СИ на активните екстракти.

1. Според инхибиторната си ативността спрямо репликацията на HSV-1 активните екстракти се подреждат във възходящ йерархичен ред както следва:
MeSr < MeSv < MeTv < MeTr < Wr < ChSr < ChSv < Wv.
2. Установеният възходящ йерархичен ред на активните екстракти според проявената инхибиция спрямо HSV-2 е следния: MeTv < MeSv < ChSr < MeTr < Wv < Wr < ChSv.
3. При въздействие върху на ацикловир резистентния щам на HSV-2 активните екстракти се подреждат във възходящ ред както следва: MeTv < ChSr < Wr < ChSv < Wv < MeSv.

4. Установена е зависимост на антивирусната активност на екстрактите от вида на изходния растителен материал и от използвания екстрахиращ агент.

III. Определена е вирусоцидната активност на екстрактите спрямо HSV-1, щам Vic.

1. Метаноловият термостатен екстракт от нативно култивираното растение (MeTv) притежава най-висока инактивираща активност - над 99,99% ($\Delta \log 4$).
2. Хлороформните и метаноловите екстракти, получени чрез термостатна и соксклетна методика, както и водните екстракти проявяват несъществена вирусоцидна активност.

IV. Етаноловите екстракти, както и екстрактите, получени от реиндуцираните растение, не проявяват антихерпесна активност.

V. Определено е въздействието на най-активни екстракти: хлороформен соксклетен (ChSr), метанолов термостатен (MeTr), воден (Wr) от лабораторно култивирано растение и метанолов термостатен (MeTv) от нативно растение, върху началните етапи на вирусния жизнен цикъл. Най-висока активност притежава екстрактът MeTv. Приложен в МПК екстрактът напълно процесите на адсорбция и пенетрация в клетката гостоприемник след 15-тата минута на контакт.

VI. Установен е многофакторен механизъм на действие на метаноловия термостатен (MeTv) и водния (Wv) екстракти от нативно култивирано растение върху кинетиката на HSV-1, който се дължи на сложния им химичен състав.

Справка за приносите свързани с дисертационния труд

Научни приноси.

1. За първи път са получени данни за ефектите от прилагането на 13 екстракти – хлороформни, метанолови, етанолови и водни, получени чрез соклетна, термостатна методика или чрез лиофилизация, от нативни, лабораторно култивирани и реиндуцирани екземпляри от растението *Lamium album* L., върху: репликацията на HSV-1, щам Vic; HSV-2, щам Ba и ацикловир-резистентен щам DD; извънклетъчната форма на HSV-1, както и началните етапи на вирусния жизнен цикъл (адсорбция и пенетрация) на HSV-1.

От експерименталните данни най-ярко се открояват три факта - силната нхибираща активност на водния екстракт (Wv) със СИ 5,32 спрямо HSV-1 и силното вирусоцидно въздействие на метаноловия термостатен екстракт (MeTv), получени от нативно растение – *Dlog* 4 и практически пълното блокиране на началните етапи на вирусния жизнен цикъл от екстракта MeTv.

2. Доказано е влиянието върху различните етапи на репликация на HSV-1, щам Vic. в клетката гостоприемник на двата най-активни екстракти - метанолов термостатен (MeTv) и воден (Wv), получени от нативното растение.

Приноси с приложен характер.

На базата на получените експериментални данни за силна антихерпесна активност на метаноловия термостатен екстракт, получен от нативни екземпляри на растението *Lamium album* L., е разработен и регистриран козметичния продукт „Фитохерпан“ с участието на фирма Биохербес ЕООД.

Публикации свързани с дисертационния труд

1. TODOROV, D. Comparative anti-herpes effects of the chloroform *in vitro* and *in vivo* extracts, derived from *Lamium album* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2013, 19.2: 190-193.
2. TODOROV, Daniel, et al. Anti-herpes effects of *in vitro* and *in vivo* extracts derived from *Lamium album* L. *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski"*, 2015, 100:4 177-183.

