

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационния труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № РД 38-753/22. 12. 2015 г. на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски“

на **Даниел Ганчев Тодоров**,  
магистър по молекулярна биология със специализация по вирусология  
и редовен докторант по вирусология

на тема **„Противовирусен ефект на природни продукти“**  
за получаване на научната и образователна степен „доктор“ в област на висше образование  
4. Природни науки, професионално направление 4.3. “Биологични науки” по научна  
специалност “Вирусология”

от доц. д-р **Юлия Серкеджиева**

**Тема на дисертацията.** Темата на представената ми за рецензия работа “Противовирусен ефект на природни продукти”, макар и много общо формулирана, правилно насочва изследването към практически много важен и актуален проблем, а именно – чрез прилагане на растителни екстракти обосноваване на възможност за алтернативен подход за инхибиция на херпесните вируси. С това се цели преодоляване на нежеланите странични ефекти на известни в практиката антихерпесни препарати и най-вече възникването на резистентност към тяхното противовирусно действие.

Херпесните вируси причиняват различни заболявания при човека и животните. Предаването им се осъществява по различни механизми, развиват се сравнително тежки, включително и фатални за пациентите заболявания, съществуват и латентни форми без клинични изяви. Херпесните вируси са повече от 80 и се размножават в широк кръг гостоприемници – от човека до безгръбначните, топлокръвни и студенокръвни.

В клиничната практика са известни множество антихерпесни препарати. Acyclovir е синтетичен пуринов нуклеозиден аналог с активност срещу редица херпесни вируси. Той е високо селективен по отношение на инфектираните с херпесни вируси клетки поради изразения му афинитет към вирусната тимидин киназа. Valacyclovir е пролекарство, което бързо се превръща в активния метаболит acyclovir. Famciclovir се трансформира до активен метаболит penciclovir, инхибиращ синтеза и репликацията на вирусната ДНК. Ganciclovir е синтетичен аналог на 2-дезоксигуанозин, който потиска репликацията на херпесните вируси *in vitro* и *in vivo*. Valganciclovir бързо се метаболизира до ganciclovir.

Наличието на странични ефекти, както и бързата поява на резистентни мутанти, особено при имунокомпрометирани пациенти, ограничават широкото използване на известните противохерпесни препарати. При търсенето на нови активни антивирусни вещества е доказана ползата от изследването на инхибитори от природен произход (Vlietinck and Vanden Berghe, 1991). Доказана е противохерпесната активност на редица растения (Andonov and Dundarov, 1971; Suganda *et al.*, 1983; Serkedjieva *et al.*, 1990;

Zgorniak-Nowosielska *et al.*, 1991; Beucher *et al.*, 1994; McCutcheon *et al.*, 1995 и др.). Само в някои от тях е установен активният принцип на действие. По всяка вероятност не само наличието на различни биологично-активни вещества, но и техните синергични взаимодействия могат да отговорят за противовирусния ефект на растителните екстракти

**Литературна осведоменост.** Литературният обзор е пълен, сполучливо илюстриран с 3 таблици и 10 фигури, включва всички важни въпроси на патогенезата и епидемиологията на херпесната инфекция, строежа и репликацията на херпесните вируси, профилактиката и терапията на инфекцията, като подчертано внимание е обърнато на познатите химиотерапевтици, както и на инхибиторите от природен произход, с което се прави връзка с темата на дисертацията и подчертава нейната актуалност и перспективност. Включени са най-нови данни от обсъжданата научна област. Отбелязани са изследвания на български автори. Литературния обзор дава представа за несъмнената професионална осведоменост на Д. Тодоров. Прави много добро впечатление стегнатия стил на автора. Литературният обзор е написан прегледно, интелигентно, на хубав български език, без повторения, без логически несъответствия, с изолирани граматични и печатни грешки. Даже бих препоръчала след незначителни корекции обзорът да се отпечата.

Тези мои наблюдения за стила на писане на Даниел се отнасят за цялата дисертация.

**Забележки към литературния обзор.** Литературният обзор е малко по-голям от приетото съотношение 1:2 спрямо раздела на собствените изследвания (50:78). Някои данни можеха да бъдат спестени, напр. редица подробности за молекулярната биология на херпесните вируси, за имунния отговор към херпесните инфекции, а също и моите данни върху противогрипното действие на ПК от *G. sanguineum*, тъй като нямат пряка връзка с разработката на Д. Тодоров. Работата на Stankova *et al.*, 2011 е пропусната в библиографията.

