

Рецензия

на дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, утвърдено със заповед № РД 38-753/22.12.2015 г. на Ректора на СУ „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 **Любомира Николаева-Гломб,**
ръководител на Национална референтна лаборатория
„Ентеровируси” в Отдел „Вирусология” на НЦЗПБ, София

Тема на дисертацията

Херпесните вируси са важни човешки патогени, разпространени повсеместно и причиняващи инфекция за цял живот. Много характерна особеност на херпесвирусната инфекция е фактът, че след първичното заразяване, обикновено още в детската възраст, херпесните вируси остават в латентно състояние в определени клетки на макроорганизма и при подходящи условия може да настъпи реактивация на вируса с изява на различна по тежест клинична картина. Лечението и профилактиката на херпесната инфекция и рецидивиращото херпесно заболяване все още представляват предизвикателство, независимо че съвременната терапия вече разполага с немалък арсенал от регистрирани етиологично насочени антихерпесвирусни средства.

Активната субстанция на почти всички налични антихерпесни лекарства представлява синтетичен нуклеозиден аналог, към който херпесният вирус може да развие резистентност. И макар че засега вируси, които са резистентни към прилаганите противохерпесни средства, се изолират рядко, и то предимно при имунокомпрометирани пациенти, търсенето и разработването на инхибитори на херпесвирусната репликация е направление в експерименталната антивирусна химиотерапия, в което се работи много интензивно.

Клинично описание на херпесвирусна инфекция съществува още в *Corpus Hippocraticum*, вероятно от античността датират и някои рецепти за лечение на херпес с помощта на медицински растения. Независимо от хилядолетния опит

обаче растенията са все още недокрай проучено поле като източник на ценни лечебни съставки.

В този смисъл темата на дисертацията, изследваща ефекта на екстракти, получени по няколко различни начина от срещащото се в цяла Европа растение *Lamium album L.*, е изключително актуална. Още повече, че в светлината на глобално нарастващия интерес към природо-съобразения начин на живот и природната медицина, разкриването на потенциала на българските лечебни растения би допринесло за откриването на възможности за създаване на иновативни продукти, подпомагащи, допълващи или усилващи, а защо не и заместващи, ефекта на синтетично създадените антихерпесни медикаменти.

Забележка относно заглавието на представения дисертационен труд: Заглавието „Противовирусен ефект на природни продукти” е твърде широко и неинформативно и не позволява на читателя веднага да се ориентира кои вируси и кои лечебни растения са обект на дисертацията.

Литературна осведоменост на автора

Представеният литературен обзор разкрива много добра осведоменост и познаване в детайли на строежа и репликацията на херпесните вируси. Обърнато е необходимото внимание на съвременната терапия на херпесвирусните инфекции и на регистрираните етиологично насочени лекарствени средства. Специална част от обзора е посветена на природните продукти с антивирусен ефект. Не са пропуснати и българските автори, работещи в това направление. Много добро впечатление прави описанието на редица български лечебни растения, притежаващи антивирусна активност. В цялост е представена и наличната към момента научна информация за бялата мъртва коприва, *Lamium album L.* Видно е, че досега растението не е изследвано за евентуален антивирусен потенциал и проучванията на Даниел в тази насока са пионерни.

При изготвянето на обзора са използвани както класически литературни източници, така и съвсем нови публикации по разглежданите проблеми. Повече от 1/3 от цитираните работи, въз основа на които е изготвен обзорът, са от последните 10 години. Литературен обзор несъмнено потвърждава, че докторантът притежава задълбочени теоретични познания по специалността си.

Наличието на цялата тази информация обаче води до едно удължаване на изложението и обзорът фактически заема почти половината от дисертационния труд. Някои детайли от репликативния цикъл на херпесните вируси, описанието на структурни и неструктурни белтъци, на имунния отговор и механизмите на латентност при херпесвирусната инфекция биха могли и да не бъдат включвани в този обзор, защото не те са обектът на експерименталната част на дисертационния труд. От друга страна обаче, описанието на всички детайли

разкрива отличната осведоменост на автора по отношение на експерименталния му модел.

Целта и произтичащите от нея **задачи** на дисертационното проучване са очертани добре.

Методична страна

Използваните методи, предимно от арсенала на класическата вирусология, са напълно адекватни по отношение на търсения отговор на поставените задачи и цел. Разделът “Материали и методи” е написан достатъчно изчерпателно. Пределно ми е ясна финасовата страна на експерименталните постановки в полето на антивирусните изследвания, затова не настоявам за прилагането на суфистицирани нови методики, които в крайна сметка биха довели до същите крайни резултати и изводи.

Забележка относно методичното провеждане на едностъпния тест – смятам, че в експерименталната постановка на едностъпния тест за определяне на кинетиката на антивирусния ефект заложеният температурен режим за адсорбция на вируса трябва да бъде 4⁰С, тъй като етапът на вирусната адсорбция е единственият от всички останали етапи на вирусния репликативен цикъл, който не зависи от температурата. Провеждането на този етап при ниска температура ще гарантира протичането единствено на адсорбцията без вирусът да преминава към следващия етап на проникване в клетката-гостоприемник, който вече се осъществява само при пермисивната температура от 37⁰С.