Съобщения свързани с дисертационния труд

1. TODOROV, D. et al., Antih herpes activities of *in vitro* and *in vivo* extracts derived from *Lamium album* L. 1-st Mediterranean Symposium on Medical and Aromatic Plants, 27-20 April 2012, Gazimagosa, Cyprus. Abstract book, p184
2. ANGELOVA D. et al., Evaluation of antioxidant and antiviral activity of extracts from *in vivo* grown and *in vitro* cultivated plants of *Lamium album* L., 13th Congress of International Society for Ethnopharmacology, September 2-6 2012, Graz, Austria, Book of abstracts, 238
3. TODOROV, D. et al., Antih herpes activities of extracts from *Lamium album* L. 2012. 3-rd Congress of Virology. 25-27 Октомври, 2012. София. Book of abstracts, p30.
4. TODOROV, D. et al., Comparative anti-herpes viral effects of *in vitro* and *in vivo* extracts derived from *Lamium album* L. Млад.науч.сесия „Климентови дни“, 22-23 ноември 2012, София, Сб. Рез., p39.
5. TODOROV, D. et al., Use of extracts derived from *Lamium album* L. for treatment of HSV infection *in vitro*. Intern. Confer. of Natural Product Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, November 2013, Bansko, Bulgaria. Book of abstracts, SL13, pp. 50.

6. TODOROV, D. et al., Anti-herpes effects of in vitro and in vivo extracts derived from *Lamium album* L. Първа национална конференция по биотехнология 30 години биотехнология в България, 17-18 окт., 2014 г., софия, биологически факултет, СУ "Св. Климент Охридски", Сб. резюм., р60

Исползвана литература

1. ÁLVAREZ, Ángel L.; HABTEMARIAM, Solomon; PARRA, Francisco. Inhibitory effects of lupene-derived pentacyclic triterpenoids from *Bursera simaruba* on HSV-1 and HSV-2 in vitro replication. *Natural product research*, 2015.
2. CHIANG, L. C., et al. Antiviral activity of *Plantago* major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral research*, 2002, 55.1: 53-62.
3. HAYASHI, K., et al. Antiviral activity of 5, 6, 7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1997, 39.6: 821-824.
4. HENDLER, Sheldon S.; SANCHEZ, Robert. *Tocopherol-based antiviral agents and method of using same*. U.S. Patent No 5,114,957, 1992.
5. ISAACS, Charles E., et al. *Antiviral and antibacterial activity of fatty acids and monoglycerides*. U.S. Patent No 4,997,851, 1991.
6. LYU, Su-Yun; RHIM, Jee-Young; PARK, Won-Bong. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Archives of pharmacal research*, 2005, 28.11: 1293-1301.
7. MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983, 65.1: 55-63.
8. MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962, 15.3: 473-497.
9. PAUWELS, Rudi, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *Journal of virological methods*, 1988, 20.4: 309-321.
10. REED, Lowell Jacob; MUENCH, Hugo. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 1938, 27.3: 493-497.
11. SCHINELLA, G. R., et al. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences*, 2002, 70.9: 1023-1033.
12. TAKEUCHI, Hitoshi; BABA, Masanori; SHIGETA, Shiro. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *Journal of virological methods*, 1991, 33.1: 61-71.

13. THORMAR, H., et al. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1987, 31.1: 27-31.
14. YARMOLINSKY, Ludmila, et al. Antiviral activity of ethanol extracts of *Ficus binjamina* and *Lilium candidum* in vitro. *New biotechnology*, 2009, 26.6: 307-313.
15. TOMA, Hassanain S., et al. Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease. In: *Seminars in Ophthalmology*. UK: Informa UK Ltd, 2008. p. 249-273.
16. BERNSTEIN, David I., et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, 56.3: 344-351.
17. BERNSTEIN, David I., et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, 56.3: 344-351.