На стр. 47 е написано, че се описват „представители на българската фауна”, всъщност става дума за растения.

**Целта на разработката** и произтичащите от нея 5 задачи са формулирани ясно и прецизно.

**Методична страна.** Разделът “Материал и методи” е написан достатъчно изчерпателно; подбрани са подходящи методи, адекватни за постигане на поставените задачи, личи познаване на тънкости от експерименталната работа.

Изследвано е действието на 13 екстракти от растението бяла мъртва коприва – *Lamium album* L. (сем. Lamiaceae). Интересът към това растение е оправдан, тъй като растението и екстракти и изолирани вещества от него са проявили редица биологични активности – противогрипна, адстрингентна, антисептична, противоракова. Произходът на екстрактите в настоящото изследване е *in vivo* (събрани от естествено находище), *in vitro* (култивирани експланти при контролирани условия) и *ex vitro* (адаптирани обратно в естествени условия). Екстрактите са приготвени по 3 метода – екстракция чрез апарат на Soxhlet, екстракция в термостат и екстракция на предварително лиофилизиран материал.

Приложени са сполучливо няколко експериментални схеми и опитите са извършени с 3 вирусни модела - един щам на херпес симплекс вирус 1 и два щамна на херпес симплекс

вирус 2 - единият от тях е ацикловир-резистентен и неговото включване е много уместно.

**Забележки към Материали и методи.** В Табл. 4 последните два екстракта са представени с едно и също название – „воден лиофилизиран екстракт от лабораторно култивирано растение” и различни сигнатури – Wг и Wv. По логиката на другите сигнатури Wv трябва да е воден лиофилизиран екстракт от диворастящо растение.

Опитът в условията на едностъпен цикъл не е описан много точно и не става ясно на кой час се отчита пробата. Предполага се, че това става на 16-я час, а не на „определените интервали”. Адсорбцията се извършва при 37 °С; по-прецизно би било тя да се провежда при 4 °С за да се отдиференцира от проникването на вируса в клетките. Действието върху клетъчните рецептори пък би могло да се определи чрез предварително третиране на клетките в продължение на 1 час при 37 °С.

Липсва положителна контрола, напр. ацикловир.

**Резултати и приноси на дисертационния труд.** Най-съществената част на представения ръкопис е разделът „Резултати и обсъждане”, където синтезирано са представени резултатите от проведените изследвания, онагледени подходящо с добре оформени 14 таблици и 20 фигури. Изследванията имат стройна логична последователност и естествено произтичат едно от друго.

Резултатите могат условно да бъдат групирани в четири раздела.

В първия раздел е проучена цитотоксичността на екстрактите спрямо клетъчни култури МДВК по два метода: определяне на МПК чрез отчитане на преживяемостта на клетките; и определяне на ЦТК<sub>50</sub> - чрез съвременен, прецизен тетразолен метод – МТТ.

Важно е наблюдението, че цитотоксичността на MeOH екстрактите зависи определено от изходния материал и докато за лабораторно култивираните растения ЦТК<sub>50</sub> е 1000 мкг/мл, при адаптираните растения *ex vitro* е 2600 мкг/мл. Това не е валидно за водните екстракти, токсичността на които не се влияе от произхода на изходния материал. Подчертано нетоксичен е водният екстракт от диворастящо растение – 5000 мкг/мл. Важно наблюдение с практическо значение е по-голямата поносимост на екстрактите от диворастящи растения за клетките. Типичен пример е токсичността при MeOH екстрактите, получени по соклетен метод – докато ЦТК<sub>50</sub> на екстракта от диворастящото растение (MeSv) е 2660 мкг/мл, ЦТК<sub>50</sub> на екстракта от лабораторно култивираното растение (MeSr) е 1090 мкг/мл. Тези резултати трябва да се имат предвид при оценка на перспективността на различните по произход екстракти.

Вторият раздел обхваща изследванията върху противовирусното действие на екстрактите в клетъчни култури МДВК чрез отчитане на вирусния цитопатичен ефект и определяне на основните химиотерапевтични показатели ИК<sub>50</sub> и СИ.

Установено е, че 5 от екстрактите не притежават антивирусна активност, 7 от тях имат слаб ефект срещу репликацията на един или и на трите вирусни модела. Може да се обобщи, че екстрактите не въздействат върху проявата на ЦПЕ, а ниските селективни индекси могат да говорят за скрита токсичност. Единствено водният екстракт от диворастящо растение (Wv) има сигнификантен СИ (5.32) по отношение на ХСВ тип 1. Спрямо размножението на другите два вируса - АЦВ-чувствителния и АЦВ-резистентния

щамове на ХСВ тип 2 е демонстриран по-слаб противовирусен ефект на екстракта.