Резултати и приноси на дисертационния труд

Поставените цел и задачи са експериментално осъществени като получените резултати са изложени достъпно с помощта на таблици и фигури.

В дисертационния труд се проучва антивирусният и вирусоцидният ефект спрямо един щам на херпес симплекс вирус 1 и два щама на херпес симплекс вирус 2 (единият от тях е ацикловир-резистентен) на получени по различен начин екстракти от растението бяла мъртва коприва, *Lamium album L.* Всеизвестният факт, че при лечебните (и не само) растения винаги са налице вариации в състава им поради вариациите в условията на средата, което води до трудност и дори невъзможност за стандартизиране на състава и активността, насочва усилията на ботаниците към търсене на начини за по-унифицирано отглеждане на ценните растения. Затова самото растение, обект на дисертационната разработка, също е култивирано по различни начини (*in vivo*, *in vitro* и *ex vitro*) като идеята е да се сравнят активностите на екстрактите и да се

направят изводи за евентуална полза или не от биотехнологично култивиране на медицинските растения с цел получаване на биологично-активни продукти.

Първа обособена част от експерименталния раздел на дисертацията представлява определянето на основните химиотерапевтични показатели *in vitro* за изследваните 13 екстракта (инхибираща концентрация 50, цитотоксична концентрация 50 и селективен индекс). Установено е, че 5 от екстрактите не притежават антихерпесвирусна активност, но 7 от тях имат, макар и скромни, ефект срещу репликацията и на трите вирусни модела. Един от екстрактите обаче, водният лиофилизиран екстракт от диворастяща бяла мъртва коприва, показва доста добър селективен индекс (>5) по отношение на репликацията на херпес симплекс вирус 1. Този екстракт е и най-слабо токсичният от всички изследвани екстракти. Антивирусната активност, макар и малко по-слаба, е налице и спрямо репликацията и на другите два изследвани вируса, а именно ацикловир-чувствителния и ацикловир резистентния щам на херпес симплекс вирус 2.

Втората група резултати са тези, получени от изследването за вирусоцидна активност на различните екстракти. Експерименталната постановка следва класическата схема за изследване на вирусоцидна активност, която е заложена и в задължителните изисквания за тестване на вирусоцидни агенти по стандарт БДС EN 14476. Наблягайки на факта, че използваната експериментална постановка е заложена и в Стандарта, бих искала да подчертая значимостта и достоверността на получените резултати по отношение на вирусоцидния ефект на проучените екстракти.

По отношение на вирусоцидния си ефект специално внимание заслужава метаноловият термостатен екстракт, получен от диворастящата коприва. При него се постига понижение на остатъчния инфекциозен вирусен титър с повече от 3 lg още на 5-тата минута на контактното време. А след 15-тата минута понижението на титъра вече надвишава 4 lg. Това е много добро постижение, защото както е известно, за да бъде призната дадена формула за вирусоциден препарат по гореспоменатия Стандарт, тя трябва да е в състояние да понижи инфекциозния вирусен титър с 4 lg. Мисля, че разкриването на вирусоцидния потенциал на този екстракт е един от основните приноси на дисертационния труд. Тук е мястото да отбележа, че екстрактът влиза в състава на билковия балсам Фитохерпан, предназначен за използване при напукани и разранени устни.

Забележка по отношение на изследването за вирусоцидна активност: смятам, че екстрактите, които не са показали антивирусна активност в предишната група опити, незаслужено са отпаднали от изследователския план за изпитване на вирусоциден ефект. Мисля, че *a priori* се е предполагала липса на

вирусоциден ефект, но това няма как да се потвърди, ако не се изпита експериментално. Личното ми мнение е, че отрицателните и невдъхновяващи резултати също заслужават споделяне с научната общност, за да се предотврати навлизането на други изследователи в задънената улица на липсващите ефекти. Както Томас Едисон е имал навика да казва при “неуспешен” експеримент, “аз не се провалих, аз просто намерих 10 000 начина, по които нещата не стават”.

Третата група резултати в дисертационния труд са тези, получени от експериментите, целящи да определят начина на антивирусно действие на подбрани екстракти. Подбрани са няколко екстракта въз основа на вирусоцидните или вирус инхибиращите им свойства. Естествено, двата най-перспективни екстракта: този, който показва селективен индекс над 5 в постановката на ЦПЕ-инхибиращия тест и този, който показва редукция с повече от 4 lg в количественото суспензионно изпитване за вирусоцидна активност, са включени в изпитанията. Това съответно са водният лиофилизиран екстракт и метаноловият термостатен екстракт като държа да се отбележи, че и двата са от диворастящата бяла мъртва коприва. Установено е, че метаноловият термостатен екстракт блокира напълно адсорбцията на вируса. Нещо повече, проведените едностъпни тестове разкриват, че екстрактът инхибира и по-нататъшни, но все още ранни етапи от репликативния цикъл на херпесния вирус. Късните етапи се повлияват в значително по-слаба степен от този екстракт. За разлика от метаноловия термостатен екстракт водният екстракт изглежда повлиява всички етапи на вътреклетъчното размножение на вируса, включително и етапите на сглобяване на зрели вириони и напускане на клетката-гостоприменик. Данните, получени в тази част на дисертацията, не само предполагат, но и доказват многофакторният и много-компонентен начин на антивирусно действие на изследваните екстракти. Тъй като тези екстракти представляват сложни смеси от различни вещества, всяко от тях с вероятен антивирусен ефект с различен механизъм на антивирусно действие, в сместа техните ефекти се припокриват и допълват, в което е и най-голямата ценност на природните продукти.

Въз основа на получените резултати са формулирани **изводите**, 6 на брой, с които съм съгласна и които в концентриран вид обобщават резултатите на дисертационния труд. Авторът е проявил излишна скромност при формулирането на изводите като не е споменал факта, че антихерпесвирусните ефекти се установяват за първи път в литературата.

Съгласна съм и с направената от автора справка за **приносите**. Изпъква установеният добър антивирусен ефект срещу репликацията на херпес симплекс

вирус 1 на водния екстракт, както и силният вирусоциден ефект на метанолния термостатен екстракт, и двата получени от довирастящото растение.

Получените експериментални данни за антивирусната активност на метаноловия термостатен екстракт от нативна бяла мъртва коприва са в основата на разработения и разрешен за употреба и вече търсен козметичен продукт “Фитохерпан”, което е най-вярната оценка за значимостта на разработката в дисертационния труд.

Публикации във връзка с дисертацията

Във връзка с разработването на дисертацията са публикувани две статии: едната е в *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, списание, което от 2010 г. е с импакт фактор, а другата е в Годишника на Университета. И в двете статии докторантът е пръв автор.

Резултати от експерименталната част на дисертацията са представяни на различни научни форуми, 2 в чужбина и 4 в нашата страна, като в 5 от представените 6 доклада докторантът е пръв автор.

Позиционирането на първо място в публикациите и участията недвусмислено показват, че приносите в дисертационния труд са **лично дело** на докторанта.

Съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Наредбата за приложението му и с критериите за придобиване на научни степени в СУ “Св. Кл. Охридски” за професионално направление “Биологични науки”

Критерий	Съответствие
Образователно-квалификационна степен “магистър”	Да – 2011 г., СУ “Св. Кл. Охридски” Специалност Молекулярна биология, магистърска програма Вирусология
Обучение в докторантура	Да – 2012-2015 г., СУ “Св. Климент Охридски”, научен ръководител: доц. Стоян Шишков
Научни и научно-приложни резултати, представляващи оригинален принос	Да
Задълбочени теоретични знания	Да
Способности за самостоятелни научни изследвания	Да
Най-малко 2 приети за печат статии	Да
Поне една от приетите статии да е в международно списание, реферирано в <i>ISI Web of Knowledge</i> или <i>SCOPUS</i>	Да <i>Bulgarian Journal of Agricultural Science</i>

Оформяне на дисертационния труд

Представеният ръкопис се състои от 128 страници и следва традиционната схема на изложение: 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 приноси – 1 стр. Списъкът на цитираната литература обхваща 238 източника. Литературният обзор е илюстриран от 12 фигури и 3 таблици, а собствените изследвания са подкрепени от 20 фигури и 14 таблици.

Оформяне на автореферата

Авторефератът е в обем 57 стр., съответства на изискванията и отразява в съкратена форма съдържанието и основните постижения на дисертацията.

Технически забележки

Общото впечатление от дисертационния труд е добро. По-долу изброявам някои технически забележки, които не би трябвало да отнемат от достойнствата на работата:

- **Използвани съкращения** – не са подредени по азбучен ред, което затруднява ползването на списъка.
- **Материали и методи** – пропуснато е да се спомене в какво се разтварят получените растителни екстракти (вероятно в *DMSO*, но не го намирам упоменато в текста).
- **Материали и методи, Табл. 4** – допусната е техническа грешка в последния ред на таблицата. Вместо “лабораторно култивирано растение” трябва да е “диворастящо растение”.
- **Резултати, фиг. 12** – цвета на кривите и символите са еднакви, което затруднява раачитането на фигурата.
- **Резултати, Определяне на IC_{50} , фиг. 14** – присъствието на точката на цитотоксичността на ацикловир е излишна.

Лични впечатления от дисертанта

Познавам Даниел Тодоров още от студентските му години в Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”. Притежава устрем и въодушеление при изпълнение на задачите, с усет към детайла.

Заклучение

Смятам, че назависимо от направените от мен забележки, представеният дисертационен труд **отговаря на изискванията** за придобиване на

образователната и научна степен „доктор”. Дисертационният труд на магистър Даниел Тодоров представлява завършено и компетентно изследване с научно-приложен принос. Авторът демонстрира задълбочени теоретични познания, наличие на практически умения и способност за обобщение и анализ на получени резултати. Смятам, че представената дисертация отговаря на изискванията на Закона. Изказвам своята положителна оценка и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “доктор” на Даниел Тодоров.

София, 5 февруари 2016 г.

Рецензент:

доц. д-р Любомира Николаева-Гломб