Направен е опит да се свърже ефектът върху ЦПЕ с химическия състав на екстрактите. Подходящо е заключението, че наличните вещества могат взаимодействат синергично. Това е основна характеристика на многокомпонентните растителните екстракти.

Третият раздел на проекта обхваща опитите по определяне ефектите върху екстрацелуларния вирус (т. нар. вирусоцидно действие). Резултатите от тези експерименти са интересни и перспективни. Силно вирусоцидно действие се наблюдава за метаноловия термостатен екстракт от диворастящо растение (MeTv). Вирусният титър се понижава до 6-я час след прилагането; разликата в инфекциозните титри между контролата и третирания вирус е над 3.0 lg и достига 4.33 lg. За сравнение метаноловият екстракт от лабораторно култивирано растение (MeTr) няма ефект. Не става ясно защо не е изследван и метаноловият екстракт от *ex vitro* култивирано растение (MeTe). Подчертаният вирусоциден ефект не само има потенциално практическо значение, но и това е реализирано чрез включването на MeTv в състава на препарата „Фитохерпан“. Смятам, че това е много важно практическо постижение на дисертационната разработка.

Четвъртият раздел обобщава опити за установяване на ефекта на екстрактите върху началните етапи от вирусната репликация адсорбция и проникване и в експерименти в условията на едностъпен цикъл на вирусно размножаване в клетъчни култури MDBK. С това се цели да се изяснят някои страни от начина на противовирусното действие.

Наблюдава се изненадващо силен ефект на метаноловия термостатен екстракт от диворастящо растение (MeTv) в доза 1000 мкг/мл в условията на едностъпен цикъл на вирусно размножение. При множественост на инфекцията 10 той показва подчертано вирусинхибиращо действие, докато при многоцикловите опити, при далеч по-ниска множественост на инфекцията, потискащият ефект е сравнително слаб (СИ 2.26).

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  $\Delta \log$  е средно 6.0 при пробите въздействани от началото на експеримента. При прилагането му на по-късните интервали ефектът е по-слаб -  $\Delta \log$  варира от 2.67 до 4.5.

Потискащият ефект се свързва от една страна с въздействие върху белтъчната синтеза предимно на ранните вирусни белтъци и от друга – с наличието и взаимодействието на 3 активни субстанции – хлорогенова киселина, лутеолин и мирицетин. Последното можеше да бъде проверено чрез изследване на 3-те субстанции в същата експериментална схема.

Тези изследвания са много важен етап от цялата разработка и според мен можеше да им бъде отделено по-обстойно обсъждане.

Установено е силно противовирусно действие и на водния екстракт от диворастящо растение (Wv) в доза 2000 мкг/мл. 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-я час от началото на експеримента. За следващите интервали активността е в пряка зависимост от времето на прилагане.

По литературни данни от растението са изолирани редица биологичноактивни вещества с различна природа (Станева Д., и съавт. 1986). Някои от тях са с доказан антивирусен ефект.

Правилно е заключението, че постигането на противовирусен ефект зависи от въздействието на няколко активни вещества с различни мишени на въздействие.

В екстрактите *in vitro* е наблюдавано 11-13 пъти намаляване на общото флавоноидно съдържание, както и на някои полифенолни и някои мастни киселини. В *in vitro* и *ex vitro* растенията намалява и количеството на стеролите и тритерпените, в растенията *in vitro* последните се снижават до 8 пъти. В същото време количеството на някои въглехидороди, както и на някои наситени мастни киселини е увеличено в растенията *in vitro*. Определени са съединения, налични единствено в растенията *in vitro*. Тези данни показват колко важно е да се определя активният/активните принципи на действие за да се прецени ефективността на различните видове растителни екстракти.

Резултатите от собствените изследвания са описани много добре, кратко и синтезирано. Смятам, че обсъждането им би могло да бъде по-многословно и самоуверено. Това се отнася особено за тази част от дисертацията, която има приоритетен характер, а именно доказването на ефективността на някои от растителните екстракти от бяла мъртва коприва върху извънклетъчния херпесен вирус и неговата репликация в клетъчни култури.

**Забележки по резултати и обсъждане.** Фразата, с която се обосновава изборът на метаноловия термостатен от лабораторно култивирано растение (MeTr) и метаноловия термостатен от диворастящо растение (MeTv) екстракти за опитите по изследване на противовирусното действие не е ясна (стр. 95). Освен това MeTr има слабо въздействие (Табл. 12). На стр. 92 е посочено, че и водният екстракт от лабораторно култивирано растение (Wr) също има слаб ефект; това се вижда и от Табл. 13. Твърди се, че ChSr (хлороформен соксклетен екстракт от лабораторно култивирано растение) е избран поради силното му въздействие върху вирусната репликация, но данни за силно въздействие не са представени: СИ са в границите 2.47 – 3.22.

Тук-там са използвани чуждици: инфектирани вм. заразени клетки, позиционирани вм. разположени, интрамембранно и др.

Логично и закономерно са изведени **изводите**, които в концентриран вид, достоверно представят резултатите от изследването, проведено от г-н Тодоров.

**Забележка.** За 6-ти извод бих отбелязала, че няма експериментални данни за да се твърди, че метаноловият термостатен (MeTv) и водният (Wv) екстракти от нативно култивирано растение имат „многофакторен“ механизъм на действие.

Съгласна съм със справката за **приносите** на дисертационния труд. Те са безспорни, имат оригинален научен характер и отговарят на критериите за придобиване на образователната и научна степен «доктор».

**Публикации във връзка с дисертационния труд.** По темата на разработката са представени 2 публикации – една е в Bulgarian Journal of Agricultural Sciences, списание с импакт фактор, а втората е в Годишника на Университета. И в двете статии докторантът е първи автор. Части от дисертацията са представени на различни научни форуми, 2 в

чужбина и 4 в нашата страна, като в 5 от съобщенията докторантът е първи автор.

**Забележки по статиите.** Статия в Bulg. J. Agricult. Sci.: Определяна е  $CC_{50}$ , но не е описана в Материал и методи; същото се отнася за  $IC_{50}$ , а освен това в текста се говори за  $IC_{50}$ , а в таблицата са дадени стойности за  $ID_{50}$ . Във фиг. 1 на ординатата са нанесени стойности за Chlorophorm (in vitro). Не разбирам какво значи това, но според мен там е обозначена инхибицията (% от вирусната контрола). Статия в Годишника на Университета: твърди се, че растителните екстракти "... have fewer side effects". Това не е съвсем вярно, известно е, че едни от най-силните отрови са растителни.

**Личният принос** на дисертанта в разработката на дисертационния труд е несъмнен. За това може да се съди и от представените научни публикации, доклади и съобщения върху темата на дисертацията.

**Оформяне на дисертационния труд.** Представеният ръкопис се състои от 128 страници и е съставен от следните части: увод – 2 стр., литературен обзор – 52 стр., собствени изследвания – 48 стр., състоящи се от: цел и задачи – 1 стр., материали и методи – 11 стр., резултати и обсъждане – 34 стр., изводи – 2 стр. и справка за приносите – 1 стр. Списъкът на цитираната литература обхваща 238 източника, 48 от тях са след 2010 г. Литературният обзор е илюстриран от 10 фигури и 3 таблици, а собствените изследвания - от 20 фигури и 14 таблици.

**Авторефератът** е написан съгласно изискванията, отговаря на съдържанието на дисертационния труд и отразява правилно основните резултати от изследванията.

**Забележки към автореферата.** В съкращенията е изписано  $ЦК_{50}$ , а в текста се използва  $ЦТК_{50}$ . Има някои объркани изречения, така че не става ясен смисълът им – напр. на стр. 43. Вж. и забележката към Табл. 4 в Материали и методи.

**Заклучение.** Рецензираният труд представя едно добро, макар и скромно проучване, извършено акуратно и описано много добре. В ръкописа се наблюдава съчетание на актуална тема, подходяща и проверена моделна система, адекватни методични подходи. Пролитчава, че са овладени основни вирусологични методи, както и широката литературна информираност на автора.

Д. Тодоров е водил повече от 70 часа упражнения по вирусология и е участвал в 5 проекта на лабораторията.

Разработвайки дисертацията си на тема „**Противовирусен ефект на природни продукти**”, Даниел Тодоров е реализирал успешно формулираните в нея цел и задачи. Представените в труда резултати са лична заслуга на автора и имат теоретична и практическа стойност. Дисертационният труд е достатъчен по обема и качеството на разработката, методичните подходи, получените резултати, изводи и приноси и отговаря на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

Предлагам на уважаемите членове на научното жури да оценят положително дисертационния труд на Даниел Ганчев Тодоров и да му присъдят образователната и научна степен „доктор” по научната специалност Вирусология.

5 февруари 2016 г.

Рецензент: