



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „Св. Климент Охридски”

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Лаборатория „Вирусология“



ПЕТЯ ЯВОРОВА АНГЕЛОВА

**Антихерпесен ефект на екстракти, получени
от *Artemisia chamaemelifolia* Vill.,
Sambucus nigra L., *Sambucus ebulus* L.
и *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L.“**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователната и научна степен “доктор”

Професионално направление 4.3. Биологични науки

(Вирусология)

**Научен ръководител:
Проф. д-р Стоян Шишков**

**София
2019**

Дисертационният труд е написан на 200 страници и съдържа 62 фигури, 24 таблици и едно приложение. Библиографската справка обхваща 297 литературни източника. Дисертационният труд е обсъден и приет на разширено заседание на Лабораторния съвет на Лаборатория „Вирусология“, Биологически факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд е разработен в Лаборатория „Вирусология“ на Биологически факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

Използвани съкращения:

АЦВ – Ацикловир (Acyclovirum)

ЕК₅₀ – Ефективна концентрация 50

ИК₅₀ – Инхибираща концентрация 50

МНИ – Множественост на инфекцията

МНК – Максимална нетоксична концентрация

ОП – Оптична плътност

ПФЕ – Плакоформираща единица

ТК – Тимидин киназа (Thymidine kinase)

ТКИД₅₀ – Тъканно културална инфекциозна доза 50

ЦК₅₀ – Цитотоксична концентрация 50

ЦПЕ – Цитопатичен ефект

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimethyl sulfoxide (Диметил сулфоксид)

FBS – Фетален телешки серум

HHV – Human Herpes Virus (Човешки херпесен вирус)

HIV – Human Immunodeficiency Virus (вирус на човешкия имунен дефицит)

MDBK – Madin-Darby Bovine Kidney

МТТ – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

PBS – Phosphate buffered saline (Фосфатно соли буфер)

1. Въведение.

Вирусите от семейство *Herpesviridae* заразяват бозайници, птици, влечуги, земноводни, риби и двучерупчести мекотели. Това ги прави едни от най-широко разпространените вируси в природата. Сред над 90-те представителя на семейството, видовете имащи отношение към патологията при хората са девет на брой. Предизвикват асимптомни инфекции, самоограничаващи се лезии по кожата, но и тежки генерализирани инфекции, менингити, енцефалити и злокачествени новообразувания като лимфом на Бъркит, лимфом на Ходжкин, нозофарингеален карцином, посттрансплантационна лимфолиферативна болест, саркома на Капоши, първичен ефузионен лимфом и мултицентричната болест на Касълман. Характерно за всички представители на семейството е, че са много добре адаптирани към своя гостоприемник, като едно от нещата, с което се свързва това е установяването на латентна инфекция.

Представителите на род *Simplexvirus* се откриват в над 80% от възрастното население в глобален мащаб. Хората са единственият естествен резервоар за Human alphaherpes virus тип 1 и тип 2 (HHV-1 и HHV-2). Серопревалентността при HHV тип 1 е повече от 90% сред всички нации. Първичната инфекция с него се осъществява най-често до 5-годишна възраст и обикновено е асимптоматична. Инфекцията има кожно-лигавична локализация като се засягат устната кухина, устните, очите и кожата по лицето и пръстите, като в голям брой от случаите е установено, че HHV-1 е етиологичен причинител на инфекции на половата система. Както при първичното заразяване, така и при реактивация на латентната инфекция, вирусът може да атакува централната нервна система и да доведе до развитието на енцефалити и менингити. HHV тип 1 е най-честият причинител на инфекциозна слепота в Западния свят. При лабораторни PCR-тестове е установено, че в слъзния секрет на 92% от изследваните хора се открива ДНК от HHV-1 (един път месечно), което спомага за разпространението на вируса (Томас Н. et al., 2008). HHV тип 2 е предаван по полов път патоген, който заразява повече от 500 милиона души по света и причинява около 23 милиона нови инфекции всяка година. Кожно-лигавичната локализация на инфекцията засяга половите органи и областта около тях. Рисков контингент за ново заразяване са и новородените (при преминаването им по родовите пътища), при които инфекцията може да е фатална. Както HHV-1 причинява инфекции на половите органи, така и HHV-2 може да заразява устата и лигавицата на устната кухина, като най-често това е резултат от орален секс. Освен това инфекцията с HHV-2 повишава риска от заразяване с човешкия имунодефицитен вирус (Looker K. et al., 2017). При HIV позитивните се наблюдава честа реактивация на латентния HHV, което допълнително утежнява състоянието на болния. Много често при заразените с HHV-1 и HHV-2 инфекцията протича без появата на видими симптоми. Това помага за разпространението на вирусите.

За овладяването на херпесните инфекции се използват различни медикаменти, като с най-широко приложение са нуклеозидните аналози, които предизвикват дефекти в репликацията на вирусната ДНК. Съществен проблем, свързан с въздействието на този клас медикаменти е тяхната зависимост от вирусния ензим тимидинкиназа (ТК).

Вирусни щамове с мутантна ТК или липсваща такава не се повлияват от лечението. Друг начин за повлияване на инфекциозното заболяване е чрез ваксини. Одобрените от Световната Здравна Организация (СЗО) ваксини не достигат необходимият имунизационен ефект. Сред създадените голям брой силно активни лекарствени препарати съществуват такива, които оказват множество нежелани ефекти върху организма.

Природата осигурява друг надежден източник на антивирусни агенти. Въпреки разработването на нови антивирусни препарати със синтетичен произход, един от основните източници на биологично активни молекули, с терапевтични свойства при вирусните инфекции си остават лечебните растения. Използването им в медицинската практика датира още от древността, а с помощта на съвременните методики и технологии, които с точност откриват, изолират и охарактеризират структурно биологично активните вторични метаболити, все повече се увеличават интереса към тях и получените от тях природните продукти. Растителните екстракти, в частност, са комплексна смес от биологично активни съединения. Много от тях проявяват изразен антивирусен ефект и ограничават развитието на резистентни щамове. Тази им способност е резултат от синергичното взаимодействие на различните вещества в състава им, както и на многоетапният механизъм на действие. Освен това биологично активните съединения обикновено представляват малки молекули с лекарствено-подобни свойства, което позволява те по-лесно да се абсорбират и метаболизират от организма.

2. Цел и задачи.

2.1. Цел.

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване на ефекта на екстракти, получени от растенията *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (*Asteraceae*), *Sambucus ebulus* L. (*Adoxaceae*), *Sambucus nigra* L. (*Adoxaceae*) и *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. (*Lamiaceae*), растящи в естествените им популационни ареали в България, спрямо репликацията на различни щамове на човешки алфахерпесни вируси тип 1 и тип 2 *in vitro*.

2.2. Задачи.

За изпълнение на поставената цел бяха набелязани следните задачи:

2.2.1. Определяне на преживяемостта на клетъчна линия MDBK под въздействие на изследваните екстракти.

2.2.2. Определяне на антивирусното действие на екстрактите:

2.2.2.1. Определяне на антивирусния ефект в постановка на многоциклов ЦПЕ-инхибиращ тест.

2.2.2.2. Установяване на антивирусния ефект в постановка на многоциклов тест за определяне редуцията на инфекциозния вирусен добив.

2.2.3. Определяне на вирусоцидната активност.

2.2.4. Установяване на етапа от репликативния цикъл на вирусните щамове, който се повлиява при прилагане на водния екстракт от *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L.:

2.2.4.1. Изследване на ефекта на екстракта върху етапите на адсорбция и пенетрация в клетката.

2.2.4.2. Определяне на кинетиката на антивирусния ефект на екстракта в постановка на едноциклов тест.

2.2.5. Установяване на вида на биологично активните вещества във водния екстракт от *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L.

3. Материали и методи.

3. 1. Материали.

3.1.1. Екстракти.

В настоящия дисертационен труд са изследвани общо 7 екстракта от четири нативни български растения *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (Планински пелин; сем. *Asteraceae*, събирана в района на Понор планина (Западна Стара планина) – землището на с. Брезе, Браковци, Добравица, *Sambucus ebulus* L. (Тревист бъз; сем. *Adoxaceae*) и *Sambucus nigra* L. (Дървовиден бъз; сем. *Adoxaceae*), събирани в района на планината Родопи (с. Равногор, хижа „Здравец“) и *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. (Гола коча билка; семейство *Lamiaceae*, събирана в землището на село Лозен (област София). Видът на екстрактите и растенията, от които са приготвени са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Вид на екстрактите и растенията, от които са приготвени.

| Вид на растението | Семейство | Вид на екстракта | Растителна част |
|--|-------------------|----------------------|-----------------|
| <i>Artemisia chamaemelifolia</i> Vill. | <i>Asteraceae</i> | Воден | Надземна |
| | | Хлороформен соксклет | Надземна |
| <i>Sambucus ebulus</i> L. | <i>Adoxaceae</i> | Воден | Плод |
| <i>Sambucus nigra</i> L. | <i>Adoxaceae</i> | Воден | Плод |
| | | Воден | Цвят |
| | | Воден | Листа |
| <i>Nepeta nuda</i> ssp. <i>nuda</i> L. | <i>Lamiaceae</i> | Воден | Надземна част |

Извлеките от *N. nuda* L. и *A. chamaemelifolia* Vill. са любезно предоставени от проф. В. Капчина от Катедрата по физиология на растения към Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. Извлеките от *S. ebulus* L. и *S. nigra* L. са любезно предоставени от доц. д-р Мария Крачанова от института по органична химия с център по фитохимия – БАН, Лаборатория по биологично активни вещества, Пловдив.

3.1.2. Клетъчни линии.

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

3.1.3. Хранителни среди.

Клетките са култивирани в среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), обогатена с фетален телешки серум (Sigma-Aldrich) – 8 % при растежната и 4 % при поддържащата хранителна среда, антибиотик (Gentamycin 0.008 мг/мл). рН на средата се коригира със 7% разтвор на NaHCO_3 и 1% разтвор на HCL .

3.1.4. Вирусни модели.

При проведените от нас експерименти са използвани Human Alphaherpes Virus тип 1 (HHV-1) – щам F (АЦВ-чувствителен) и Human Alphaherpes Virus тип 2 (HHV-2) – щам ВА (АЦВ-чувствителен) и щам DD (АЦВ-резистентен).

3.1.5. Работен разтвор на МТТ [(3-4,5 диметилтиазолов-2-ил)-2,5дифенилтетразолов бромид](Sigma-Aldrich).

Разтворът се приготвя като 5 мг суха субстанция МТТ се разтваря в 1 мл PBS, след което се филтрира през милипоров филтър (размер на порите 0.22 μm) и съхранява при -20°C до момента на употребата му.

3.1.6. Лизиращ разтвор за МТТ тест.

Използва се неразреден Диметил сулфоксид (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma-Aldrich).

3.1.7. Работен разтвор на фосфатно-солеви буфер (Phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.0) (Sigma-Aldrich).

Веществата влизащи в състава на фосфатно-солевия буфер са предварително таблетирани (от фирмата производител) като една таблетка се разтваря в 200 мл ddH₂O.

3.1.8. Цитратен буфер (pH 3.0).

Лимонена киселина (C₆H₈O₇) (Sigma-Aldrich) 40 mM (8.40 г), Калиев хлорид (KCl) (Sigma-Aldrich) 5 mM (0.373 г) и Натриев хлорид (NaCl) (Sigma-Aldrich) 125 mM (7.305 г) се разтварят в един литър дестилирана вода.

3.1.9. Работен разтвор на кристал виолет (Sigma-Aldrich).

Суха субстанция с тегло 1 гр се разтваря в 20 ml 96% етилив спирт, след което към така получения разтвор се добавя 80 ml дестилирана вода (ddH₂O). Крайната концентрация на кристал виолета в разтвора е 1%.

3.1.10. Дисоцииращ разтвор, използван при клетъчното култивиране.

Разтвор (10x) на трипсин-версен (Sigma-Aldrich) се довежда до работна концентрация след разреждане с ddH₂O (1:10).

3.1.11. Фиксиращ разтвор

Формалин (Sigma-Aldrich) се разрежда с PBS до получаването на 10% разтвор.

3.1.12. Ацикловир (АЦВ) (Sigma-Aldrich)

Приготвя се стоков разтвор с концентрация 1 мг/мл (10мг сухо вещество се разтваря в 1 мл DMSO и 9 мл поддържаща хранителна среда), който се съхранява в хладилна камера на -20°C .

3.1.13. Деутериран метанол (CD₃OD, чистота 99.8%) (Deutero GmbH (Кастеллаун, Германия)).

3.1.14. Деутерирана вода (D₂O, 99.9%) Deutero GmbH (Кастеллаун, Германия).

3.1.15. Деутерирана натриева сол на триметил силил пропионовата киселина (TSPA-d₄) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, САЩ)).

3.2. Методи.

В описаните по долу методики, при стъпките на темпериране и инкубиране, е използван термостат Memmert, плаките и матраците за клетъчно култивиране са на фирмата Orange Scientific, при спектрофотометричното отчитане на резултатите е използван ELISA reader Multiscan MX.

Концентрацията на екстрактите/веществото във всяко едно разреждане, след добавянето му в ямките на използваните при съответната експериментална постановка плаки, е два пъти по-ниска от предварително приготвената (в ямката вече има добавен обем еквивалентен на накапваният обем от съответното разреждане на екстрактите/веществото). При представянето на резултатите това не е взето в предвид и концентрациите съответстват на концентрациите на предварително приготвените разреждания.

3.2.1. Пасажиране на клетъчната линия.

Монослоят се промива трикратно с PBS или физиологичен разтвор. Добавя се дисоцииращ разтвор на трипсин-версен. Клетките се държат покрити с този разтвор около 3-10 минути, докато започнат да се отделят от повърхността на матрака, след което той се отлива. Добавя се малък обем растежна хранителна среда DMEM. Клетките се преброяват и се довеждат до определен обем с плътност 1.5×10^7 кл/мл, след което се разливат в матраци или плаки за клетъчно култивиране. Клетките се инкубират в термостат при температура 37°C.

3.2.2. Пасажиране на вирусните модели.

Използват се матраци за клетъчно култивиране. Клетъчният монослой се инокулира с 0.5 мл неразредена вирусна суспензия. След 1 час адсорбция на стайна температура се добавя 15 мл поддържаща хранителна среда. Матраците се инкубират при температура 37°C. Когато цитопатичният ефект обхване 90-100% от клетъчния монослой матраците се замразяват. След еднократно замразяване и размразяване, полученият вирусен сток се титрира и съхранява при температура – 80°C в хладилна камера.

Вирусният титър се определя, използвайки методите описани в точка 3.2.4.

3.2.3. Определяне преживяемостта на третирани с екстракти/вещество клетки чрез МТТ тест.

За определяне на преживяемостта на третирани с екстракт/вещество клетки бе използван колориметричният МТТ метод, описан от Mosmann (Mosmann T., 1983). Използват се 96-ямкови плаки. Надстоящата течност се отдекантира и се прибавят по 0.1 мл поддържаща хранителна среда и по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания на екстракта/веществото (в поддържаща хранителна среда). С всяко едно разреждане се накапват поне 3 ямки. В три ямки се накапва само хранителна среда без екстракт (по 0.2 мл) и те служат за клетъчна контрола. Така обработената плака се инкубира при температура 37°C в продължение на 48^{-я} и/или 72^{-я} часа. След изтичане на времето за култивиране във всяка ямка се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МТТ, след което плаката се инкубира при 37°C в продължение на 2 часа. Хранителната среда

се отстранява, след което се добавя 0.2 мл от лизиращия разтвор. Така обработената плака се отчита спектрофотометрично при 540 nm.

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

$$\text{клетъчна преживяемост (\%)} = \frac{\text{ОП на третираните клетки}}{\text{ОП на клетъчната контрола}} \times 100$$

От построената крива “доза (концентрация)-клетъчна преживяемост” се изчисляват ЦК₅₀ (концентрацията на изследваното вещество, при която 50% от клетките умират в резултат на токсичното действие на екстрактите/веществото), както и МНК (най-високата концентрация на екстракта/веществото, която не предизвиква увреждане или смърт на третираните клетки).

3.2.4. Определяне на инфекциозен вирусен титър.

3.2.4.1. Чрез метод на крайните разреждания по Reed-Muench (Reed L. & Muench H., 1938).

Използват се 96-ямкови плаки. Непосредствено преди работа се приготвят десетократни падащи разреждания на вирусната суспензия в поддържаща хранителна среда. Обемът на инокулума за една ямка е 0.1 мл. С всяко едно вирусно разреждане се заразяват по 4 ямки. В четири ямки се накапва само хранителна среда и те служат като клетъчна контрола. Вирусът адсорбира за един час при температура 37°C, след което към всяка ямка се добавя по 0.1 мл поддържаща хранителна среда. Така обработената плака се инкубира при температура 37°C. Резултатите се отчитат микроскопски на 48-ия час от инфектирането на клетките. Инфекциозният вирусен титър се представя като ТКИД₅₀/мл и се определя по наличието или липсата на вирусен цитопатичен ефект по следната формула:

$T = (\log \text{ от разреждането, при което \% заразени е над } 50\%) + (\text{фактор на пропорционалност} \times \log \text{ от фактора на разреждане})$

$\text{Фактор на пропорционалност} = \frac{[(\% \text{ заразени над } 50\%) - 50\%]}{[(\% \text{ заразени над } 50\%) - (\% \text{ заразени под } 50\%)]}$

3.2.4.2. Чрез плаковия метод на Dulbecco (Dulbecco R., 1952).

Използват се 12-ямкови плаки. Приготвят се последователни десетократни разреждания на вирусната суспензия непосредствено преди работа. Обемът на инокулума за една ямка е 0.2 мл. Заразяват се поне две ямки с всяко разреждане. В две ямки се накапва еквивалентно количество (0.2 мл) хранителна среда (без вирус) и те служат като клетъчна контрола. Вирусът адсорбира за един час при температура 37°C. По време на вирусната адсорбция се приготвя покриващата (агарова) хранителна среда по следния начин:

Разтвор А
DMEM (2x) – 48.25%
FBS – 2.5%
Gentamycin – 0.2%

Разтвор Б
dH₂O – 48.25%
Агароза – 0.8%

Разтвор Б се вари за около 20 минути на водна баня, след което се охлажда до 40 °С и към него се добавя разтвор А. След изтичане на времето за вирусната адсорбция, инокулумът от ямките и хранителната среда от клетъчната контрола се отстраняват. Всяка ямка се промива с физиологичен разтвор или хранителна среда (1 – 2 пъти), за да се отстрани неадсорбиращият вирус. Във всяка една ямка се накапва по 2 мл от агаровата хранителна среда. Така обработената плака се инкубира (при температура 37°C) 4 дена. Следва обработка с фиксиращ разтвор (1 мл/ямка) като плаките се оставят за четири часа на стайна температура. Покриващата агарова среда се отстранява и плаките се проявяват като клетките се оцветяват с 1% разтвор на кристал виолет. Плаките се преброяват с микроскоп (при ниско увеличение) или с просто око. Титърът се представя като ПФЕ/мл и се изчислява по следната формула:

$T = x / d \cdot v$, където:

x = среден брой плаки в ямките, заразени с дадено разреждане;

d = разреждане;

v = обем на инокулума;

3.2.5. Определяне на антивирусния ефект на изследваните екстракти/вещество в постановка на многоциклов ЦПЕ-инхибиращ тест, чрез модифициран МТТ тест.

Антивирусното действие на изследваните екстракти/вещество се определя чрез разработения от Mosmann МТТ тест (Mosmann, T., 1983) и модифициран от Pauwels, Takeuchi, Sudo за бърз скрининг на съединения за анти – херпесно действие (Pauwels, R. et al., 1988; Takeuchi, H. et al., 1991; Sudo, K. et al., 1994).

Използват се 96-ямкови плаки. Обемът на инокулума за ямка е 0.1 мл, при работна доза 100 ТКИД₅₀/ямка (и за двата типа херпесни вируси). В поне 3 ямки се накапва по 0.1 мл само поддържаща хранителна среда и те служат като клетъчна контрола. За целите на нашата работа бяха използвани две опитни постановки в зависимост от времето на добавяне на екстрактите/веществото – след изтичането на вирусната адсорбция (последователно) и непосредствено след заразяването на клетъчния монослой с вирус (едновременно с адсорбиращия се вирус). При първата опитна постановка вирусът адсорбира за един час при температура 37°C. И при двете опитни постановки плаката се обработва както следва:

- Контрола клетки (незаразени с вирус и нетретирани с екстракт/вещество клетки) – към ямите, определени за клетъчна контрола (поне 3), се накапват по 0.2 мл поддържаща хранителна среда.

- Контрола вирус (заразени с вирус и нетретирани с екстракт/вещество клетки) – към ямите, определени за вирусна контрола (поне три), се накапва по 0.1 мл поддържаща хранителна среда.

- Въздействани с екстракт/вещество ямки – (заразени с вирус и третирани с различни разреждания на изследвания екстракт/вещество клетки) – в останалите ямки се накапва по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания на изследвания екстракт/вещество, като с всяко разреждане се накапват поне 3 ямки.

Така обработената плака се инкубира при температура 37°C в продължение на 5 дена.

Във всяка ямка се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МГТ, след което плаката се инкубира при 37°C в продължение на 2 часа. Хранителната среда, с разтвореното в нея МГТ, след инкубацията се отстранявана, след което се добавя 0.2 мл от лизиращия разтвор. Така обработената плака се отчита спектрофотометрично при 540 nm.

Активността на екстракта/веществото се изразява като протекция (%) и се определя по следната формула:

$$\frac{[ОП_V - ОП_{КВ}]}{[ОП_{Ккл.} - ОП_{КВ}]} \times 100 (\%), \text{ където:}$$

ОП_V – абсорбция на заразените и третирани с екстракт/вещество клетки

ОП_{КВ} – абсорбция на заразените с вирус клетки (вирусна контрола без екстракт/вещество)

ОП_{Ккл.} – абсорбция на незаразени и не третирани с екстракт/вещество клетки (клетъчна контрола).

ЕК₅₀ (концентрацията на изследвания екстракт/вещество, при която се отчита 50% преживяемост на заразени с вирус и третирани с екстракти/вещество клетки) се определя директно от кривата “доза–отговор”.

3.2.6. Определяне на антивирусния ефект в постановка на многоциклов тест за редукция на вирусния добив (Souza T. et al., 2008).

Използват се 24-ямкови плаки. Обемът на инокулума за ямка е 0.1 мл, при работна доза 33x10⁴ ПФЕ/ямка или множественост на инфекцията (МНИ) 0.5 ПФЕ/клетка (и за двата типа херпесни вируси). В две ямки се накапва по 0.1 мл само поддържаща хранителна среда и служат като клетъчна контрола. За целите на нашата работа бяха използвани две опитни постановки в зависимост от времето на добавяне на екстрактите/веществото – след изтичането на вирусната адсорбция (последователно) и непосредствено след заразяването на клетъчния монослой с вирус (едновременно с адсорбиращия вирус).

При първата опитна постановка вирусът адсорбира за един час при температура 37°C.

При втората опитна постановка в ямките, определени да бъдат въздействани с екстракт/вещество, се накапва по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания, като с всяко разреждане се накапват поне 2 ямки. Във вирусната и клетъчната контроли се добавя по още 0.1 мл поддържаща хранителна среда. Така плаката се поставя един час при температура 37°C. След изтичането на времето за вирусна адсорбция и при двете опитни постановки, плаката се обработва по един и същи начин. Съдържанието на ямките се отстранява. Всяка ямка се промива с PBS, рН 7.0 (1 – 2 пъти), за да се отстрани неадсорбиралият вирус. Във всяка една ямка се накапва по 0.5 мл поддържаща хранителна среда. В ямките, въздействани с екстракт/вещество, се накапва по 0.5 мл от предварително приготвените разреждания на изследвания екстракт/вещество, като с всяко се накапват поне 2 ямки. Във вирусната (две ямки) и клетъчната контроли (две ямки) се добавя по още 0.5 мл поддържаща хранителна среда.

Така обработената плака се инкубира при температура 37°C за 24 часа (цитопатичният ефект е обхванал всички клетки във вирусните контроли). След изтичането на времето за инкубация плаката се замразява. След еднократно замразяване и размръзване определянето на инфекциозния вирусен титър в заразените и третирани с екстракт/вещество ямки и във вирусната контрола става чрез плаковия метод на Dulbecco (Dulbecco R., 1952).

За активността на екстракта/веществото се съди по степента на редукцията на инфекциозното вирусно потомство в заразените и третирани ямки. Изразява се като % инхибиция (от вирусната контрола) на инфекциозния вирусен титър и се определя по следната формула:

инхибиция (%) = $[1 - (A/B)] \times 100$, където:

A – инфкциозен вирусен титър (ПФЕ/мл) в заразената и третирана с екстракт/вещество ямка;

B – инфкциозен вирусен титър (ПФЕ/мл) във вирусната контрола;

ИК₅₀ (концентрацията на изследвания екстракт/вещество, при която се отчита 50% инхибиране на продукцията на инфекциозно вирусно потомство) се определя директно от кривата “доза–отговор”.

3.2.7. Вирусоцидно въздействие.

Въздействието върху извънклетъчните вириони се определя чрез директен контактен метод. Равни обеми неразредена вирусна суспензия и поддържаща хранителна среда с екстракт/вещество, в МНК, при контрола от равни обеми неразредена вирусна суспензия и поддържаща хранителна среда (без екстракт/вещество), се инкубират на 37°C за 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 и 360 минути. В края на всеки времеви интервал пробите и контролите се замразяват и се определят титрите им по метода на крайните разреждания и се изчисляват по Рийд и Менч (Reed L. & Muench H., 1938).

3.2.8. Тест, определящ въздействието на изследвания екстракт/вещество върху адсорбцията на вируса върху клетъчната мембрана.

За определяне въздействието на екстракта/веществото върху етапа на адсорбция е използван метода на De Logu (De Logu A. et al., 2000) с малки изменения. Използват се 12-ямкови плаки. Предварително приготвените разреждания на екстракта/веществото, вирусната суспензия, 12-ямковите плаки с клетъчния монослой, поддържащата хранителна среда и разтворът на PBS се инкубират за 1 час на 4°C. След изтичане на времето хранителната среда от 12-ямковите плаки се изтегля. Следва заразяване на клетъчния монослой. Обемът на инокулума е 0.2 мл, при работна доза ~ 12 x 10² ПФЕ/ямка или МНИ 0.0004 ПФЕ/клетка (и за двата типа херпесни вируси). В ямките, въздействани с екстракта/веществото, се накапва по 0.2 мл от предварително приготвените разреждания на изследвания екстракт/вещество, като с всяко разреждане се накапват поне две ямки. В ямките, служещи за вирусна контрола (две), се накапва по 0.2 мл поддържаща хранителна среда. В две ямки не се добавя вирус, а се накапва 0.4 мл поддържаща хранителна среда (клетъчна контрола). Така обработени, плаките се поставят при температура от 4°C. След 2 часа плаките се изваждат от хладилника и въздействаните и невъздействаните ямки се промиват двукратно с PBS (pH 7.0), след което във всяка една ямка се накапва по 2 мл от предварително приготвената покриващата (агарова) хранителна среда (виж точка 3.2.4.2). Плаките се поставят при температура 37°C за 4 дена. След изтичане на този времеви интервал клетките се оцветяват и фиксират, както е описано в плакоформирация метод на Dulbecco (Dulbecco R., 1952).

За въздействието на екстракта/веществото върху вирусната адсорбция се съди по броя на формираните плаки в заразените и третирани ямки, спрямо броят на плаките в контролните (нетретирани) ямки. Изразява се като % инхибиция (от вирусната контрола) на формираните плаки и се определя по следната формула:

инхибиция (%) = $[1 - (A/B)] \times 100$, където:

A – брой плаки в заразената и третирана с екстракт/вещество ямка;

B – брой плаки във вирусната контрола;

3.2.9. Тест, определящ въздействието на изследвания екстракт/вещество върху кинетиката на вирусната адсорбция (De Logu A. et al., 2000).

Използват се 12-ямкови плаки. Екстрактът/веществото в МНК, 12-ямковите плаки с клетъчния монослой, поддържащата хранителна среда, вирусната суспензия и разтворът на PBS се инкубират за 1 час на 4°C. След изтичане на времето хранителната среда от 12-ямковите плаки се изтегля. Следва заразяване на клетъчния монослой. Обемът на инокулума за ямка е 0.2 мл, при работна доза ~ 12 x 10² ПФЕ/ямка или МНИ 0.0004 ПФЕ/клетка (и за двата типа херпесни вируси). В две ямки, служещи за клетъчна контрола, се добавя 0.4 мл поддържаща хранителна среда. В част от ямките се накапва еквивалентен обем от екстракта (в МНК), а в останалите (контролните ямки) еквивалентен обем поддържаща хранителна среда (вирусна контрола). Така обработени, плаките се поставят при температура от 4°C. На определен времеви

интервал 15, 30, 60, 90 и 120 минута, плаката се изважда и въздействаните и невъздействаните ямки се промиват двукратно с PBS (pH 7.0) (по две ямки за времеви интервал, за въздействия и контролния вирус) и се добавя по 1 мл поддържаща хранителна среда, и се връща отново при температура от 4°C. След изтичането на последния времеви интервал поддържащата хранителна среда в ямките от плаката се отстранява и те се обработват според плаковия метод на Dulbecco (Dulbecco R., 1952).

За въздействието на екстракта върху вирусната адсорбция се съди по броя на формираните плаки в заразените и третирани ямки спрямо броя на плаките в контролните (нетретирани) ямки. Изразява се като % инхибиция (от вирусната контрола) на формираните плаки и се определя по следната формула:

инхибиция (%) = $[1 - (A/B)] \times 100$, където:

A – брой плаки в заразената и третирана с екстракт/вещество ямка;

B – брой плаки във вирусната контрола;

3.2.10. Тест, определящ въздействието на изследвания екстракт/вещество върху пенетрацията на вируса в клетката.

За определяне въздействието на екстракта/веществото върху пенетрацията на вируса е използван метода на Cheng (Cheng, H. Y., et al., 2002). Използват се 12-ямкови плаки. Екстрактът/веществото (в МНК), 12-ямковите плаки с клетъчния монослой, вирусната суспензия и поддържащата хранителна среда се инкубират за 1 час на 4°C. След изтичане на времето хранителната среда от 12-ямковите плаки се изтегля. Следва заразяване на клетъчния монослой. Обемът на инокулума за ямка е 0.3 мл, при работна доза $\sim 18 \times 10^2$ ПФЕ/ямка или МНИ ~ 0.0006 ПФЕ/клетка (и за двата типа херпесни вируси). В две ямки не се добавя вирус, а се накапва 0.3 мл поддържаща хранителна среда (клетъчна контрола). Така обработени плаките се поставят при температура от 4°C за 2 часа. След изтичане на втория час, в част от ямките се накапва 0.3 мл от екстракта/веществото (в МНК), а в останалите 0.3 мл поддържаща хранителна среда (вирусна контрола). В ямките определени за клетъчна контрола се накапва по 0.3 мл поддържаща хранителна среда. Така обработени се поставят в термостат при температура 37°C. На определен времеви интервал 15, 30, 60, 90 и 120 минута, плаката се изважда и въздействаните и невъздействаните ямките (по две ямки за времеви интервал), както и клетъчните контроли се промиват двукратно с PBS (pH 7.0), третират се с цитратен буфер (pH 3.0) за една минута, след което се промиват еднократно с PBS (pH 7.0) и се добавя по 1 мл поддържаща хранителна среда. Плаката се връща отново при температура 37°C. След изтичането на последния времеви интервал поддържащата хранителна среда в ямките от плаката се отстранява и те се обработват според плаковия метод на Dulbecco (Dulbecco R., 1952).

За въздействието на екстракта/веществото върху вирусната пенетрация се съди по броя на формираните плаки в заразените и третирани ямки спрямо броят на плаките в контролните (нетретирани) ямки. Изразява се като % инхибиция (от вирусната контрола) на формираните плаки и се определя по следната формула:

инхибиция (%) = $[1 - (A/B)] \times 100$, където:

A – брой плаки в заразената и третирана с екстракт/вещество ямка;

B – брой плаки във вирусната контрола;

3.2.11. Определяне на кинетиката на антивирусния ефект в постановка на едноциклов тест.

Влиянието на екстракта/веществото върху различни етапи от вирусния репликативен цикъл е определено, използвайки метода на Cheng (Cheng, H. Y., et al., 2002), с малки изменения. Работи се на 24-ямкови плаки. Следва заразяване на клетъчният монослой. Обемът на инокулума за ямка е 0.3 мл, при работна доза 53×10^5 ПФЕ/ямка или МНИ ~ 8 ПФЕ/клетка (и за двата типа херпесни вируси). В ямките (по две ямки за времеви интервал), определени за 0 и 0' времеви интервали, едновременно с вирусната инокулация се добавя и еквивалентно количество (0.3 мл/ямка) от предварително приготвените разреждания на екстракта/веществото (в МНК). В други две ямки се добавя 0.3 мл поддържаща хранителна среда, като те се явяват вирусната контрола на 0 и 0' времеви интервали. Така обработени, плаките се поставят при температура 37°C за 1 час. След изтичане времето за инкубация съдържанието на всички ямки се изтегля и те се промиват с PBS, рН 7.0, за да се отстрани неадсорбиран вирус. Във всички ямки се добавя по 0.3 мл поддържаща хранителна среда, с изключение на ямките отговарящи за 0' времеви интервал и вирусната контрола (на 0 и 0' времеви интервали) – в тях се добавя 0.6 мл поддържаща хранителна среда. В ямките отговарящи за 0 времеви интервал се добавя 0.3 мл от екстракта/веществото (в МНК). На различни времеви интервали – 1 час, 2 час, 3 час, 4 час, 5 час, 6 час, 8 час, 10 час, 12 час и 14 час се добавя по 0.3 мл от екстракта/веществото (по две ямки за всеки времеви интервал). На 16-ия час след заразяване на монослоя и инкубация на плаките при 37°C, клетките се лизират чрез еднократно замразяване-размразяване. Вирусният титър се определя чрез плаковия метод на Dulbecco (Dulbecco R., 1952). Инхибиране (%) производството на вирусно потомство се пресмята по следната формула:

инхибиция (%) = $[1 - (A/B)] \times 100$, където:

A – брой плаки в заразената и третирана с екстракт/вещество ямка;

B – брой плаки във вирусната контрола

3.2.12. ЯМР – базирана метаболомика.

ЯМР анализът следва процедурата описана от Georgiev (Georgiev M., et al., 2015) и е извършен от групата на доц. д-р М. Георгиев от лаборатория „Приложни биотехнологии“, Институт по микробиология „Стефан Агелов“ БАН, Пловдив. В епендорфки с обем 2 мл съдържащи ~ 50 мг лиофилизиран екстракт се добавят 0.75 мл CD_3OD и 0.75 мл D_2O , буферирана с KH_2PO_4 (рН=6), съдържащ TSPA-d4 (0.005 % w/v крайна концентрация) като вътрешен стандарт. Пробите се хомогенизират на стайна температура чрез разбъркване на вортекс за 1 минута, последвано от обработка с

ултразвук за 20 минути (35 kHz; UCI-50 Каура® R. Espinar S.L., Barcelona, Spain) и центрофугиране (12 000 rpm, при 4°C) за 20 минути. Следва прехвърляне на 0.8 мл от супернатантата в 5 мм ЯМР кювети.

ЯМР анализът се провежда на AVII+600 спектрометър (Bruker, Karlsruhe, Germany) при работна честота 600.13 MHz. 1H NMR и 2D ЯМР спектрите се записват при 25°C с време на релаксация 4.07 секунди.

4. Резултати.

Резултатите от проведените експерименти са представени по-долу последователно за всяко от изследваните растения.

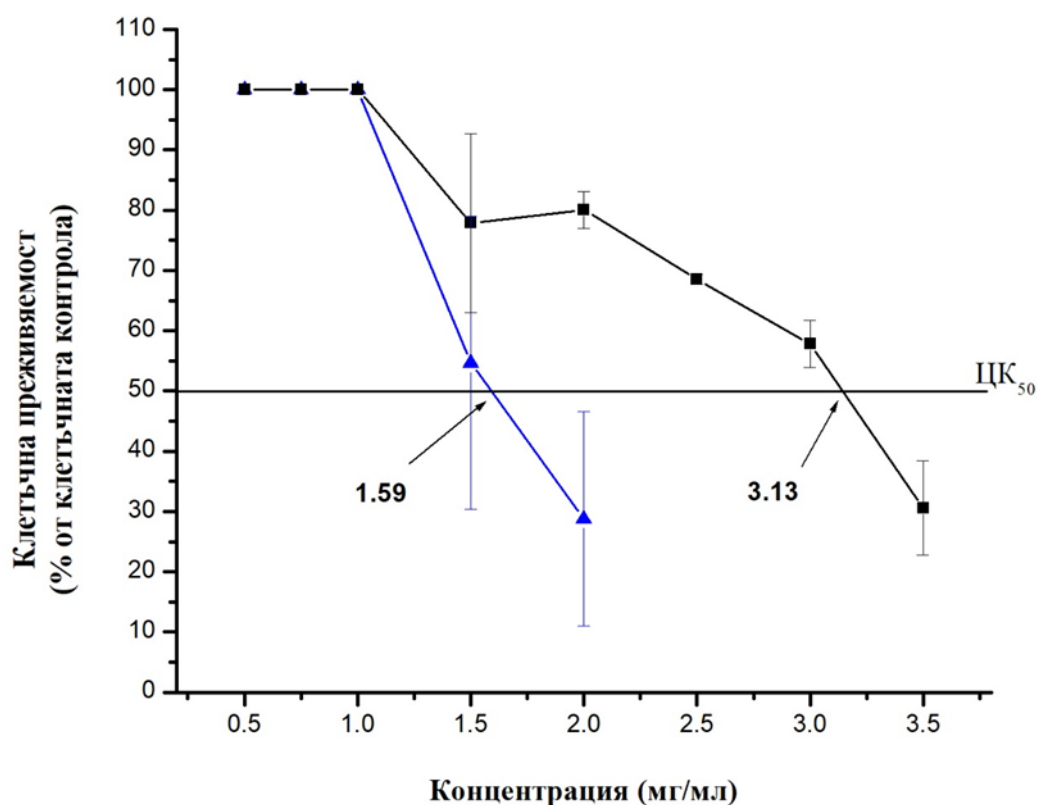
4.1. *Artemisia chamaemelifolia* Vill.

4.1.1. Определяне на преживяемостта на използваната клетъчна линия, под въздействие на воден и хлороформен соксклет екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill., чрез МТТ тест.

Първоначално беше определена токсичността, на 72^{-я} час, на всеки от използваните екстракти.

В използваната експериментална постановка бяха прилагани концентрации в граници от 0.5 мг/мл до 3.5 мг/мл.

Получените стойности за всеки екстрактите са представени в табл. 2 и са изобразени графично на фиг. 1.



Фигура 1. Преживяемост на клетки MDBK, определена на 72^{-я} час, въздействана с воден (—■—) и хлороформен соксклет (—▲—) екстракти от *A. chamaemelifolia* Vill.

Таблица 2. Токсичност на екстракти от *A. chamaemelifolia* Vill. определена на 72^{-я} час

| Екстракт | МНК (мг/мл) | ЦК ₅₀ (мг/мл) |
|----------------------|-------------|--------------------------|
| Воден | 1 | 3.13 |
| Хлороформен Соксклет | 1 | 1.59 |

От експериментално установените резултати се вижда, че стойността за ЦК₅₀ на водния екстракт е приблизително два пъти по-висока от тази на хлорофорения соксклет екстракт на *A. chamaemelifolia* Vill. Това прави хлороформения соксклет екстракт по-токсичен.

4.1.2. Вирусцидно въздействие на екстракти от *A. chamaemelifolia* Vill.

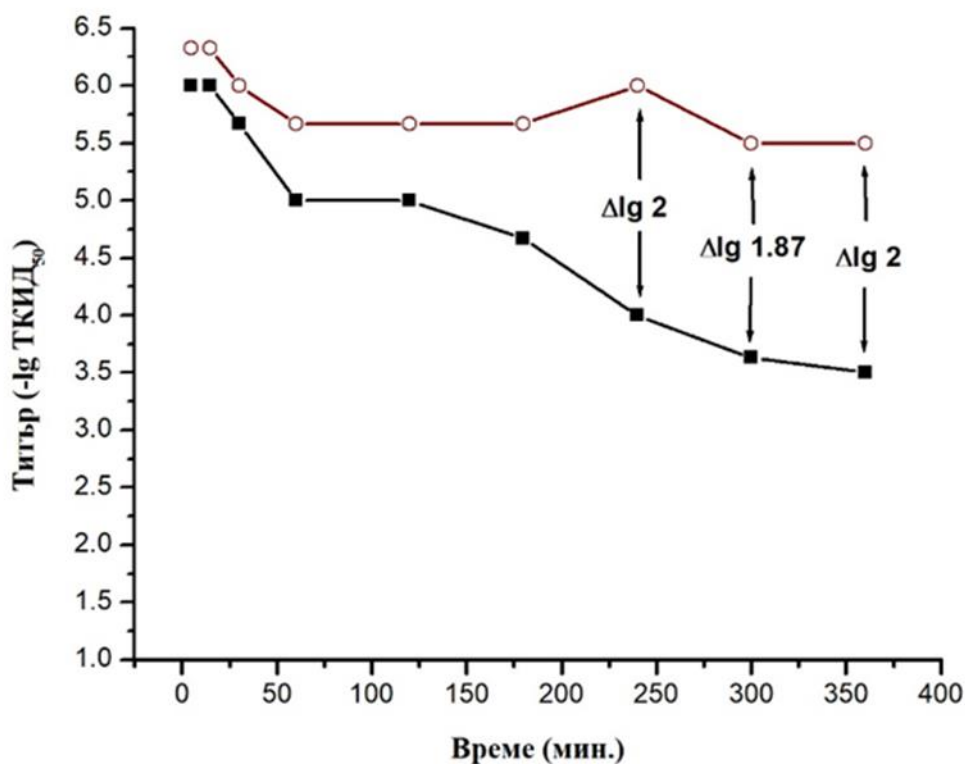
Екстрактите бяха приложени в концентрация, отговаряща на тяхната МНК.

4.1.2.1. Вирусцидна активност на воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

Бе отчетена слаба инактивация на вируса, още на 5^{-та} минута от началото на контакта. Едва на 180^{-та} минута от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига 1 lg, като на 240^{-та} минута тази разликата се увеличава на 2 lg и остава такава през следващите интервали от време (фиг. 2, таблица 3).

Таблица 3. Вирусцидна активност на воден екстракт от *A. chamaemelifoli* Vill., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

| Интервали (минути) | Вирусен титър на контролата | Вирусен титър на пробата | Разлика в титрите ($\Delta \log$) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 5 | 6.33 | 6.00 | 0.33 |
| 15 | 6.33 | 6.00 | 0.33 |
| 30 | 6.00 | 5.67 | 0.33 |
| 60 | 5.67 | 5.00 | 0.67 |
| 120 | 5.67 | 5.00 | 0.67 |
| 180 | 5.67 | 4.67 | 1.00 |
| 240 | 6.00 | 4.00 | 2.00 |
| 300 | 5.50 | 3.63 | 1.87 |
| 360 | 5.50 | 3.50 | 2.00 |



Фигура 2. Вирусцидна активност на воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. (—■—), спрямо неразреден вирус HHV-1, щам F (—○—).

4.1.2.2. Вирусцидна активност на хлороформен соксклет екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill., спрямо неразреден вирус HHV-1, щам F.

Хлорофоменият соксклет екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. не проявява вирусцидна активност към извънклетъчните вириони на човешки алфахерпесен вирус тип 1, щам F.

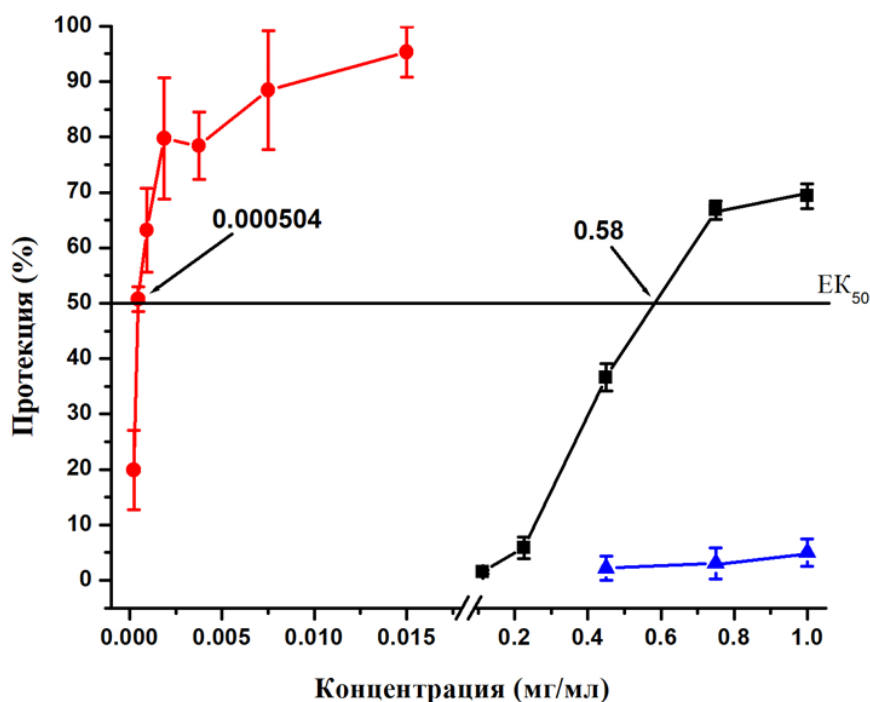
4.1.3. Изследване на ефекта на екстракти от *A. chamaemelifolia* Vill. върху репликацията на HHV-1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD).

4.1.3.1. Определяне на антивирусния ефект на воден и хлороформен соксклет екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. върху репликацията на HHV-1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD) в постановка на многоциклов ЦПЕ-инхибиращ тест, чрез модифициран МТТ тест.

При работата с първия тип на човешкия алфахерпесен вирус бяха използвани две опитни постановки в зависимост от времето на добавяне на екстрактите – след изтичането на вирусната адсорбция (последователно) и непосредствено след заразяването на клетъчния монослой с вирус (едновременно). При втората опитна постановка беше използван само водният екстракт на *A. chamaemelifolia* Vill., тъй като при последователно приложение само той показва активност, както и въздействие върху извънклетъчните вириони. При работата с HHV-2, щамове BA и DD беше използвана само първата опитна постановка.

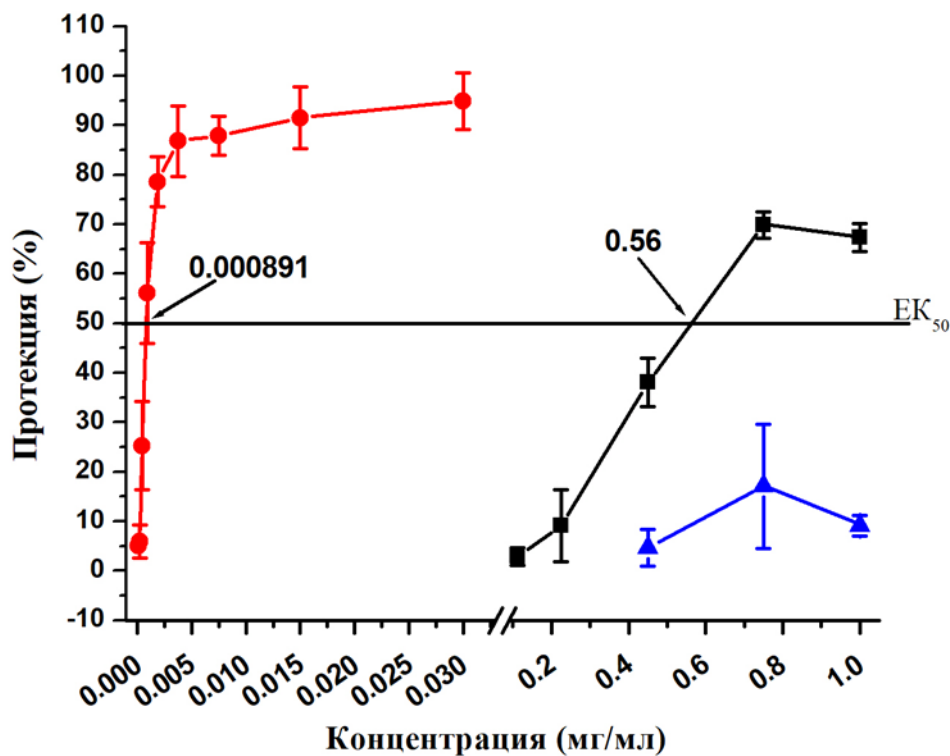
4.1.3.1.1. Определяне на антивирусното действие на воден и хлороформен соксклет екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. върху репликацията на HHV-1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD), при последователно добавяне на извлеките.

Получените експериментални данни са представени на таблица 4 и фигури 3, 4 и 5, за съответните вирусни щамове.

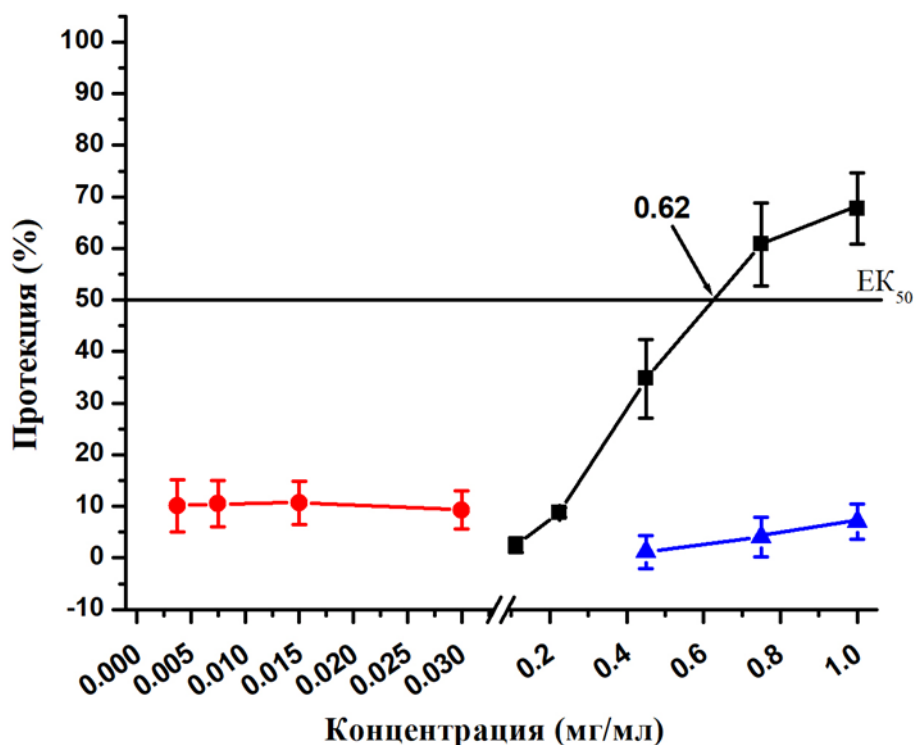


Фигура 3. Въздействие на последователно приложени воден екстракт (—■—), хлороформен соксклет екстракт (—▲—) от *A. chamaemelifolia* Vill. и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-1 (F).

Резултатите показват, че при последователно приложение, водният екстракт проявява силен протективен ефект спрямо HHV-1 (F) (фиг. 3; табл. 4). Приложен в МНК достига 69.32% протекция, за разлика от хлороформения соксклет екстракт, който приложен в МНК достига 5.02% протекция. И при двата екстракта се наблюдава дозозависимо намаляване на клетъчната преживяемост в различна степен. Въпреки високия процент протекция, който осигурява водният екстракт, той е много по-слабо активен от АЦВ.



Фигура 4. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (BA) на последователно приложен воден екстракт (—■—), хлороформен соксклет екстракт (—▲—) от *A. chamaemelifolia* Vill. и АЦВ (—●—).



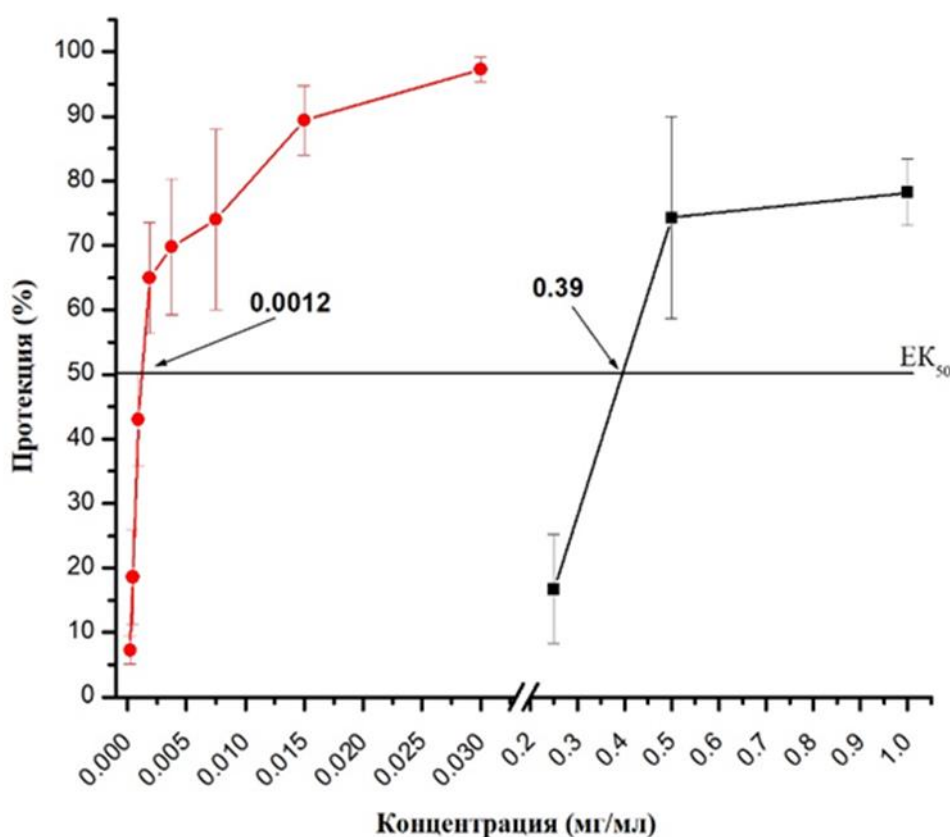
Фигура 5. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (DD) на последователно приложен воден екстракт (—■—), хлороформен соксклет екстракт (—▲—) от *A. chamaemelifolia* Vill. и АЦВ (—●—).

От експериментално получените резултати се вижда, че както при първия тип на човешки алфахерпесен вирус, така и при двата използвани щама на втори тип на алфахерпесния вирус водният екстракт на *A. chamaemelifolia* Vill. приложен последователно проявява ясно изразен протективен ефект, за разлика от хлороформения соксклет екстракт, който проявява много слаба активност. В МНК водният екстракт достига 67.38% и 67.72% протекция, спрямо щам ВА и щам DD, съответно. Хлороформеният соксклет екстракт проявява много по-слаба антивирусна активност, като в МНК показва 9.13% и 7.03% протекция спрямо щам ВА и щам DD, съответно.

Получените резултати показват, че активността на водния екстракт спрямо щам ВА ($EK_{50} = 0,56$ мг/мл) е много по-ниска от тази на ацикловира ($EK_{50} = 0.000887$ мг/мл). По отношение на щам DD, спрямо който нуклеозидният аналог е много слабо активен, водният екстракт осигурява 67.72% протекция ($EK_{50} = 0.62$ мг/мл), стойност с 50% по-висока от тази която осигурява АЦВ.

4.1.3.1.2. Определяне на антивирусното действие на воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. върху репликацията на ННV-1 (F), при едновременно добавяне на извлекa.

Резултатите от експеримента са онагледени графично (фиг. 6) и представени таблично (табл. 4) по-долу.



Фигура 6. Въздействие на едновременно приложени воден екстракт (—■—) от *A. chamaemelifolia* Vill. и АЦВ (—●—) върху репликацията на ННV-1 (F).

Таблица 4. Антивирусна активност на воден и хлороформен соксклет екстракти от *A. chamaemelifolia* Vill. и АЦВ върху репликацията на ННV-1 (F) при едновременно и върху репликацията на ННV-1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD) при последователно добавяне.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|------|
| | Едновременно | | Последователно | | | | | |
| | ННV-1 (F) | | ННV-1 (F) | | ННV-2 (BA) | | ННV-2 (DD) | |
| | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Воден | 0.39 | 8.02 | 0.58 | 5.39 | 0.56 | 5.58 | 0.62 | 5.04 |
| Хлороформен Соксклет | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| Ацикловир | 0.0012 | 181.66 | 0.000504 | 432.53 | 0.000891 | 244.66 | н.д. | н.д. |

н.д.-няма данни

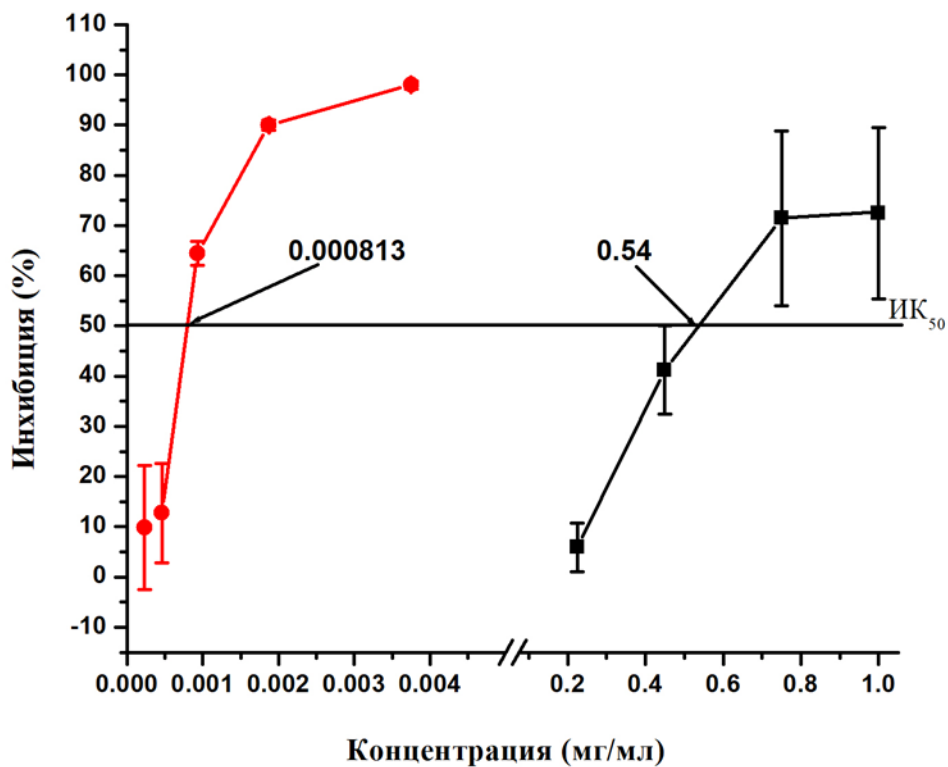
Представените данни показват, че при едновременно приложение водният екстракт проявява силен протективен ефект спрямо ННV-1 (F) (в МНК осигурява 78.25% протекция). При сравняването на стойностите за ЕК₅₀ получени при двете опитни постановки се вижда (0.58 мг/мл при последователното и 0.39 мг/мл при едновременното), че при едновременно добавяне се отчита почти два пъти по-висока активност.

При теста за въздействието на екстракта върху извънклетъчните вириони, разликата в стойностите за титъра на третирания и контролния вирус за отделните времеви интервали, е приблизително сходна (като по-значително вирусцидно действие се наблюдава след 180^{-та} минута). В постановката на едновременно добавяне, активността на водния екстракт е почти два пъти по-висока. От изложените по-горе резултати може да се предположи, че водният екстракт въздейства на ранните етапи на вирусната репликация, като това не е свързано с инактивиране на извънклетъчния вирус.

4.1.3.2. Определяне на антивирусния ефект на воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. в постановка на многоциклов тест за редуция на вирусния добив на ННV-1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD), при последователно добавяне на извлека.

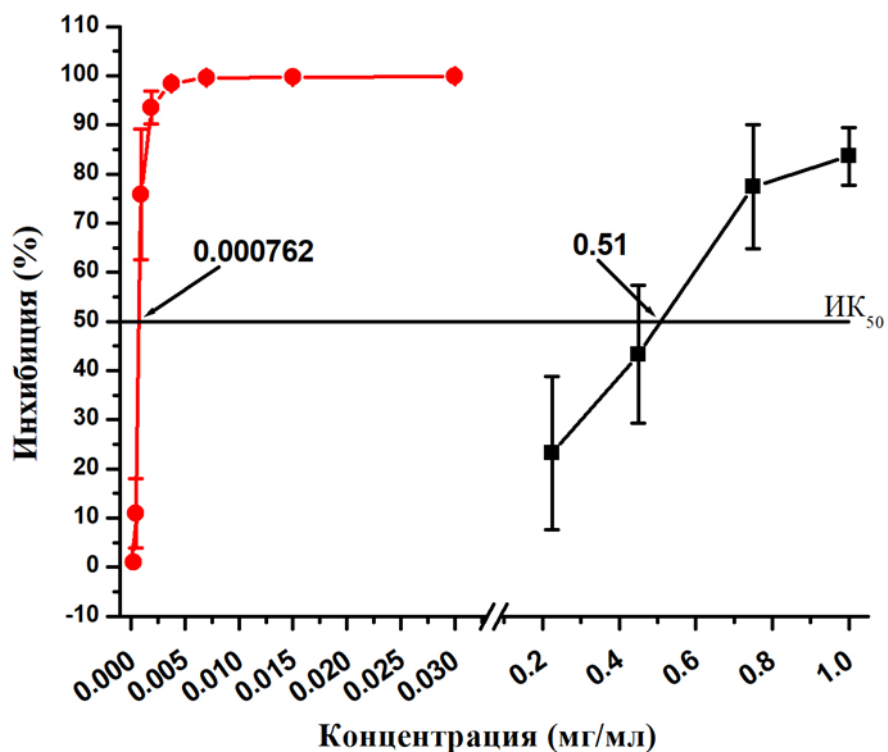
Спорд резултатите, получени чрез многоцикловия ЦПЕ-инхибиращ тест, само водният екстракт проявява въздействие върху вирусния репликативен цикъл (хлороформеният соксклет екстракт не показва антивирусна активност). Поради това само водният екстракт беше изследван за ефект върху репликацията на ННV-1 и ННV-2 чрез многоциклов тест за редуция на вирусния добив.

Получените експериментални данни са представени таблично и онагледени чрез графики по-долу (за ННV-1 (F) табл. 5 и фиг. 7; за ННV-2 (BA) табл. 5 фиг. 8 и ННV-2 (DD) табл. 5 и фиг. 9).

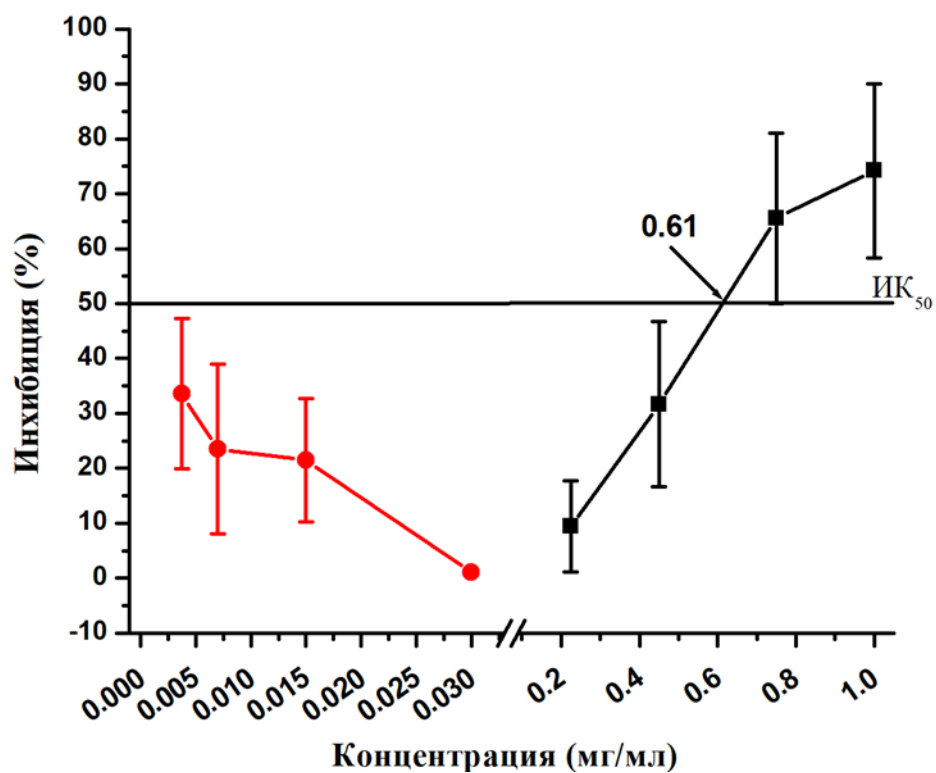


Фигура 7. Въздействие на последователно приложен воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-1 (F).

Титърът на инфекциозния вирусен добив намалява, когато клетките са третирани с водния екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. Спрямо HHV-1, щам F екстрактът инхибира с 72.42% (ИК₅₀ = 0.54 мг/мл) производството на инфекциозното вирусно потомство (фиг. 7, табл. 5).



Фигура 8. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (BA) на последователно приложен воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. (—■—) и АЦВ (—●—).



Фигура 9. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (DD) на последователно приложен воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. (—■—) и АЦВ (—●—).

Таблица 5. Антивирусна активност на воден екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. и АЦВ върху репликацията на ННВ-1, щам F и ННВ-2, щам ВА и щам DD при последователно добавяне.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | |
|-----------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|-------|
| | ННВ-1 (F) | | ННВ-2 (ВА) | | ННВ-2 (DD) | |
| | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Воден | 0.54 | 5.80 | 0.51 | 6.13 | 0.61 | 5.13 |
| Ацикловир | 0.000813 | 268.14 | 0.000762 | 286.08 | н.д. | н. д. |

н.д.-няма данни

Графично и таблично представените данни показват, че екстрактът проявява активност, спрямо щам Ва и DD на човешки алфахерпесен вирус тип 2, като намалява количеството на инфекциозните дъщерни вириони. Стойностите за инхибицията на продукцията на инфекциозното вирусно потомство в МНК достигат 83.62% (ИК₅₀ = 0.51 мг/мл) и 74.17% (ИК₅₀ = 0.61 мг/мл), съответно (фиг. 8 и 9; таблица 5).

Получените резултати показват, че при тази опитна постановка екстрактът понижава продукцията на дъщерни вириони след заразяване на клетъчната линия с всеки един от трите използвани вирусни щамове. Това корелира с установените нива на протекция при МТТ-теста. И при трите използвани вирусни щамове, отчетените стойности за инхибицията (%) в МНК и ИК₅₀ не се различават съществено, което показва че екстрактът не проявява избирателно действие по отношение на даден щам.

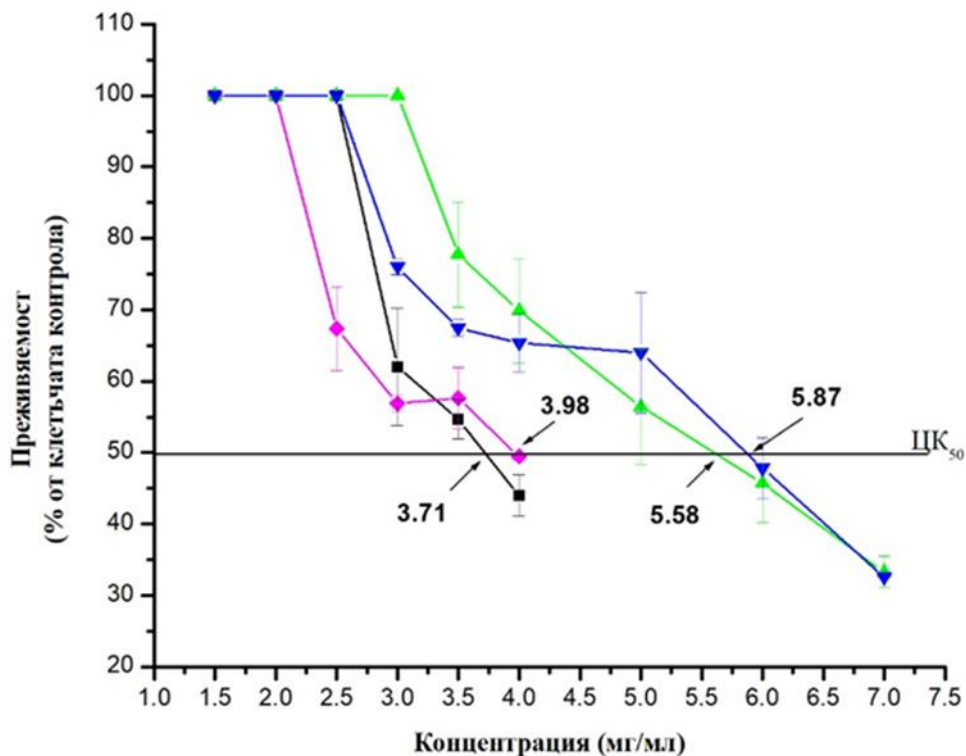
Водният екстракт от *A. chamaemelifolia* Vill. (ИК₅₀ = 0.54 мг/мл за ННВ-1, щам F и ИК₅₀ = 0.51 мг/мл за ННВ-2 ВА, съответно) има по-слабо антихерпесно действие от АЦВ (ИК₅₀ = 0.000813 мг/мл за ННВ-1, щам F и ИК₅₀ = 0.000762 мг/мл и ННВ-2 ВА, съответно), но за разлика от него водният извлек въздейства върху щам DD (ИК₅₀ = 0.61 мг/мл), който се характеризира с кръстосана резистентност към АЦВ и Пенцикловир. Отчетеното дозозависимо намаляване на активността е характерно и за трите щамове.

4.2. Растения от род *Sambucus* (*S. ebulus* L. и *S. nigra* L.)

4.2.1. Определяне на преживяемостта на използваната клетъчна линия под въздействие на екстракти от плод на *S. ebulus* L. и екстракти от листа, плод, и цвят на *S. nigra* L., чрез МТТ тест.

В използваната експериментална постановка бяха тествани концентрации в граници от 1.5 мг/мл до 4 мг/мл за екстракта от плод на *S. ebulus* L. и от 1.5 мг/мл до 7 мг/мл за извлеките от плод, листа и цвят на *S. nigra* L.

Получените стойности за всеки екстракт са определени на 72-я час и са представени в табл.6 и са изобразени графично на фиг. 10.



Фигура 10. Преживяемост, определена на 72^{-я} час, на MDBK клетки въздействани с екстракт от плод (—■—) на *S. ebulus* L.; екстракт от листа (—▲—), с екстракт от плод (—◆—) и екстракт от цвят (—▼—) на *S. nigra* L..

Таблица 6. Токсичност на екстрактите от *S. ebulus* L. и *S. nigra* L.

| Екстракт | МНК (мг/мл) | ЦК ₅₀ (мг/мл) |
|------------------------|-------------|--------------------------|
| Плод (Тревист бъз) | 2.5 | 3.71 |
| Листа (Дървовиден бъз) | 3 | 5.58 |
| Плод (Дървовиден бъз) | 2 | 3.98 |
| Цвят (Дървовиден бъз) | 2.5 | 5.87 |

От таблично и графично представените данни (фиг. 10; табл. 6) се вижда, че екстрактите получени от плодове на двата вида растения (от род *Sambucus*) имат близки стойности на ЦК₅₀ и са малко по-ниски от съответните стойности за екстрактите от листа и цвят. От четирите екстракта относително по-силно токсичен е екстрактът от плод от тревист бъз, а най-слабо токсичен е този от цветът от Дървовиден бъз.

Ако сравним екстрактите по ЦК₅₀ получената йерархична редица би изглеждала по следния начин (от по – висока към по – ниска токсичност):

Плод (Тревист бъз) → Плод (Дървовиден бъз) → Листа (Дървовиден бъз) → Цвят (Дървовиден бъз)

4.2.2. Вирусцидно въздействие на екстрактите.

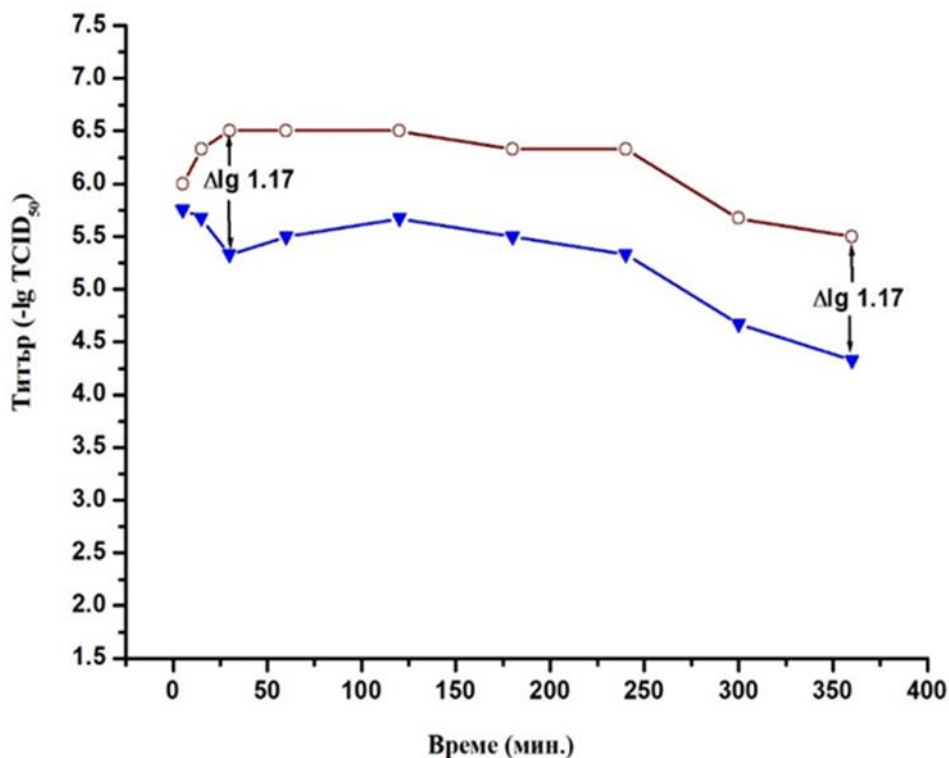
Екстрактите бяха приложени в концентрация, отговарящи на тяхната МНК.

4.2.2.1. Вирусцидна активност на екстракт от цвят на *S. nigra* L. спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

Бе отчетена слаба инактивация на вируса на 15^{-та} минута от началото на контакта, а при 30^{-та} минута разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига приблизително 1 lg. През следващите интервали на отчитане тази разлика в титрите не се променят съществено (фиг. 11, таблица 7).

Таблица 7. Вирусцидна активност на екстракт от цвят от *S. nigra* L., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

| Интервали (минути) | Вирусен титър на контролата | Вирусен титър на пробата | Разлика в титрите ($\Delta \log$) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 5 | 6.00 | 5.76 | 0.25 |
| 15 | 6.33 | 5.67 | 0.66 |
| 30 | 6.50 | 5.33 | 1.17 |
| 60 | 6.50 | 5.50 | 1.00 |
| 120 | 6.50 | 5.67 | 0.83 |
| 180 | 6.33 | 5.50 | 0.83 |
| 240 | 6.33 | 5.33 | 1.00 |
| 300 | 5.67 | 4.67 | 1.00 |
| 360 | 5.50 | 4.33 | 1.17 |



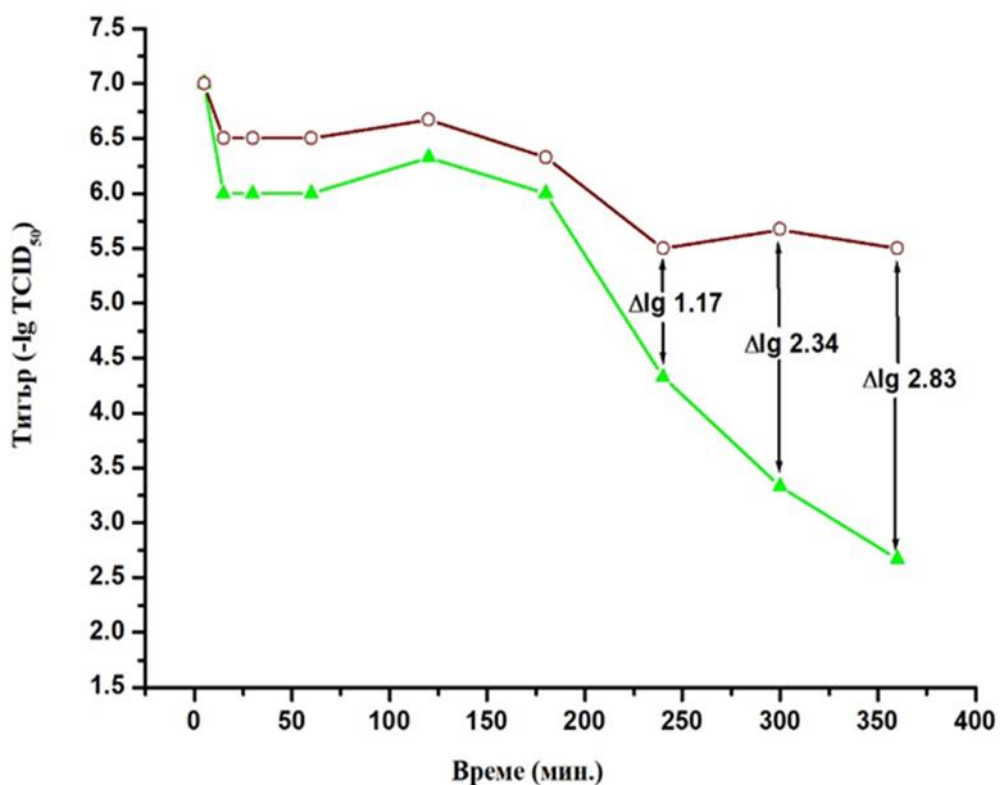
Фигура 11. Вирусцидна активност на екстракт от цвят на *S. nigra* L. (—▼—), спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F (—○—).

4.2.2.2. Вирусцидна активност на воден екстракт от листа на *S.nigra* L., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

Едва на 240^{-та} минута от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига приблизително 1 lg, като на 360^{-та} минута тази разликата се увеличава и достига приблизително 3 lg (фиг. 12, таблица 8).

Таблица 8. Вирусцидна активност на екстракт от листа от *S. nigra* L., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F

| Интервали (минути) | Вирусен титър на контролата | Вирусен титър на пробата | Разлика в титрите ($\Delta\lg$) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 5 | 7.00 | 7.00 | 0.00 |
| 15 | 6.50 | 6.00 | 0,50 |
| 30 | 6.50 | 6.00 | 0,50 |
| 60 | 6.50 | 6.00 | 0,50 |
| 120 | 6.67 | 6.33 | 0,34 |
| 180 | 6.33 | 6.00 | 0,33 |
| 240 | 5,50 | 4,33 | 1,17 |
| 300 | 5,67 | 3,33 | 2,34 |
| 360 | 5,50 | 2,67 | 2,83 |



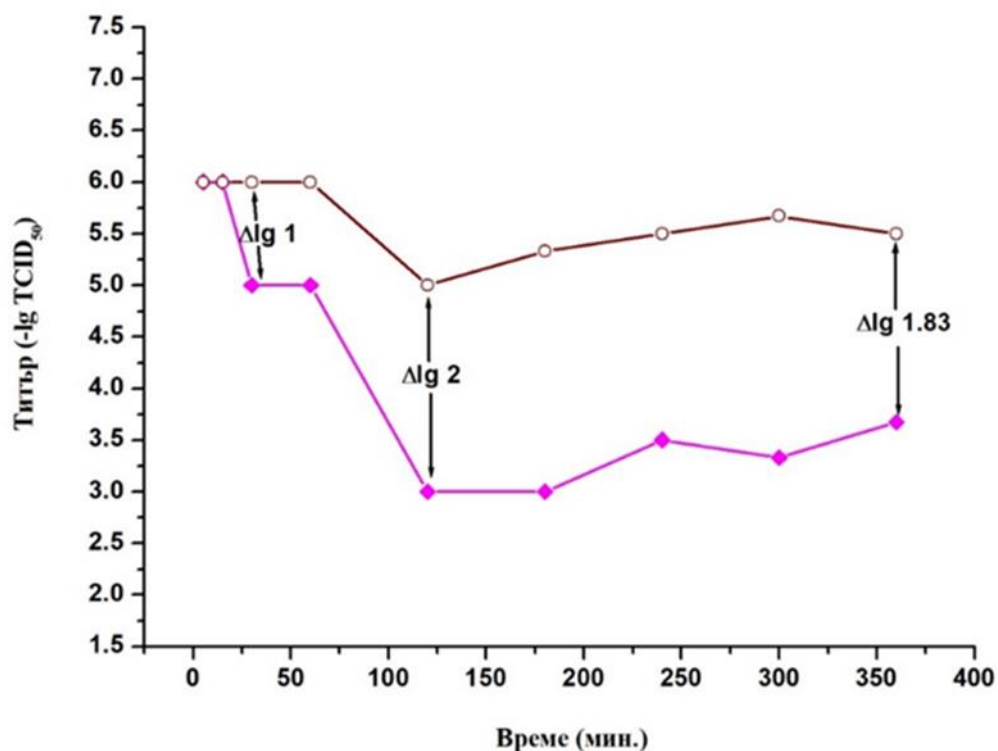
Фигура 12. Вирусцидна активност на екстракт от листа на *S. nigra* L. (—▲—), спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F (—○—).

4.2.2.3. Вирусцидна активност на воден екстракт от плод на *S. nigra* L., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

На 30^{-та} минута от контакта с вируса разликата в титъра на третирания и контролния вирус достига приблизително 1 lg, на 120^{-та} минута се увеличава на 2 lg и остава такава през следващите интервали от време (фиг. 13, таблица 9).

Таблица 9. Вирусцидна активност на екстракт от плод от *S. nigra* L., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F

| Интервали (минути) | Вирусен титър на контролата | Вирусен титър на пробата | Разлика в титрите ($\Delta\lg$) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 5 | 6,00 | 6,00 | 0,00 |
| 15 | 6,00 | 6,00 | 0,00 |
| 30 | 6,00 | 5,00 | 1,00 |
| 60 | 6,00 | 5,00 | 1,00 |
| 120 | 5,00 | 3,00 | 2,00 |
| 180 | 5,33 | 3,00 | 2,33 |
| 240 | 5,50 | 3,50 | 2,00 |
| 300 | 5,67 | 3,33 | 2,34 |
| 360 | 5,50 | 3,67 | 1,83 |



Фигура 13. Вирусцидна активност на екстракт от плод на *S. nigra* L. (—◆—), спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F (—○—).

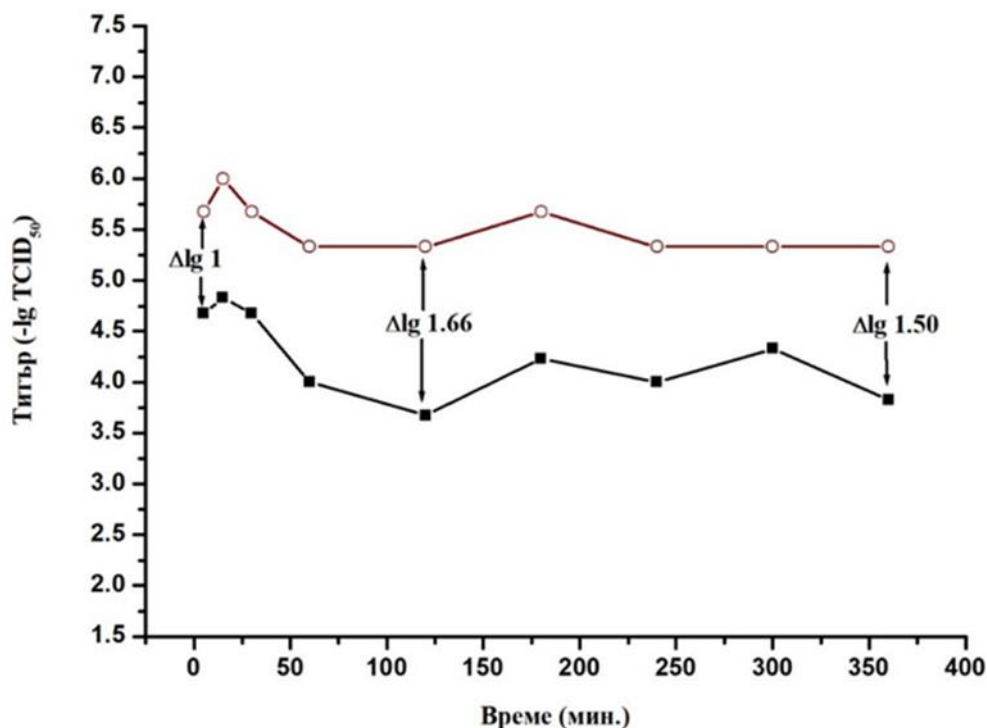
Chen и съавт. установяват, че при въздействие на извънклетъчните инфекциозни вириони на инфекциозния вирусен бронхит при птици (IBV сем. *Coronavirus*) с етанолов екстракт от плод на *S. nigra* L. се нарушава целостта на вирусния суперкапсид. Електронната микроскопия на така третираните IBV вириони показват нарушения в структурата им и наличието на множество мембранны везикули (Chen C. et al., 2014). Напълно е възможно екстрактът да повлиява целостта на суперкапсида на херпесните вируси по подобен начин, реализирайки вирусоцидното си действие.

4.2.2.4. Вирусоцидна активност на воден екстракт от плод на *S. ebulus* L., спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

На първия интервал на отчитане се наблюдава разлика в титъра на третирания и контролния вирус от 1 lg, който постепенно нараства с увеличаване времето на контакт (фиг. 14, таблица 10).

Таблица 10. Вирусоцидна активност на екстракт от плод от *S. ebulus* L, спрямо неразреден вирус ННV-1, щам F.

| Интервали (минути) | Вирусен титър на контролата | Вирусен титър на пробата | Разлика в титрите ($\Delta\log$) |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--|
| 5 | 5.67 | 4.67 | 1.00 |
| 15 | 6.00 | 4.83 | 1.17 |
| 30 | 5.67 | 4.67 | 1.00 |
| 60 | 5.33 | 4.00 | 1,33 |
| 120 | 5.33 | 3,67 | 1,66 |
| 180 | 5.67 | 4.23 | 1.44 |
| 240 | 5.33 | 4.00 | 1.33 |
| 300 | 5.33 | 4.33 | 1.00 |
| 360 | 5.33 | 3.83 | 1.50 |



Фигура 14. Вирусцидна активност на екстракт от плод на *S. ebulus* L. (—■—), спрямо неразреден вирус HHV-1, щам F (—○—).

От получените експериментални данни за въздействието на четирите екстракта върху извънклетъчните вириони на HHV-1, щам F се вижда, че с увеличаване на времето на контакт се увеличава и активността им в различна степен, като най-активен е екстрактът от плод на тревит бъз.

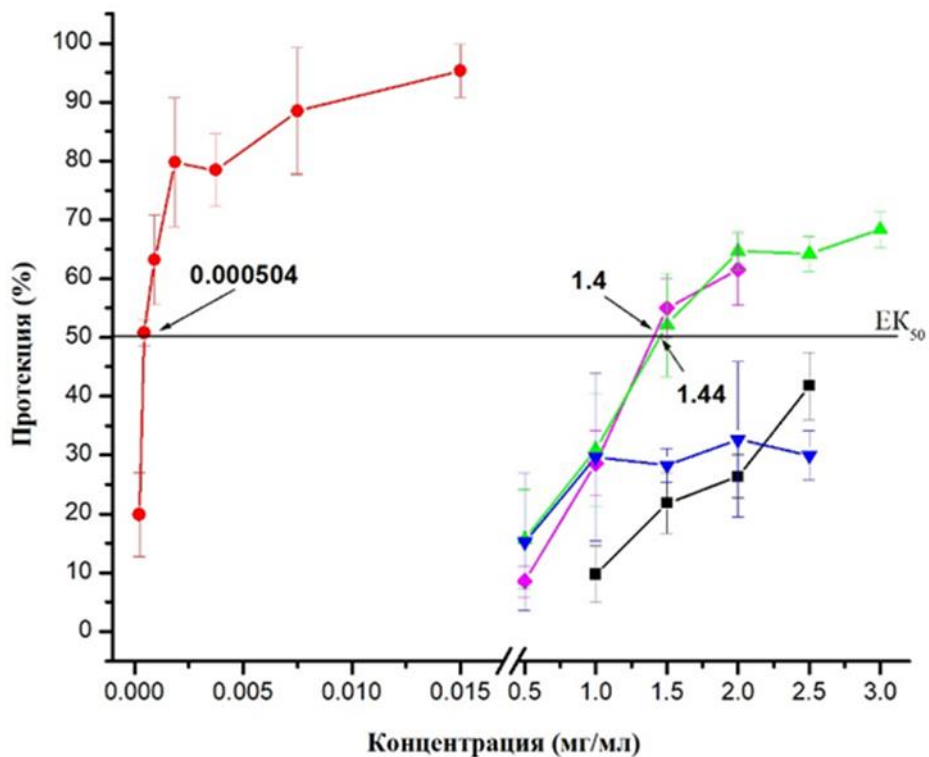
4.2.3. Изследване ефекта на екстракти от *S. ebulus* L. и *S. nigra* L. върху репликацията на HSV -1 (F) и HSV-2 (BA).

4.2.3.1. Определяне на антивирусния ефект на екстракт от плод на *S. ebulus* L., от листа, плод и цвят на *S. nigra* L. върху репликацията на HSV -1 (F) и HSV-2 (BA) в постановка на многоциклов ЦПЕ-инхибиращ тест, чрез модифициран МТТ тест.

При работата с първия тип на човешкия алфагерпесен вирус бяха използвани две опитни постановки в зависимост от времето на добавяне на екстрактите – последователно и едновременно. При работата с втори тип на човешки алфагерпесен вирус беше използван само щам BA и беше използвана само първата опитна постановка.

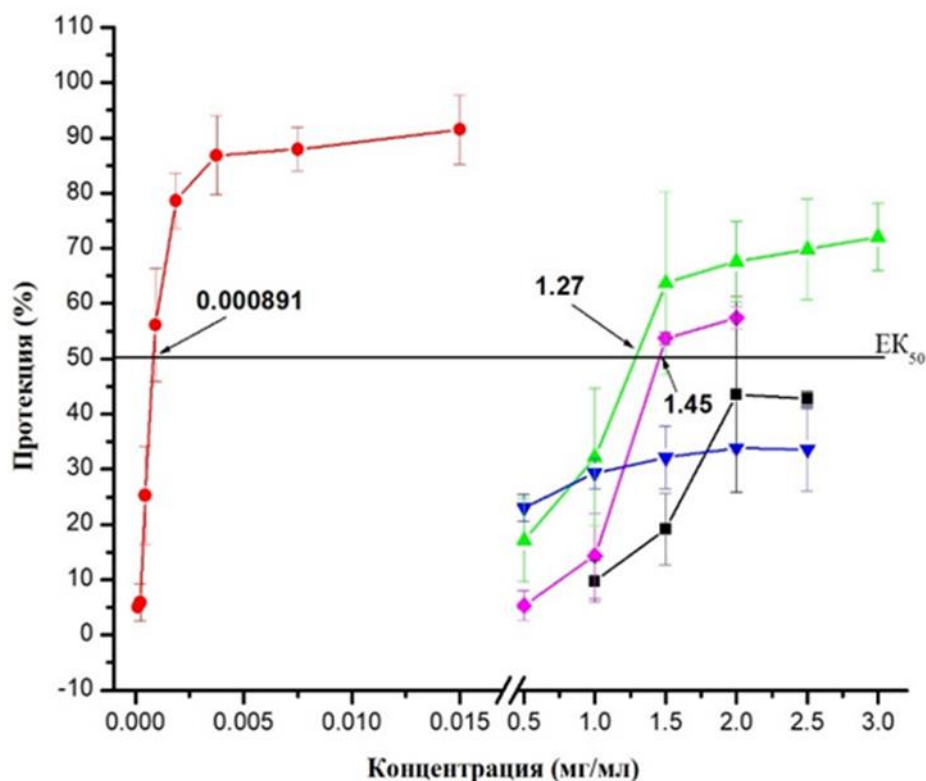
4.2.3.1.1. Определяне на антивирусното действие на екстракти от плод на *S. ebulus* L., от листа, плод и цвят на *S. nigra* L. върху репликацията на HHV -1 (F) и HHV-2 (BA), при последователно добавяне на извлеките.

Получените експериментални данни са представени таблично и онагледени чрез графики по-долу (за HHV – 1 (F) табл. 11 и фиг. 15 и за HHV – 2 (BA) таб.11 и фиг. 16).



Фигура 15. Въздействие на последователно приложени екстракти от плод (—■—) на *S. ebulus* L.; листа (—▲—), плод (—◆—) и цвет (—▼—) от *S. nigra* L. и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-1 (F).

От таблично и графично представените данни става ясно, че при последователно приложение най-силен протективен ефект показват екстрактите от плод и листа на *S. nigra* L. В МНК достигат 61.52% и 68.33% протекция, съответно. Екстрактите от плодовете на *S. ebulus* L. и цветовете на *S. nigra* L. имат значително по-ниска протекция.



Фигура 16. Въздействие на последователно приложени екстракти от плод (—■—) на *S. ebulus* L.; листа (—▲—), плод (—◆—) и цвят (—▼—) от *S. nigra* L. и АЦВ (—●—) върху репликацията на ННV-2 (ВА).

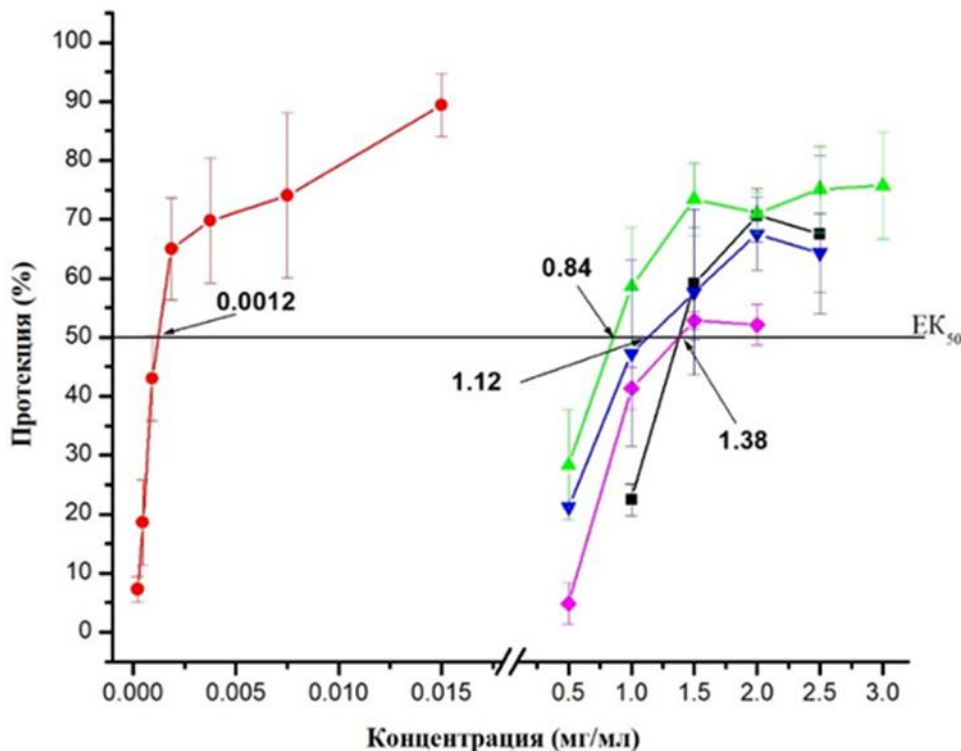
От експериментално получените резултати (фиг. 15 и фиг. 16 и табл. 11) може да се направи извода, че подобно на данните, получени за първия тип на алфахерпесния вирус, и при ННV-2 екстрактите от листа и плод на *S. nigra* L., приложени последователно, показват най-висока активност, като в МНК осигуряват съответно 72.06% протекция ($EK_{50} = 1.27$ мг/мл) и 57.41% протекция ($EK_{50} = 1.45$ мг/мл), а екстрактите от плод на *S. ebulus* L. и цвят на *S. nigra* L. имат слаб протективен ефект.

Макар и стойностите на селективните индекси да са сходни, по-добър ефект спрямо двата вирусни щама проявява екстрактът от листа на *S. nigra*.

Активността на екстрактите от плод на *S. nigra* L. ($EK_{50} = 1.4$ мг/мл за ННV – 1 (F), $EK_{50} = 1.45$ мг/мл за ННV – 2 (ВА)) и за листа от *S. nigra* L. ($EK_{50} = 1.44$ мг/мл за ННV – 1 (F), $EK_{50} = 1.27$ мг/мл за ННV – 2 (ВА)) са много по-ниски от тези на ацикловир ($EK_{50} = 0.000504$ мг/мл за ННV – 1 (F), $EK_{50} = 0.000891$ мг/мл за ННV – 2 (ВА)).

4.2.3.1.2. Определяне на антивирусното действие на екстракти от плод на *S. ebulus* L., от листа, плод и цвят на *S. nigra* L. върху репликацията на ННV -1 (F) при едновременно добавяне на извлекците.

Получените експериментални данни са представени таблично (табл. 11) и онагледени чрез графика (фиг. 17) по-долу.



Фигура 17. Въздействие на едновременно приложени екстракти от плод (—■—) на *S. ebulus* L.; листа (—▲—), плод (—◆—) и цвят (—▼—) от *S. nigra* L. и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-1 (F).

Таблица 11. Антивирусна активност на екстракти от плод на *S. ebulus* L., от листа, плод и цвят на *S. nigra* L. и АЦВ върху репликацията на HHV-1 (F) при едновременно и върху репликацията на HHV-1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD) при последователно добавяне.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | |
|------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | Едновременно | | Последователно | | | |
| | HHV-1 (F) | | HHV-1 (F) | | HHV-2 (BA) | |
| | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Плод (Тревист бъз) | 1.38 | 2.69 | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| Листа (Дървовиден бъз) | 0.84 | 6.61 | 1.44 | 3.87 | 1.27 | 4.38 |
| Плод (Дървовиден бъз) | 1.38 | 2.89 | 1.4 | 2.84 | 1.45 | 2.75 |
| Цвят (Дървовиден бъз) | 1.12 | 5.25 | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. |
| Ацикловир | 0.0012 | 181.66 | 0.000504 | 432.53 | 0.000891 | 244.66 |

н.д.-няма данни

Данните от тази експериментална постановка (табл. 11 и фиг. 17) показват, че и четирите изследвани екстракта проявяват протективен ефект. Активността на екстрактите от плод на *S. ebulus* L. и цвят на *S. nigra* L. е по-висока в сравнение с резултатите от предната опитна постановка, като осигуряват протекция на клетките в МНК повече от 50% (съответно 67.48% (ЕК₅₀ = 1.38 мг/мл) и 64.33% (ЕК₅₀ = 1.12 мг/мл)).

Активността на екстракта от листа на *S. nigra* L. също е по-висока при втората експериментална постановка, като в МНК осигурява 75.72% протекция на клетките (ЕК₅₀ 1.44 мг/мл при последователното и 0.84 мг/мл при едновременното). Отчетените стойности при прилагане на екстрактите от плод на *S. nigra* L. нямат промяна. Сравняването на стойностите на ЕК₅₀ за четирите екстракта показва, че най-активен е екстрактът от листа на *S. nigra* L. Стойностите за останалите три екстракта са близки. С най-ниска активност са екстрактите от плода на *S. ebulus* L. и *S. nigra* L. – ЕК₅₀ = 1.38 мг/мл). Протекцията при последователно приложение на екстракта от листа (68.33%) е малко по-ниска от тези получени при едновременното му прилижение (75.72%).

Повишаването на протективното действие на екстрактите от плод на *S. ebulus* L. при едновременно му прилагане в МНК – 67.48% в сравнение с последователното му прилагане, където дори не достига 50 %, вероятно е свързано с инхибиране на извънклетъчните вируси. Данните за вирусоцидното действие на екстракта показват намаляване на титъра на извънклетъчните вириони с 1 lg още на 5^{-та} минута.

Подобно предположение може да се направи и за екстракта от цвят на *S. nigra* L., прилаган в МНК, при който се наблюдава два пъти по-висока протекция при едновременното му приложение – 64.33%, в сравнение с последователното му прилагане – 29.30% (екстрактът намалява титъра на извънклетъчните вириони с 1 lg на 30^{-та} минути след контакт с вируса).

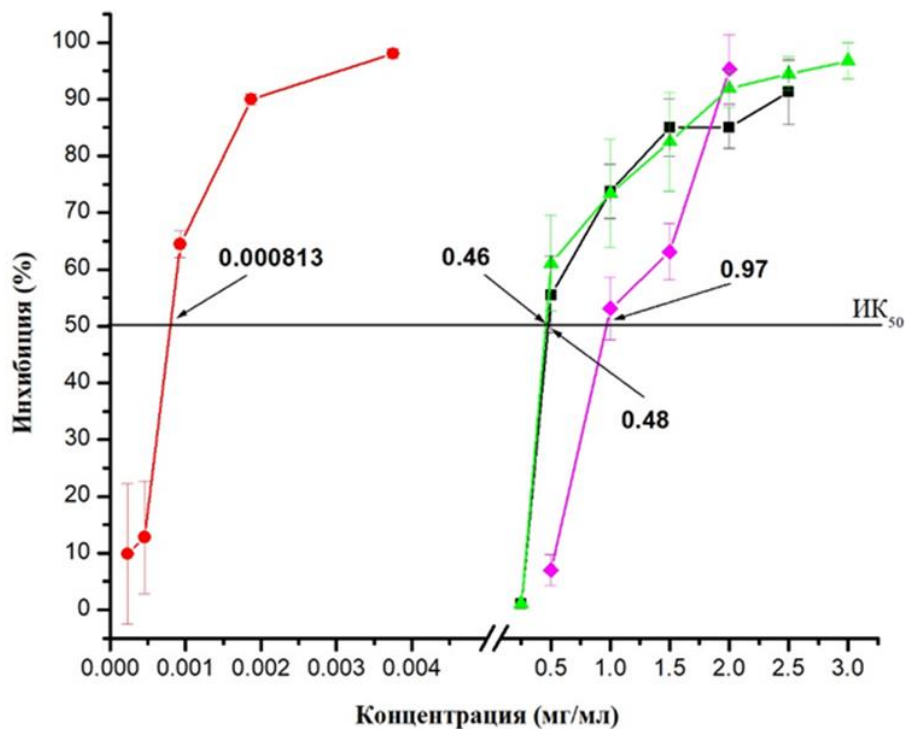
Повишаването на активността на екстракта от листа на *S. nigra* L. в тази опитна постановка (ЕК₅₀ = 1.44 мг/мл при последователното и ЕК₅₀ = 0.84 мг/мл при едновременното) вероятно не се дължи на инхибирането на извънклетъчните вириони (според теста за вирусоцидното действие на екстракта, титърът на извънклетъчните вириони намалява с 1 lg едва на 240^{-та} минута от контакта си с вируса). Твърде е възможно екстрактът да повлиява ранните етапи от вирусната репликация, чрез въздействие различно от вирусоцидното.

Активността на екстракта от плодът на *S. nigra* L. не се влияе от начина му на прилижение като стойностите на ЕК₅₀ са сходни. Стойността за ЕК₅₀ на екстрактите от плодовете на двете растения са идентични.

4.2.3.2. Определяне на антивирусния ефект на екстракти от плод на *S. ebulus* L., от листа и плод на *S. nigra* L. в постановка на многоциклов тест за редукция на вирусния добив на ННV -1 (F) и ННV-2 (BA), при последователно добавяне на извлците.

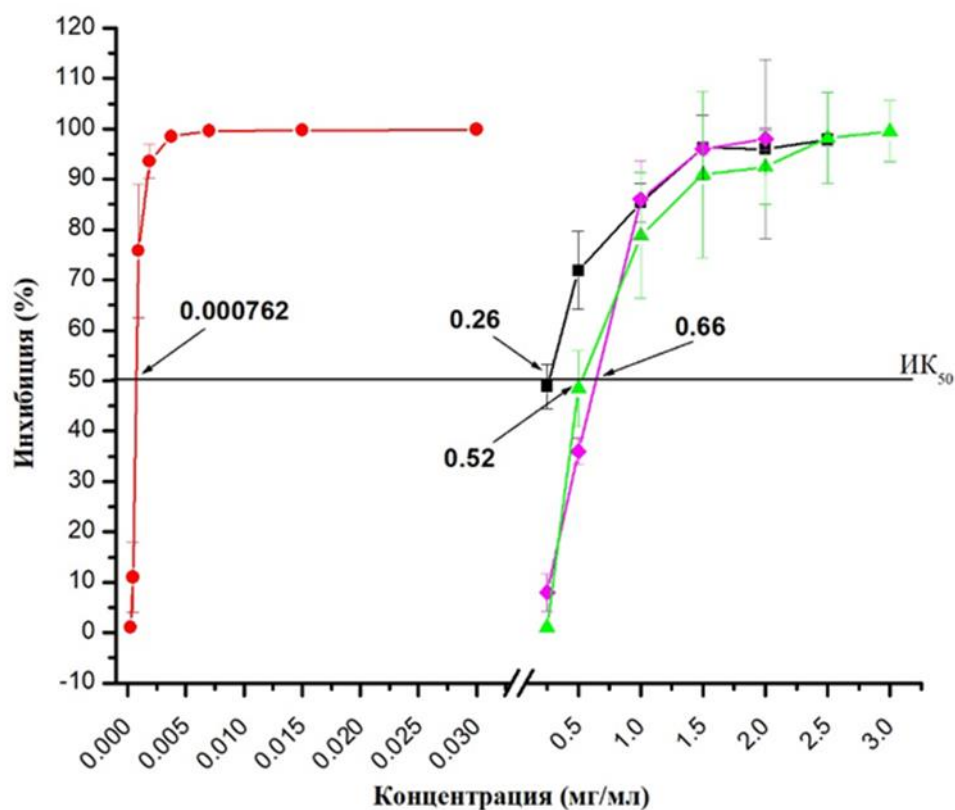
Използвайки теста, определящ намаляването на количеството на инфекциозното вирусно потомство, са изследвани екстрактите от *S. nigra* L. (от плод и листа) и екстрактът от плод от *S. ebulus* L., които показват най-висока активност, определена чрез многоцикловия ЦПЕ-инхибиращ тест.

Получените експериментални данни са представени таблично и онагледени чрез графики по-долу (за ННV – 1 (F) табл. 12 и фиг. 18 и за ННV – 2 (BA) табл. 12 и фиг. 19).



Фигура 18. Въздействие на последователно приложени екстракти от плод (—■—) на *S. ebulus* L.; листа (—▲—) и плод (—◆—) от *S. nigra* L. и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-1 (F).

При въздействието на HHV-1 (F) с водния екстракт на плод от *S. ebulus* L. количеството на инфекциозното вирусно потомство намалява (в МНК достига 91.25 % инхибиция). Същото важи и за екстрактите от плод и листа на *S. nigra* L. Като в МНК инхибицията на инфекциозното вирусно потомство достига 95.26 % и 96.75 % за плод и листа, съответно. При сравняване на стойностите за ИК₅₀ за трите екстракта (табл. 12) се вижда, че с най-висока активност е екстрактът от листа на *S. nigra* L., а с най-ниска е екстрактът от плод на същия бъз.



Фигура 19. Въздействие на последователно приложени екстракти от плод (—■—) на *S. ebulus* L.; листа (—▲—) и плод (—◆—) от *S. nigra* L. и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-2 (BA).

Таблица 12. Антивирусна активност на екстракти от плод на *S. ebulus* L., от листа и плод на *S. nigra* L. и АЦВ върху репликацията на HHV-1 (F) и HHV-2 (BA) при последователно добавяне на екстрактите.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | |
|------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | HHV-1 (F) | | HHV-2 (BA) | |
| | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Листа (Дървовиден бъз) | 0.46 | 12.13 | 0.52 | 10.73 |
| Плод (Дървовиден бъз) | 0.97 | 4.1 | 0.66 | 6.03 |
| Плод (тревист бъз) | 0.48 | 7.73 | 0.26 | 14.27 |
| Ацикловир | 0.000813 | 268.14 | 0.000762 | 286.08 |

Както при първия тип, така и при втория тип на човешкия алфахерпесен вирус, титърът на инфекциозните вириони намалява при въздействие с водния екстракт на плод от *Sambucus ebules* L. (в МНК достига 97.81 % инхибиция). За екстрактите от плод и листа на *Sambucus nigra* L. също се наблюдава намаляване на инфекциозното вирусно потомство. В МНК инхибицията на продукцията на дъщерните вириони достига 98.04 % за плода и 99.48% за листата. Стойностите за ИК₅₀ (табл. 12) полказват, че с най-висока активност е извлекът от плода на *Sambucus ebulus* L., а с най-ниска е екстрактът от плода на *Sambucus nigra* L.

Резултатите, получени при тази експериментална постановка, потвърждават тези, получени при МТТ теста. Определените високи протективни стойности са подкрепени

от понижената продукция на инфекциозни дъщерни вириони. И при двата използвани вирусни щама отчетените стойности за инхибицията (%) в МНК и ИК₅₀ не се различават съществено, което показва, че екстрактите не проявяват избирателно действие по отношение на даден щам.

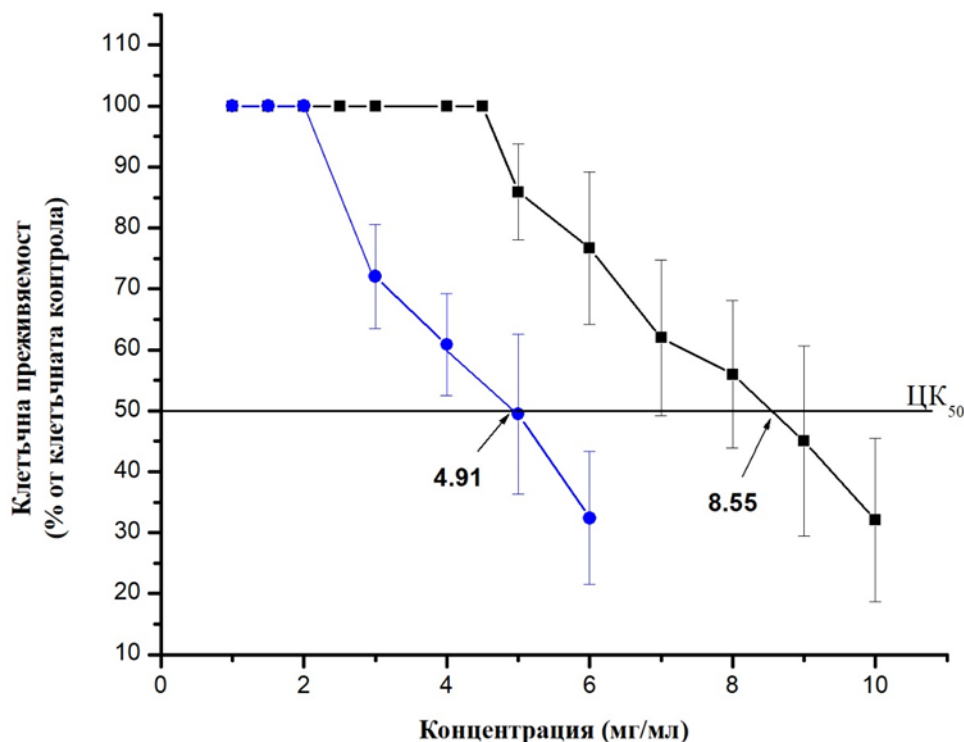
Активността на екстрактите (ИК₅₀ за ННV – 1 (F) е 0.48 мг/мл, а за ННV – 2 (BA) е 0.26 мг/мл за плода от *Sambucus ebulus* L. и ИК₅₀ за ННV – 1 (F) е 0.97 мг/мл, а за ННV – 2 (BA) е 0.66 мг/мл за плода от *Sambucus nigra* L. и ИК₅₀ за ННV – 1 (F) е 0.46 мг/мл, а за ННV – 2 (BA) е 0.52 мг/мл за листа от *Sambucus nigra* L.) е много по ниска от тази на ацикловира (ИК₅₀ за ННV – 1 (F) е 0.000813мг/мл, а за ННV – 2 (BA) е 0.000762 мг/мл).

4.3 *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L.

4.3.1. Определяне на преживяемостта на използваната клетъчна линия под въздействие на водния извлек от *N. nuda* spp. *nuda* L., чрез МТТ-тест.

В използваната експериментална постановка бяха тествани концентрации в граници от 0.5 мг/мл до 10 мг/мл (при определяне на клетъчната преживяемост на 48^{-я} час) и от 0.5 мг/мл до 6 мг/мл (при определяне на клетъчната преживяемост на 72^{-я} час) под въздействие на екстракта от *N. nuda* spp. *nuda* L. Токсичността беше определена за два времеви интервала, за да се проследи дали има понижаване на МНК, при увеличаване на времето на контакт на клетъчната линия с екстракта, и ако има такава да бъде използвана по-високата концентрация при кратковременните антивирусни тестове, където вирусната работна доза и множествеността на инфекция е висока.

Получените стойности са представени в таблица и са изобразени графично (табл. 13 и фиг. 20).



Фигура 20. Ефект на воден екстракт от *N. nuda* spp. *nuda* L. върху преживяемост на клетъчна линия MDBK, определена на 48^{-я} (—■—) и 72^{-я} (—●—) час.

Таблица 13. Токсичност на воден екстракт от *N. nuda* spp. *nuda* L.

| Екстракт | МНК (мг/мл) | | ЦК ₅₀ (мг/мл) | |
|----------|-------------|--------|--------------------------|--------|
| | 48 час | 72 час | 48 час | 72 час |
| Воден | 4.5 | 2 | 8.55 | 4.91 |

От представените таблично и графично данни се вижда, че стойността на ЦК₅₀ определена на 48^{-я} час е около два пъти по-голяма от тази, определена на 72^{-я} час. С увеличаване на времето на контакт между водния екстракт от *N. nuda* spp. *nuda* L. и третираната клетъчна линия нейната преживяемост намалява.

4.3.2. Вирусцидно въдействие на воден екстракт от *N. nuda* spp. *nuda* L. върху HHV-1, щам F; HHV-2, щам BA и щам DD.

Екстрактът бе приложен в концентрация отговаряща на неговата МНК определена на 48^{-я} и 72^{-я} час . При нито един от времевите интервали (определящи продължителността на контакт между вирионите и екстракта) не беше определена промяна в титъра на третирания и контролния вирус. Това недвусмислено показва, че екстрактът не проявява вирусцидна активност.

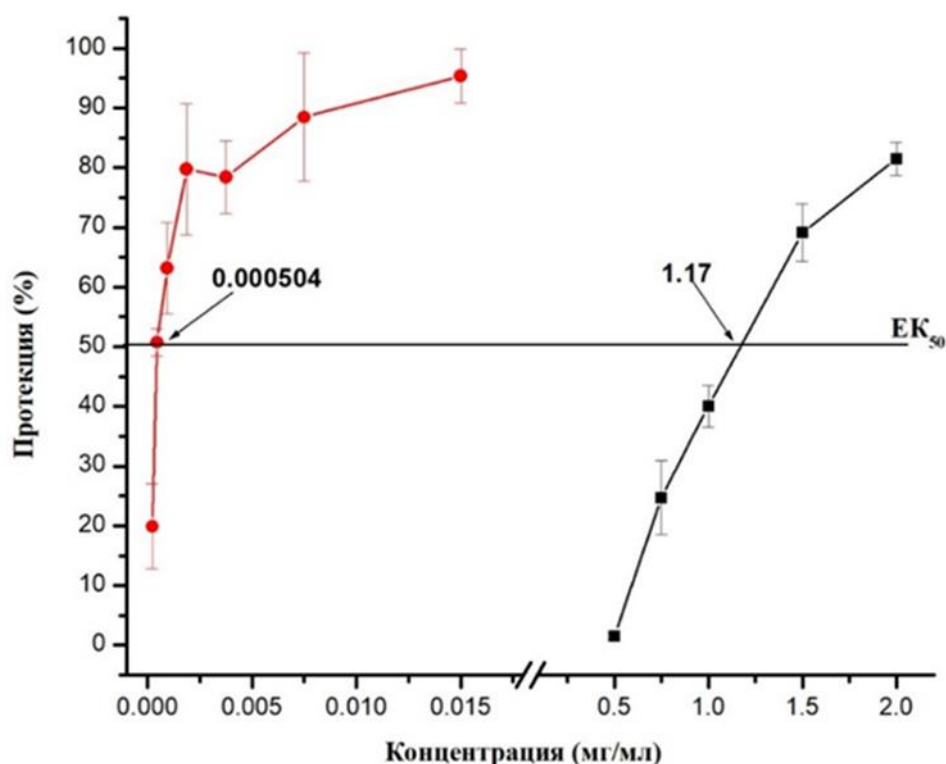
4.3.3. Изследване ефекта на екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. върху репликацията на ННV-1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD).

4.3.3.1. Определяне на антивирусния ефект на екстракта върху репликацията на ННV-1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD) в постановка на многоциклов ЦПЕ-инхибиращ тест, чрез модифициран МТТ тест.

Бяха използвани две опитни постановки в зависимост от времето на добавяне на екстракта – след изтичането на вирусната адсорбция (последователно) и непосредствено след заразяването на клетъчният монослой с вирус (едновременно), за всички използвани шамове на двата типа човешки алфахерпесни вируси. Тъй като продължителността на експеримента е 5 дена, най-високата концентрация, в която екстрактът беше прилаган съответстваше на МНК, определена на 72^{-я} час..

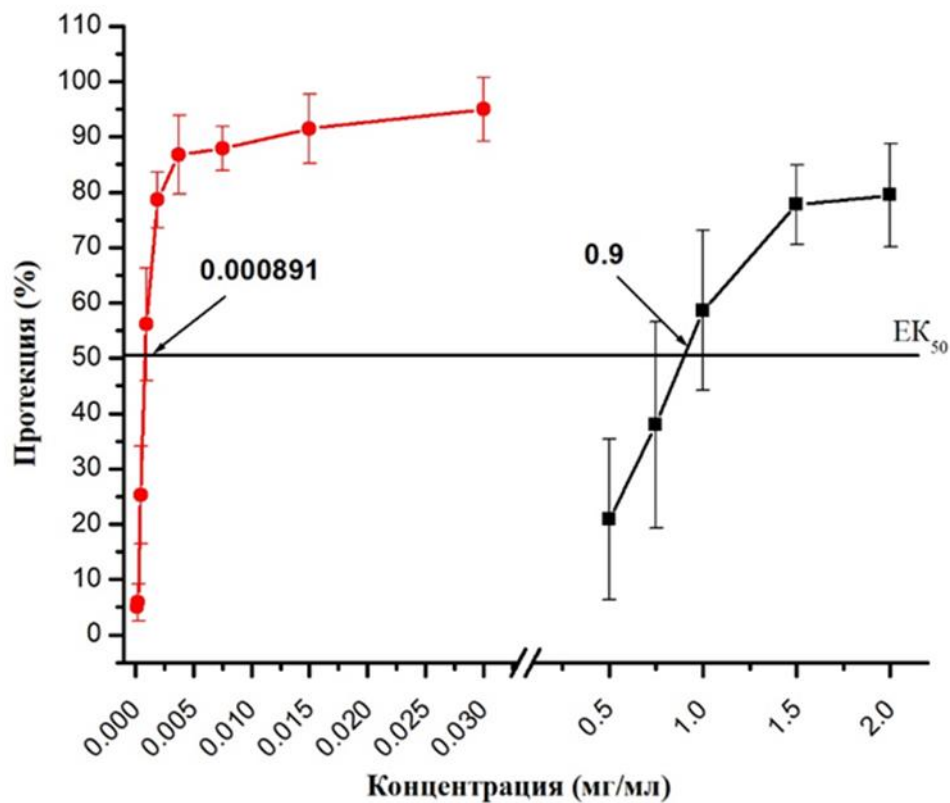
4.3.3.1.1. Определяне на антивирусното действие на екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. върху репликацията на ННV-1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD) при последователното му добавяне.

Получените експериментални данни са представени таблично и онагледени чрез графики по-долу (за ННV – 1 (F) табл. 14 и фиг. 21; за ННV – 2(BA) табл. 14 и фиг. 22; и ННV – 2 (DD) табл. 14 и фиг. 23).

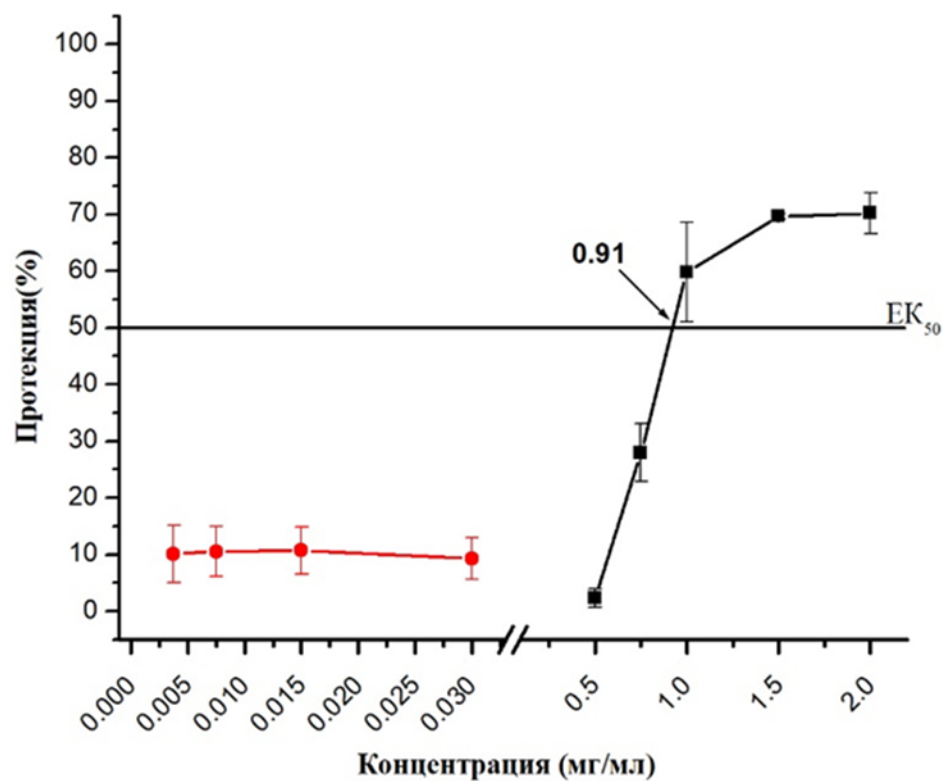


Фигура 21. Въздействие на последователно приложени воден екстракт (—■—) от *N. nuda ssp. nuda* L. и АЦВ (—●—) върху репликацията на ННV-1 (F).

От фигура 21 става ясно, че при последователно приложение водният екстракт на *N. nuda ssp. nuda* L. проявява изразен протективен ефект спрямо ННV-1 (F). В МНК достига 81.47% протекция ($EK_{50} = 1.17$ мг/мл).



Фигура 22. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (BA) на последователно приложен воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—).



Фигура 23. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (DD) на последователно приложен воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—).

Таблица 14. Антивирусна активност на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. и АЦВ върху репликацията на HHV-1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD) при последователно добавяне.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | |
|-----------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|------|
| | HHV-1 (F) | | HHV-2 (BA) | | HHV-2 (DD) | |
| | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ЕК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Воден | 1.17 | 4.19 | 0.9 | 5.45 | 0.91 | 5.39 |
| Ацикловир | 0.000504 | 432.53 | 0.000891 | 244.66 | н.д. | н.д. |

н.д.-няма данни

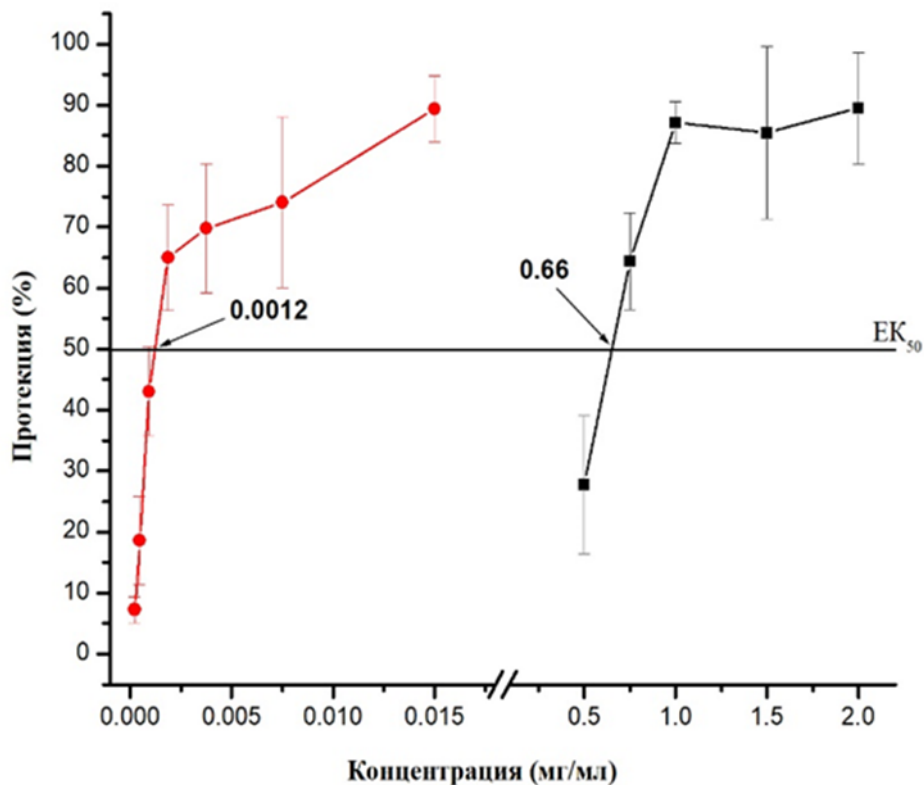
Резултатите получени при прилагане на екстракта спрямо двата използвани щам на човешки алфахерпесен вирус тип 2 са близки на описаните по-горе (за щам F). В МНК стойностите за протекцията достигат 79.45 % (ЕК₅₀ = 0.9 мг/мл) и 70.19% (ЕК₅₀ = 0.91 мг/мл) съответно спрямо щам BA и DD.

Водният екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. осигурява значително ниво на протекция в МНК (фиг. 21, фиг. 22 и фиг. 23) на клетъчната линия, заразена с използваните щамове на първи и втори тип на човешкия алфахерпесен вирус. Стойностите за ЕК₅₀ (табл. 14) не се различават съществено, което показва че екстрактът не проявява изборително действие по отношение на даден щам.

От получените резултати (табл. 14) се вижда, че използваното референтно вещество е по-активно спрямо щам F (ЕК₅₀ = 0.000504 мг/мл) и BA (ЕК₅₀ = 0.000891мг/мл) от приложения воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. Спрямо резистентния щам DD на HHV-2 активността на ацикловира е много ниска, докато водният екстракт запазва своята.

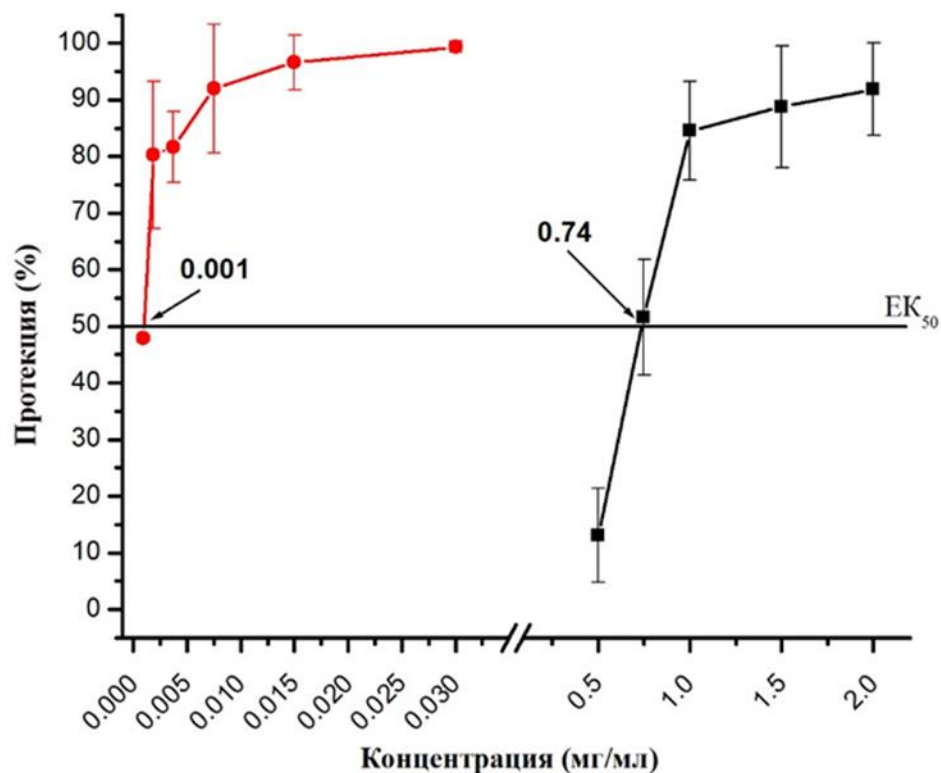
4.3.3.1.2. Определяне на антивирусното действие на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. върху репликацията на HHV -1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD) при едновременното му добавяне.

Получените експериментални данни са представени таблично и онагледени чрез графики по-долу (за HHV-1 (F) табл. 15 и фиг. 24; за HHV-2(BA) табл. 15 и фиг. 25; и HHV-2 (DD) табл. 15 и фиг. 26.

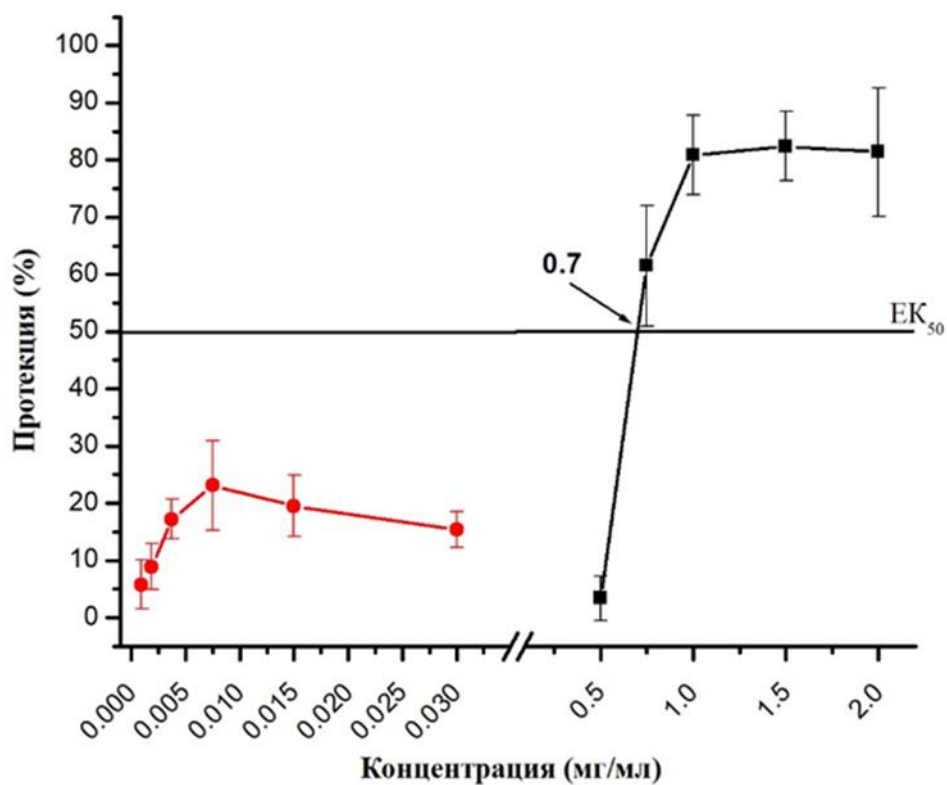


Фигура 24. Въздействие върху репликацията на ННУ-1 (F), на едновременно приложен воден екстракт (—■—) от *N. nuda ssp. nuda* L. и АЦВ (—●—).

Графично представените резултати показват, че при едновременно приложение водният екстракт на *N. nuda ssp. nuda* L. проявява изразен протективен ефект спрямо ННУ-1 (F). В МНК достига 89.49% протекция ($EC_{50} = 0.66$ мг/мл). Ефектът на екстракта е значително по-висок в сравнение с активността определена при предходния експеримент.



Фигура 25. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (BA) на едновременно приложен воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—).



Фигура 26. Въздействие върху репликацията на HHV-2 (DD) на едновременно приложен воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—).

Силно протективно действие се наблюдава и спрямо двата щам на втория тип на човешкия алфахерпесен вирус. Стойностите за протекцията в МНК – 91.88% ($EK_{50} = 0.74$ мг/мл) спрямо щам ВА и 81.37 % ($EK_{50} = 0.7$ мг/мл) спрямо щам DD, са по-високи от тези отчетени при последователното добавяне на екстракта.

Таблица 15. Антивирусна активност на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. и АЦВ върху репликацията на ННВ-1 (F), ННВ-2 (ВА) и ННВ-2 (DD) при едновременно добавяне.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | |
|-----------|-----------------------|--------|----------------------|------|----------------------|------|
| | ННВ-1 (F) | | ННВ-2 (ВА) | | ННВ-2 (DD) | |
| | EK_{50} (мг/мл) | СИ | EK_{50} (мг/мл) | СИ | EK_{50} (мг/мл) | СИ |
| Воден | 0.66 | 7.44 | 0.74 | 6.63 | 0.7 | 7.01 |
| Ацикловир | 0.0012 | 181.66 | 0.001 | 218 | н.д. | н.д. |

н.д.- няма данни

И при трите изследвани вирусни щам отчетените стойности за протекцията (%) в МНК и EK_{50} не се различават съществено, което показва че екстрактът не проявява избирателно действие по отношение на даден щам. Активността на екстракта в постановката на едновременното му добавяне в сравнение с предходната е доста по-силно изразена.

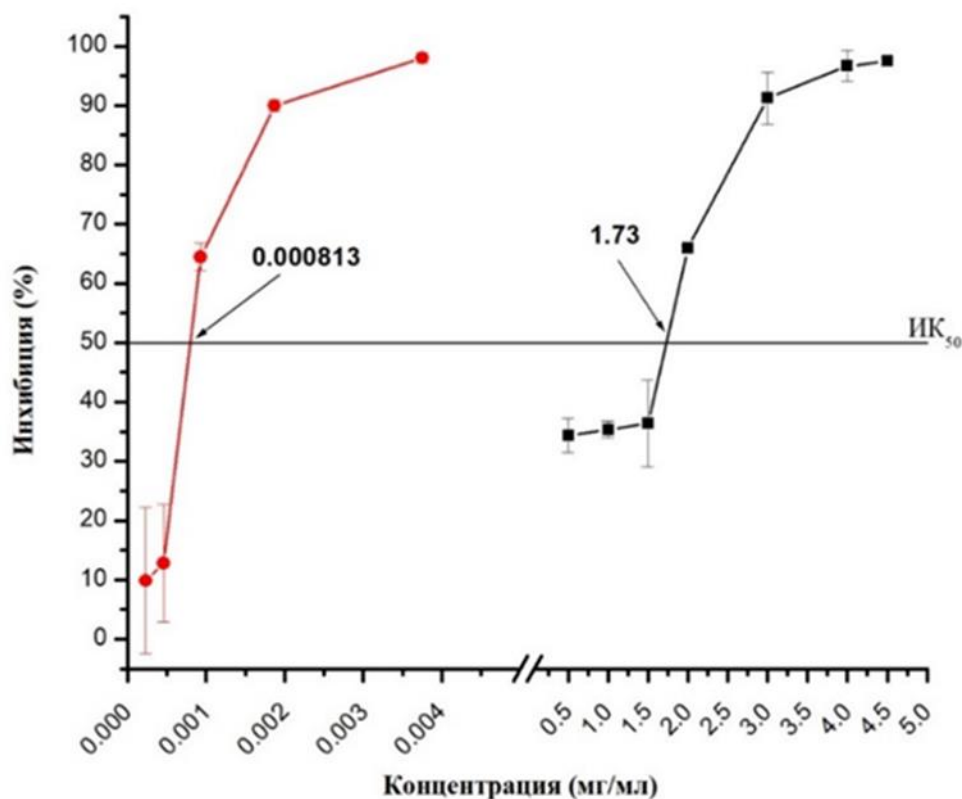
От таблично и графично представените данни (фиг. 24; фиг. 25 и фиг. 26, табл. 15) става ясно, че използваното референтно вещество е по-активно спрямо щам F (EK_{50} 0.0012 мг/мл) и ВА ($EK_{50} = 0.001$ мг/мл) от приложения воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. (аналогично на резултатите от предходната експериментална постановка). Спрямо щам DD на ННВ-2, ацикловирът отново проявява много слаба активност, докато водният екстракт запазва своята.

4.3.3.2. Определяне на антивирусния ефект на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. в постановка на многоциклов тест за редуция на вирусния добив на ННВ -1 (F), ННВ-2 (ВА) и ННВ-2 (DD).

Въздействието върху вирусния репликативен цикъл бе изследвано и чрез многоциклов тест за редуция на вирусния добив. При експериментите бяха използвани две опитни постановки в зависимост от времето на добавяне на екстракта – след изтичането на вирусната адсорбция (последователно) и непосредствено след заразяването на клетъчния монослой с вирус (едновременно). Тъй като продължителността на експеримента е 24 часа, най-високата концентрация, в която екстрактът беше прилаган съответства на МНК определена на $48^{-я}$ час.

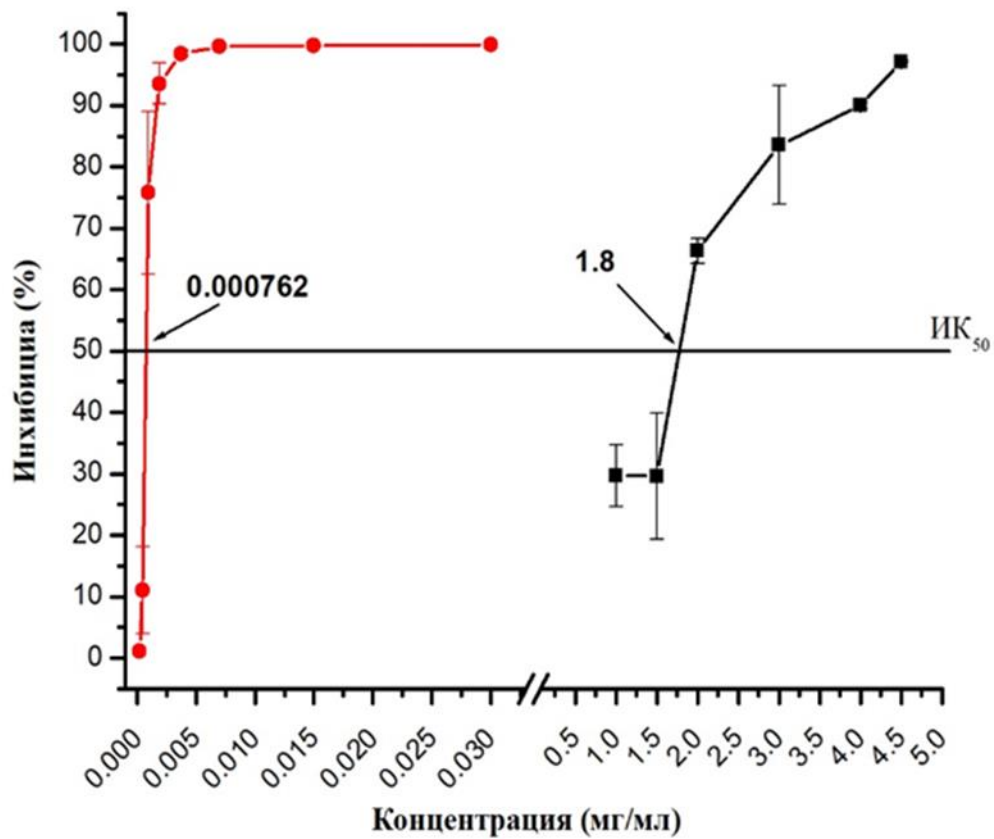
4.3.3.2.1. Определяне на антивирусния ефект на воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. в постановка на многоциклов тест за редукция на вирусния добив на ННВ -1 (F), ННВ-2 (BA) и ННВ-2 (DD), при последователно добавяне на екстракта.

Получените експериментални данни са представени таблично и онагледени чрез графики по-долу (за ННВ – 1 (F) табл. 16 и фиг. 27; за ННВ-2(BA) табл. 16 и фиг. 28 и ННВ – 2 (DD) табл. 16 и фиг. 29).

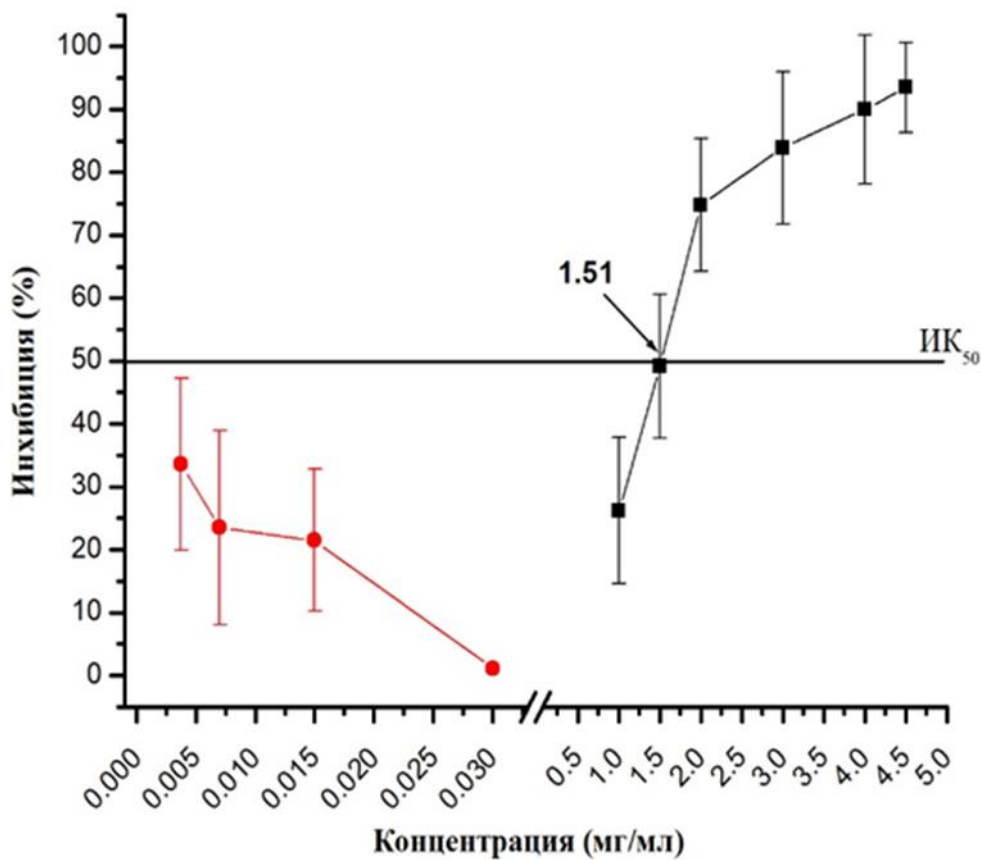


Фигура 27. Въздействие на последователно приложен воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HSV-1 (F).

При третиране заразеният с щам F (ННВ-1) клетъчен монослой, продукцията на инфекциозни дъщерни вириони е намалено значително. Инхибицията в МНК достига 97.485% (ИК₅₀ = 1.73 мг/мл) (фиг. 27, табл. 16).



Фигура 28. Въздействие на последователно приложен воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-2 (BA).



Фигура 29. Въздействие на последователно приложен воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HHV-2 (DD).

Графично и таблично представените данни показват, че активността на екстракта е висока спрямо щам Ва и DD на човешки алфахерпесен вирус тип 2. Стойностите за инхибицията на продукцията на инфекциозното вирусно потомство в МНК достигат 97.08% (ИК₅₀ = 1.8 мг/мл) и 93.47% (ИК₅₀ = 1.51 мг/мл), съответно (фиг. 28 и 29; табл. 16).

Таблица 16. Антивирусна активност на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. и АЦВ върху репликацията на HHV-1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD) при последователно добавяне.

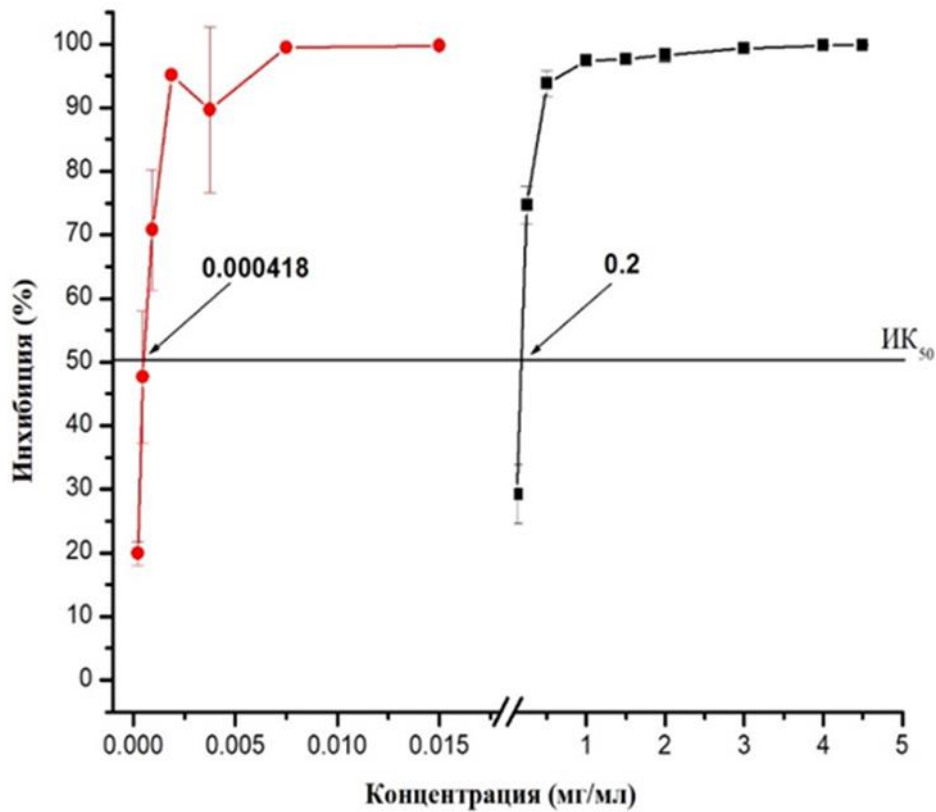
| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | |
|-----------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|------|
| | HHV-1 (F) | | HHV-2 (BA) | | HHV-2 (DD) | |
| | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Воден | 1.73 | 4.94 | 1.8 | 4.74 | 1.51 | 5.66 |
| Ацикловир | 0.000813 | 268.14 | 0.000762 | 286.08 | н.д. | н.д. |

н.д.-няма данни

Резултатите получени при тази експериментална постановка потвърждават тези, получени при МТТ-теста. Определените високи протективни стойности са подкрепени от понижена продукция на инфекциозни дъщерни вириони. И при трите изследвани вирусни щамата отчетените стойности за инхибиция (%) в МНК и ИК₅₀ не се различават съществено, което показва, че екстрактът не проявява избирателно действие по отношение на даден щам. Използваното референтно вещество (АЦВ) проявява по-висока активност спрямо щам F (ИК₅₀ = 0.000813 мг/мл) и щам BA (ИК₅₀ = 0.000762 мг/мл), в сравнение с прилагания воден екстракт. Той обаче запазва активността си спрямо щам DD, докато тази на АЦВ е много ниска.

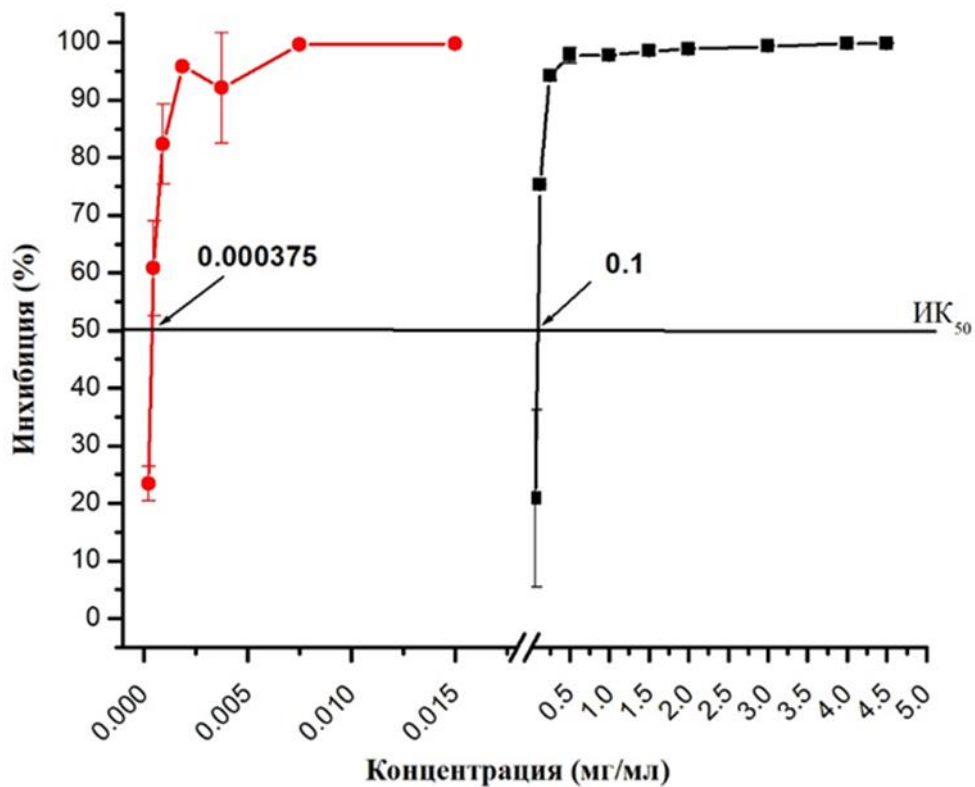
4.3.3.2.2. Определяне на антивирусния ефект на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. в постановка на многоциклов тест за редуция на вирусния добив на HHV -1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD), при едновременно добавяне на екстракта.

При тази експериментална постановка водният екстракт и АЦВ бяха добавени два пъти (за едно и също повторение на експеримента) (виж точка. 3.2.6). Това наложи допълнително определяне на преживяемостта на клетъчната линия на 48^{-я} час, когато АЦВ и водният екстракт бъдат приложени в концентрации отговарящи на тяхната МНК според условията, описани в експерименталната постановка на едновременно добавяне. Получените резултати не се различават от тези получени при определяне токсичността на екстракта на 48^{-я} час.

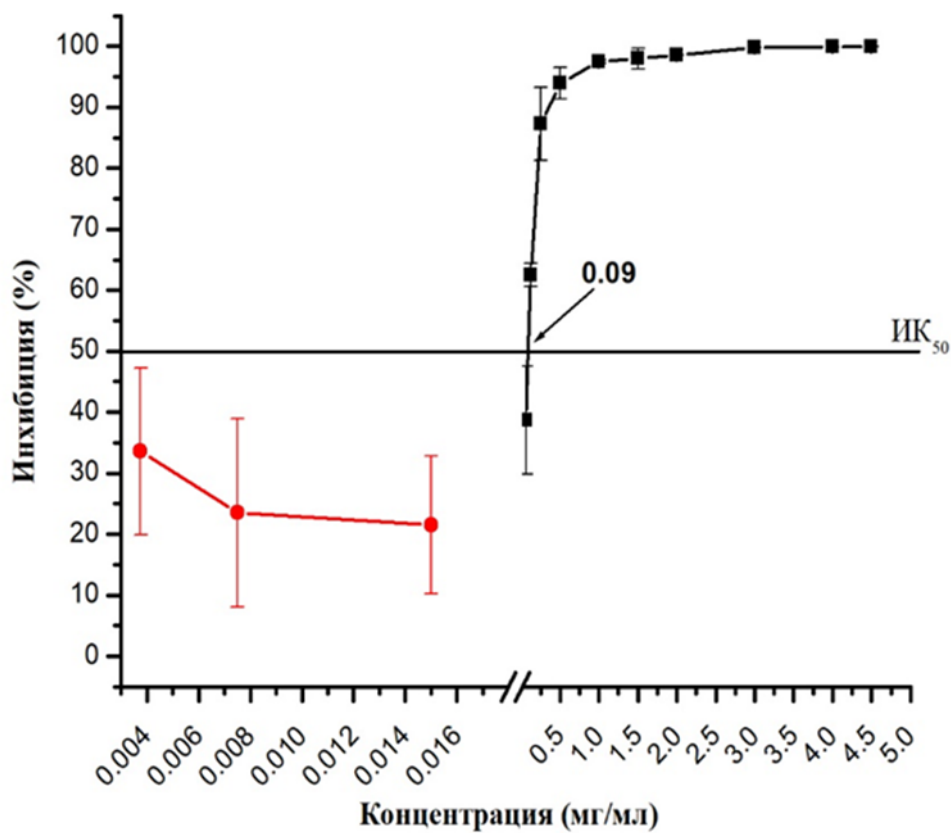


Фигура 30. Въздействие на едновременно приложен воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HSV-1 (F).

Графично онагледените и таблично представените резултати (фиг. 30; табл. 17) показват високата активност на екстракта спрямо щам F. В МНК инхибицията на продукцията на дъщерни вириони е 99.78% ($IK_{50} = 0.2$ мг/мл).



Фигура 31. Въздействие на едновременно приложен воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HSV-2 (BA).



Фигура 32. Въздействие на едновременно приложен воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. (—■—) и АЦВ (—●—) върху репликацията на HSV-2 (DD).

Подобно на направените по-горе изводи за щам F, екстрактът проявява висока инхибираща активност спрямо щам ВА и DD на човешки алфахерпесен вирус тип 2. Процентът на инхибицията на продукцията на инфекциозното вирусно потомство в МНК спрямо щамове ВА и DD достигна съответно 99.86% (ИК₅₀ = 0.1 мг/мл) и 99.94% (ИК₅₀ = 0.09 мг/мл).

Таблица 17. Антивирусна активност на воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. и АЦВ върху репликацията на ННV-1 (F), ННV-2 (ВА) и ННV-2 (DD) при едновременно добавяне.

| Екстракт | Антивирусна активност | | | | | |
|-----------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|------|
| | ННV-1 (F) | | ННV-2 (ВА) | | ННV-2 (DD) | |
| | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ | ИК ₅₀ (мг/мл) | СИ |
| Воден | 0.2 | 42.75 | 0.1 | 85.5 | 0.09 | 95 |
| Ацикловир | 0.000418 | 521.53 | 0.000375 | 581.33 | н.д. | н.д. |

н.д.-няма данни

Получените резултати показват, че при тази опитна постановка екстрактът потиска силно продукцията на дъщерни вириони след заразяване на клетъчната линия с всеки един от трите използвани вирусни щамове. Това корелира с установените високи нива на протекция при МТТ теста. Тенденцията за повишаване на протекцията (%) в МНК и понижаване на стойностите за ЕК₅₀ при едновременното добавяне (табл. 15) на екстракта спрямо последователното (табл. 14) се запазва и при теста, определящ редуцията на инфекциозния вирусен добив (при сравняване на данните за инхибицията (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство и ИК₅₀ за двете опитни постановки) (табл. 16 и 17). И при трите използвани вирусни щамове инхибицията (%) на вирусния добив в МНК и ИК₅₀ не се различава съществено, което показва че екстрактът не проявява избирателно действие по отношение на даден щам.

Стойностите за инхибицията (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство за екстракта приложен в МНК спрямо щамове F, ВА и DD са близки до тези получени при предходната опитна постановка (на последователно добавяне). Наблюдава се обаче съществена разлика в концентрациите на екстракта, при които се достига ИК₅₀, като в постановката на едновременно добавяне на екстракта стойностите са значително по-ниски (вероятно поради особеностите на самата опитна постановка, виж точка 3.2.6.), в сравнение с постановка, при която екстракта се прилага последователно. Активността на АЦВ при добавянето му едновременно остава почти непроменена спрямо активността определена при последователното му добавяне. Отново действието на АЦВ спрямо щам DD е много слабо, за разлика от водния извлек, който проявява високо такова.

И при двата теста, използвани за изследване на въздействието на водния екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. върху репликацията на ННV-1 (F), ННV-2 (ВА) и ННV-2 (DD), активността на екстракта е по-висока при добавянето му едновременно със заразяването на клетъчната линия, докато активността на АЦВ остава почти

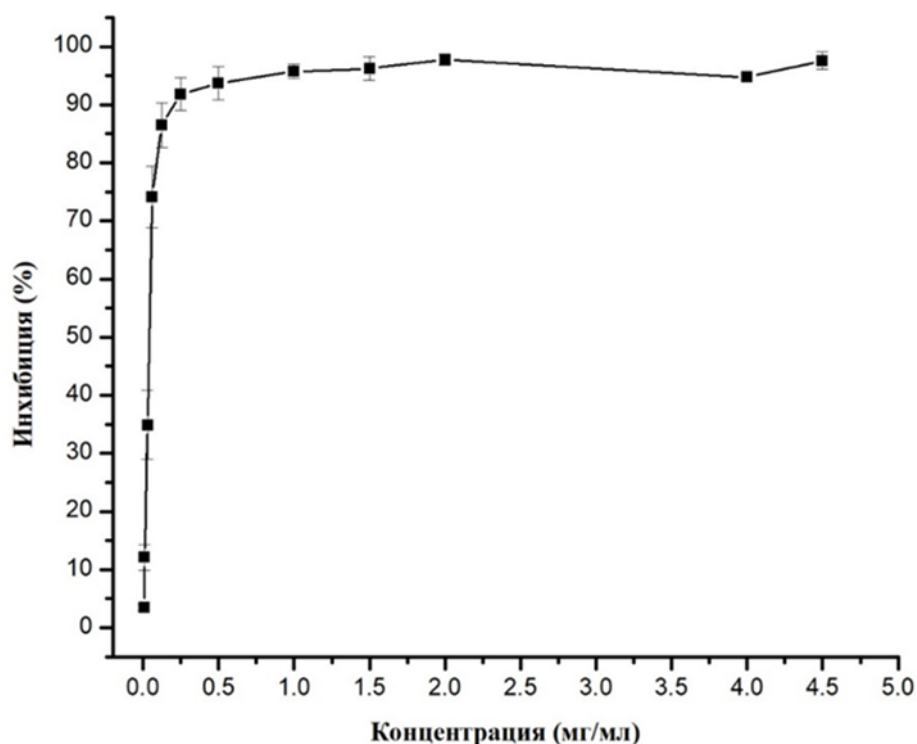
непроменена. При предходните експерименти не беше установена вирусцидна активност, което показва, че наблюдаваният ефект не се дължи на инактивация на извънклетъчните вируси. Много е възможно екстрактът да повлиява ранните етапи на вирусния репликативен цикъл – адсорбцията и пенетрацията на клетъчната мембрана.

4.3.4. Определяне действието на изследвания екстракт от *N. nuda ssp. nuda L.* върху етапа на навлизане на ННВ-1 (F), ННВ-2 (BA) и ННВ-2 (DD) в клетката.

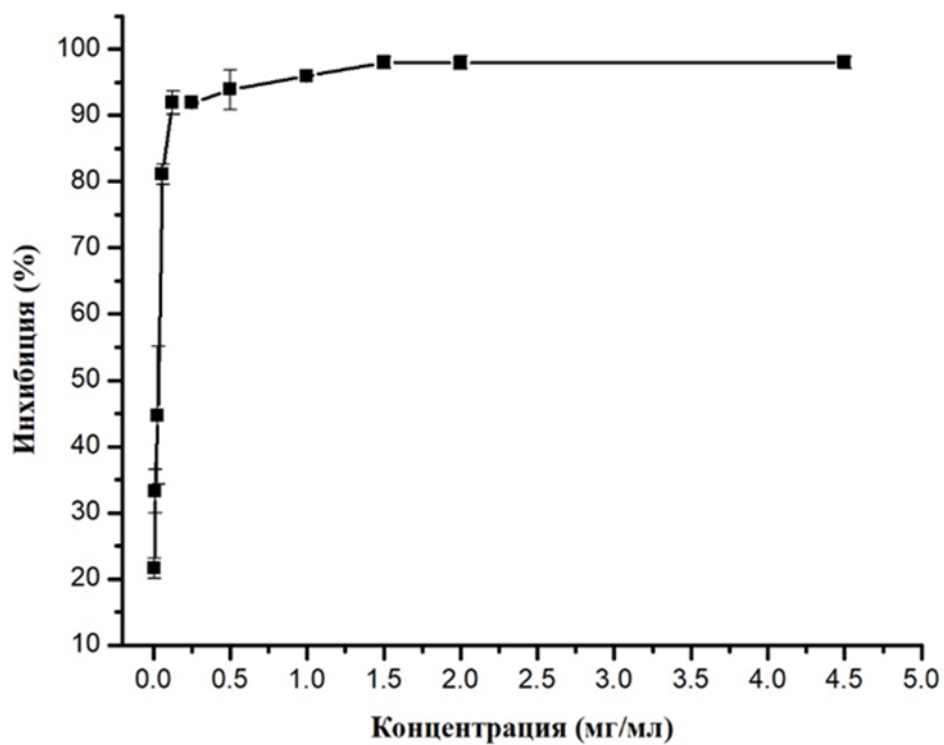
Екстрактът бе приложен в концентрация отговаряща на неговата МНК определена на 48^{-я} и 72^{-я} час.

4.3.4.1. Изследване на въздействието на екстракта от *N. nuda ssp. nuda L.* върху адсорбцията на ННВ-1 (F), ННВ-2 (BA) и ННВ-2 (DD) на клетъчната мембрана.

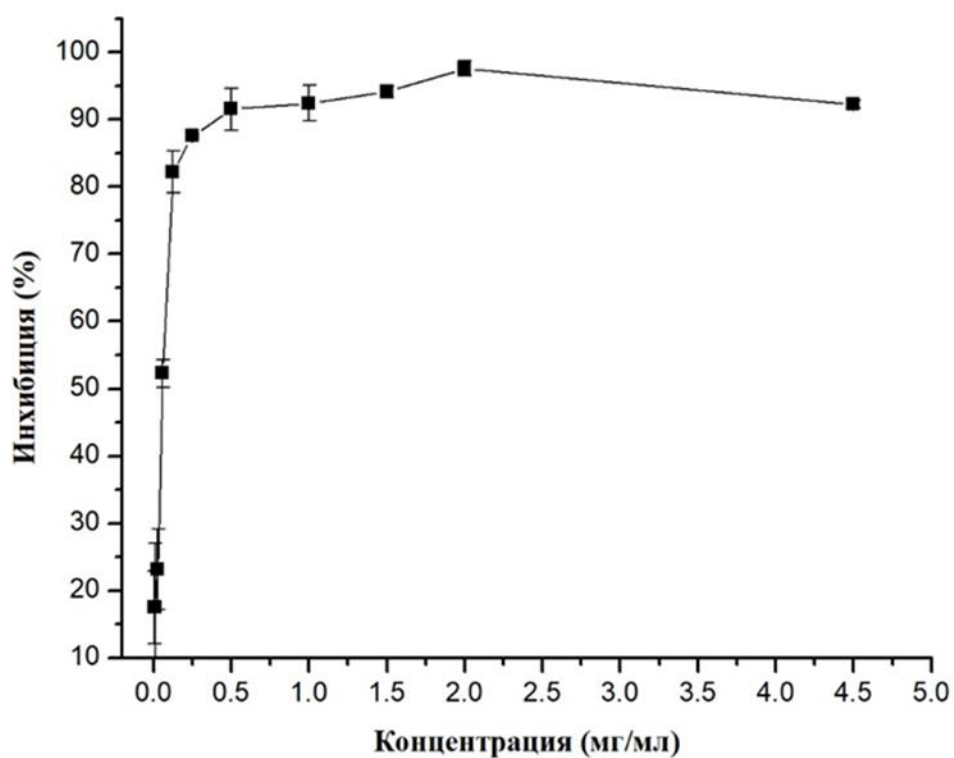
Екстрактът беше приложен в концентрация 4.5 (МНК определена на 48^{-я} час), 2 (МНК определена на 72^{-я} час), 1.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015 мг/мл. Резултатите показват (фиг. 33, фиг. 34 и фиг. 35, табл. 18), че извлекът блокира прикрепването на вируса към клетъчната повърхност във висока степен. Ефектът се проявява при дозозависим начин. При МНК, определена на 48^{-я} час, достига 97.58%, 97.98% и 92.22% редукция броя на плаките, за щам F, BA и DD, съответно. Ацикловирът (използван като референтно вещество), за който се знае, че въздейства върху вътреклетъчните етапи на репликацията на ННВ (De Clercq E., 2004), не повлиява вирусната адсорбция (броят на плаките в третираните и контролните ямки е един и същ).



Фигура 33. Ефект на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda L.* върху прикрепването на ННВ-1, щам F (—■—).



Фигура 34. Ефект на воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. върху прикрепването на HHV-2, щам BA (—■—).



Фигура 35. Ефект на воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. върху прикрепването на HHV-2, щам DD (—■—).

Таблица 18. Инхибиране (%) на адсорбцията на HHV-1, щам F; HHV-2, щам BA и DD, определена на втория час от началото на контакта.

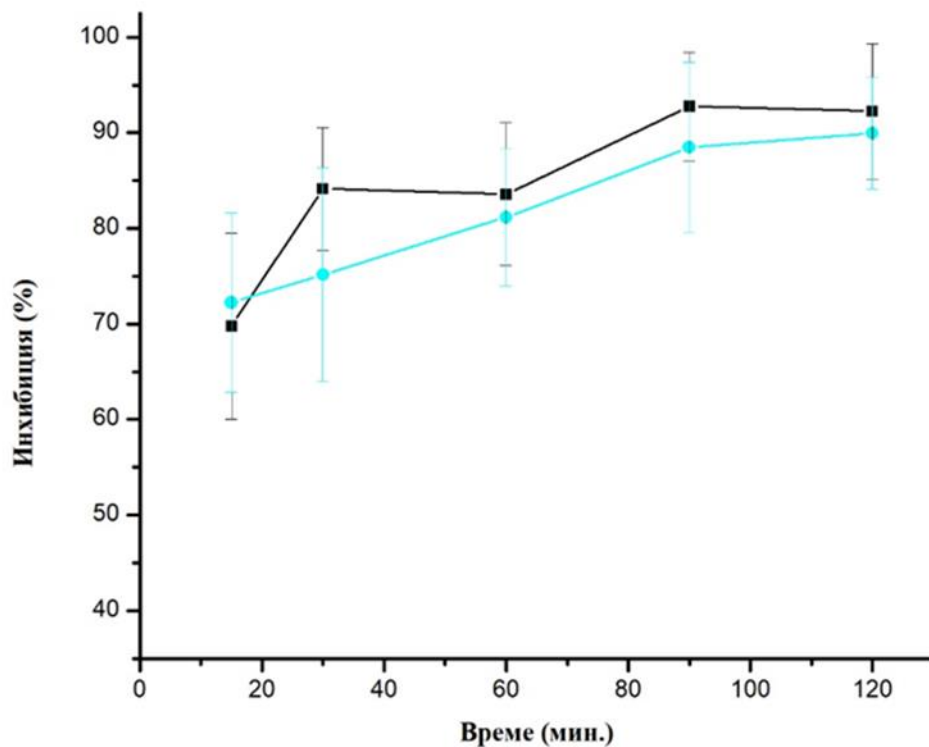
| Концентрация (мг/мл) | Инхибиране (%) на адсорбцията | | |
|-------------------------|-------------------------------|------------|------------|
| | HHV-1 (F) | HHV-2 (BA) | HHV-2 (DD) |
| 4.5 | 97.58 | 97.98 | 92.22 |
| 2 | 97.78 | 97.96 | 97.60 |
| 1.5 | 96.20 | 97.98 | 94.09 |
| 1 | 95.69 | 95.94 | 92.40 |
| 0.5 | 93.66 | 93.89 | 91.52 |
| 0.25 | 91.79 | 91.89 | 87.54 |
| 0.125 | 86.52 | 91.91 | 82.21 |
| 0.06 | 74.14 | 81.09 | 52.25 |
| 0.03 | 34.86 | 44.69 | 23.11 |
| 0.01 | 12.08 | 33.26 | 17.44 |
| 0.007 | 3.445 | 21.62 | 17.50 |

Адсорбцията при човешките херпесни вируси тип 1 и 2 се реализира чрез свързване на gC и gB с хепаран сулфат протеогликаните (HSPGs) (Spear G. et al., 1992). Един от предполагаемите молекулни механизми, на които е възможно да се дължи инхибирането на вирусната адсорбция е взаимодействието на биологично-активните вещества от извлека с HSPGs и предотвратяване на свързването на гликопротеин с тях. Взаимодействието на вирусните протеини с HSPGs опосредства адсорбцията и на други вирси ("Pellett P. & Roizman B., 2013.), като Човешки цитомегаловирус- Human betaherpesvirus 5 (Herpesviridae) (Feire A. et al., 2004; Compton T., 2004; Heldwein E. & Krumpfenach C., 2008.), Капоши Саркома асоциираният херпесвирус-Human gammaherpesvirus 8 (Herpesviridae) (Heldwein E. & Krumpfenach C., 2008), човешки папиломавируси (Papillomaviridae) (Horvath C. et al., 2010; Letian T. & Tianyu Z., 2010.), Хепатит В вирусът-Hepatitis B virus (Hepadnaviridae) (Li J. & Wands J., 2016; Schulze A. et al., 2007) и се явява важна съпка при прикрепването на вируса към клетъчната повърхност. Много е възможно водният екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. да инхибира прикрепването към клетъчната повърхност на споменатите по-горе вируси, тъй като те използват същия тип клетъчен рецептор за адсорбцията си към клетъчната мембрана както HHV-1 и HHV-2.

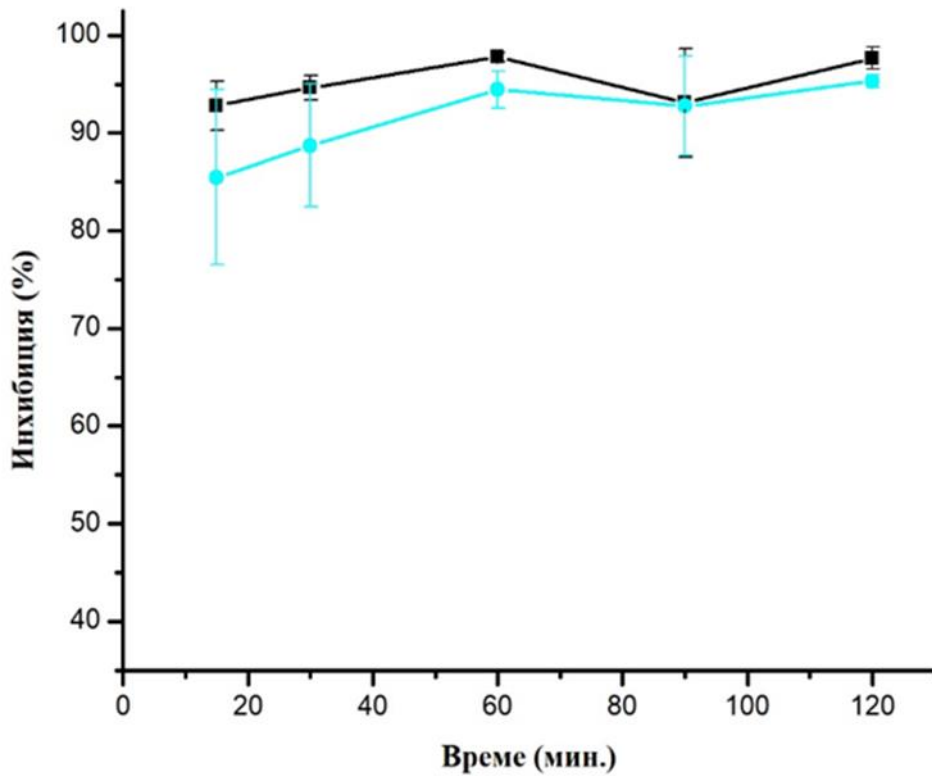
4.3.4.2. Изследване въздействието на екстракта от *N. nuda* ssp. *nuda* L. върху кинетиката на вирусната адсорбция на HHV -1 (F), HHV-2 (BA) и HHV-2 (DD) в клетката.

Екстрактът беше приложен в концентрация 4.5 мг/мл (МНК определена на 48^{-я} час) и 2мг/мл (МНК определена на 72^{-я} час). Получените резултати (фиг. 36, 37, 38 и табл. 19) за двете прилагани концентрации са близки. Още на 15^{-та} минута от контакта с вируса, екстрактът проявява действието си, като спрямо щам F ограничава със 69.78% и 72.25%, за щам BA с 92.80% и 85.47% и за щам DD със 79.16% и 85.32%, появата на

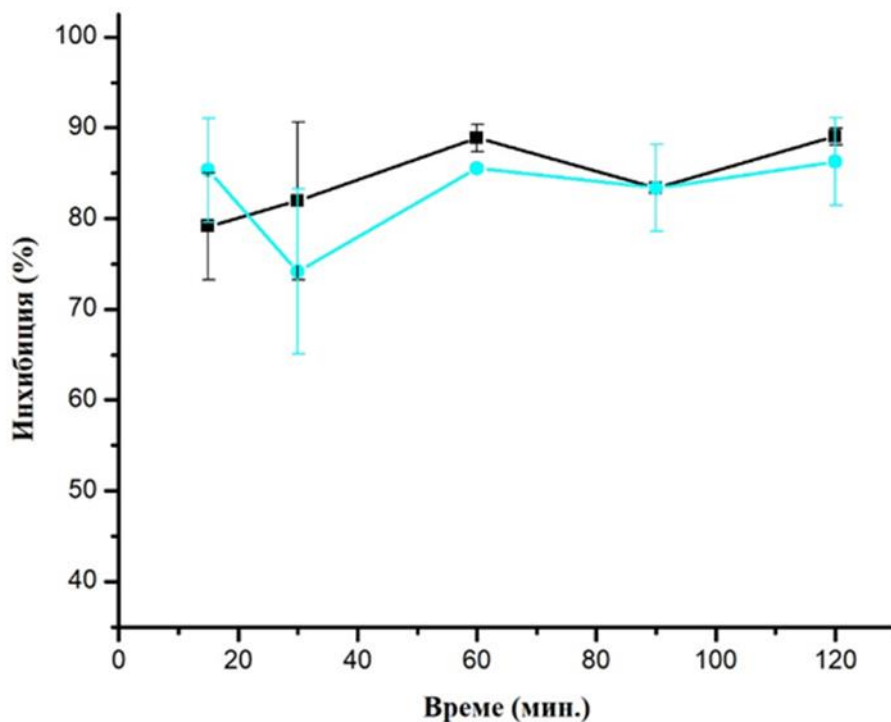
вирус индуцирани плаки в клетъчния монослой, съответно при концентрации на екстракта 4.5 и 2 мг/мл. До втория час инхибицията достига стойности от около 90% за щам DD и около 97% за щам F и ВА.



Фигура 36. Инхибиране (%) прикрепването към клетъчната повърхност на HHV-1, щам F, определено на различни времеви интервали от контакта, при концентрация на екстракта 4.5 мг/мл (—■—) и 2 мг/мл (—●—).



Фигура 37. Инхибиране (%) прикрепването към клетъчната повърхност на HHV-2, щам ВА при концентрация на екстракта 4.5 мг/мл (—■—) и 2 мг/мл (—●—), определено на различни времеви интервали от контакта.



Фигура 38. Инхибиране (%) прикрепването към клетъчната повърхност на HHV-2, щам DD при концентрация на екстракта 4.5 мг/мл (—■—) и 2 мг/мл (—●—), определено на различни времеви интервали от контакта.

Таблица 19. Данни за инхибиране (%) прикрепването на вируса към клетъчната повърхност, определена на различни времеви интервали от контакта (кинетика на вирусната адсорбция), при концентрации отговарящи на МНК, определена на 48^{-я} и 72^{-я} час.

| Време (мин.) | Инхибиране (%) на адсорбцията | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|
| | ННV-1 (F) | | ННV-2 (BA) | | ННV-2 (DD) | |
| | 4.5* мг/мл | 2# мг/мл | 4.5* мг/мл | 2# мг/мл | 4.5* мг/мл | 2# мг/мл |
| 15 | 69.785 | 72.25 | 92.80 | 85.47 | 79.16 | 85.32 |
| 30 | 84.15 | 75.13 | 94.63 | 88.72 | 81.96 | 74.18 |
| 60 | 83.55 | 81.17 | 97.76 | 94.43 | 88.88 | 85.54 |
| 90 | 92.76 | 88.5 | 93.08 | 92.78 | 83.39 | 83.39 |
| 120 | 92.26 | 89.96 | 97.64 | 95.32 | 89.03 | 86.29 |

*МНК определена на 48^{-я} час

#МНК определена на 72^{-я} час

4.3.4.3. Изследване въздействието на екстракта от *N. nuda ssp. nuda* L. върху пенетрацията на ННV -1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD) в клетката.

Водният екстракт (приложен в концентрация отговаряща на МНК определена на 48^{-я} и 72^{-я} час) не показва никакво въздействие върху пенетрацията на щам F на ННV-1, на щам BA и щам DD на ННV-2 в клетките. Същото може да се каже и за АЦВ използван като референтно вещество и приложен в МНК.

Резултатите от експериментите, изследващи действието на извлеката от *N. nuda ssp. nuda* L. върху етапа на навлизане на ННV -1 (F), ННV-2 (BA) и ННV-2 (DD) в клетката, потвърдиха изказаното от нас предположение (виж точка 4.3.3.2.2.) като се установи, че се повлиява вирусната адсорбция на клетъчната мембрана, но не и самото проникване на вируса в клетката. Това обяснява резултатите получени в точка 4.3.3.2.2. Добавянето на екстракта след вирусната адсорбция позволява протичането на вирусната репликация в заразените клетки и протектира тези, които не са заразени, а се контаминират от продуцираното вирусно потомство. При добавяне на екстракта едновременно с инокулацията на клетъчния монослой, извлекът предотвратява заразяването на клетките, които се контаминират при добавяне на извлеката непосредствено след вирусната адсорбция. Така се намалява общият брой на заразените клетки при постановката на едновременно добавяне на извлеката, в сравнение с последователното му добавяне, което корелира с установената разлика в активността на екстракта.

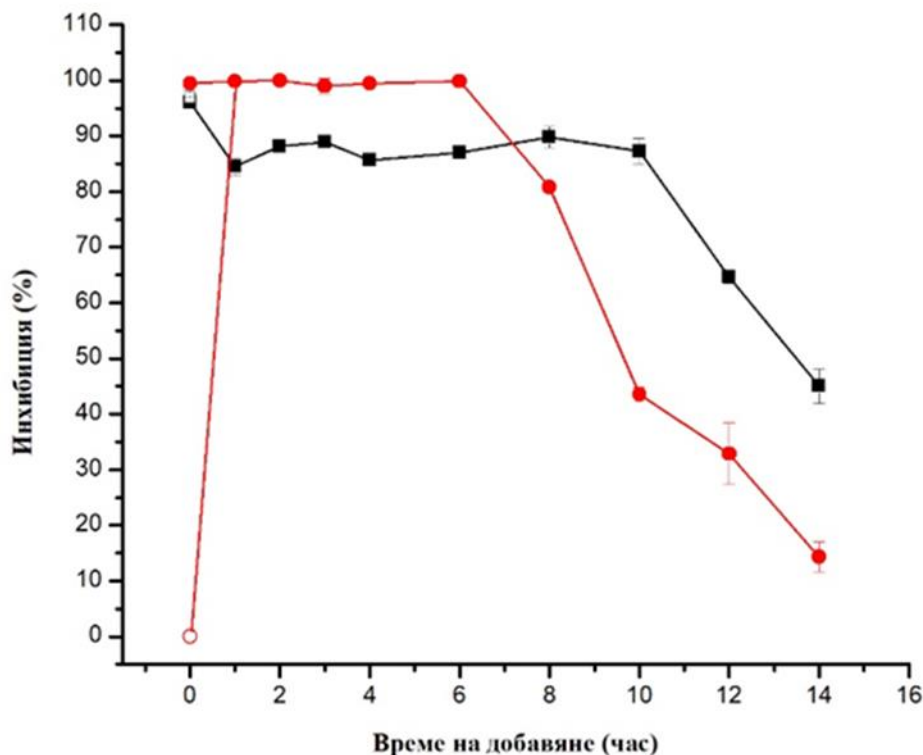
4.3.5. Определяне на кинетиката на антивирусния ефект на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. в постановка на едноциклов тест.

Целта на експеримента беше да се установи дали получените данни потвърждават резултатите, получени при теста, изследващ въздействието на екстракта върху адсорбцията на ННV и да се определи дали извлекът повлиява и друг етап от вирусния репликативен цикъл. Беше използвана само концентрация отговаряща на МНК определена на 48^{-я} час. Продължителността на експеримента беше 16 часа, отговаряща

на продължителността на репликативния цикъл на ННV-1 и ННV-2. Беше използван ацикловир като референтно вещество, приложен в МНК, определена на 48^{-я} час.

Резултатите, получени при теста за въздействие върху вирусната адсорбция при работа с щам F, са в съответствие с даните получени за 0 и 0' времеви интервали (фиг. 39; табл. 20). При тях бяха определени най-високи стойности за инхибицията (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство, съответно 96.09% и 96.76%. Това недвусмислено показва, че екстрактът пречи на прикрепването на вируса към клетката. Водният екстракт инхибира около 90% продукцията на вирусното потомство след като бъде добавен между 1 и 10 час след заразяването (фиг. 39; табл. 20). Това говори, че вероятно се повлиява транскрипцията на α - и β -гените, транслацията на кодираните от тях протеини и репликацията на вирусния геном. Действието на извлека намалява след като бъде добавен 12 часа след заразяване. Инхибицията на продукцията на инфекциозното вирусно потомство спада до 64.69% и остава ниска до края на експеримента. Тези резултати показват, че екстрактът повлиява макар и в по-слаба степен останалите етапи от вирусния жизнен цикъл, с изключение на освобождаването на вируса от клетката.

Ацикловирът, който повлиява само началния етап на вирусната репликация, показва активност само в 0 времеви интервал – 99.44%, но не и при 0' времеви интервал (фиг. 39; табл. 20). Натрупването му в клетката в активна концентрация изисква време по-голямо от времето на контакт с клетъчния монослой при 0' интервала. Ацикловирът инхибира около 99% от продукцията на вирусното потомство след като бъде добавен между 1 и 6 час след заразяване на клетъчния монослой (фиг. 39; табл. 20). Добавянето му след 8 и 10 час на заразяване намалява активността му (съответно 80.83% и 43.55%), което потвърждава верността на опитната постановка, тъй като данните са в съответствие с тези в достъпната научна литература. Ацикловирът инхибира етапа на синтеза и елонгация на вирусния геном, който започва след 6 и е най-активен до 8 час. (Whitley R., 2002), като прилагането му след този времеви интервал води до загуба на активност.



Фигура 39. Ефект върху репликацията на HHV-1, щам F при различно време на добавяне на: воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L., добавен в 0' час (—□—); добавен от 0-14 час (—■—) и АЦВ, добавен в 0' час (—○—) и добавен от 0-14 час (—●—).

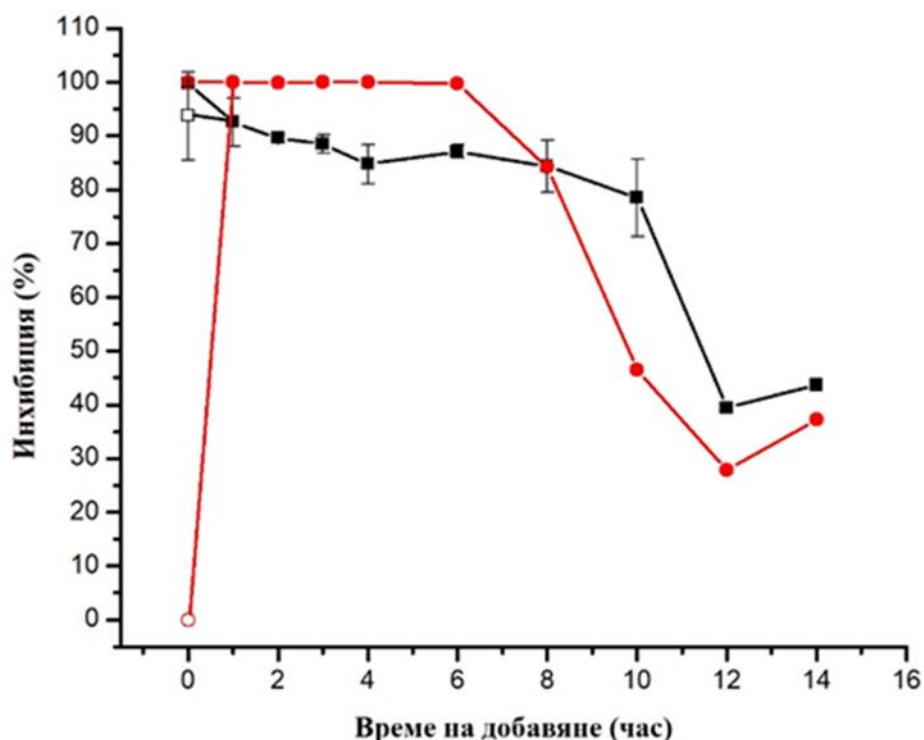
Таблица 20. Инхибиране (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство на HHV-1, щам F при различно време на добавяне на водния екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L. и АЦВ.

| Екстракт /вещество | Времени интервал (час) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | 0 | 0' | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | |
| <i>N. nuda ssp. nuda</i> | 96.09 | 96.76 | 84.49 | 88.19 | 88.93 | 85.69 | 87.03 | 89.77 | 87.29 | 64.69 | 45.05 | |
| АЦВ | 99.44 | 0 | 99.86 | 99.99 | 98.98 | 99.48 | 99.82 | 80.83 | 43.55 | 32.86 | 14.32 | |

Данните за 0 и 0' времеви интервали (фиг. 40; табл. 21) при експерименталната постановка, в която се използва щам ВА, потвърждават резултати получени при теста за въздействие върху вирусната адсорбция. Високата активност, за която се съди по стойностите за инхибицията (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство (съответно 99.70% и 93.71%), доказва въздействие на екстракта върху прикрепването на вируса към клетката. Екстрактът също въздейства и върху вътреклетъчните етапи от вирусната репликация (според стойностите за времеви интервали между 1-10 час след добавяне на извлеката), но по-слабо в сравнение с данните за 0 и 0' времеви интервали. При прилагането му на 12 час, инхибицията (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство достига 39.44%, което показва, че етапа на напускане на вируса на клетката почти не се засяга (фиг. 40; табл. 21).

Ацикловирият отново показва активност само в 0 времеви интервал (99.96%), но не и при 0' (фиг. 40; табл. 21). Резултатите за ацикловира и изводите, които могат да се направят спрямо тях са аналогични на тези за щам F – 99% инхибиция на продукцията на инфекциозното вирусно потомство при добавянето му между 1 и 6 час, което е

последвано от понижаване на активността след прилагането му на 8 и 10 час (съответно 84.19% и 46.51%) (фиг. 40; табл. 21).



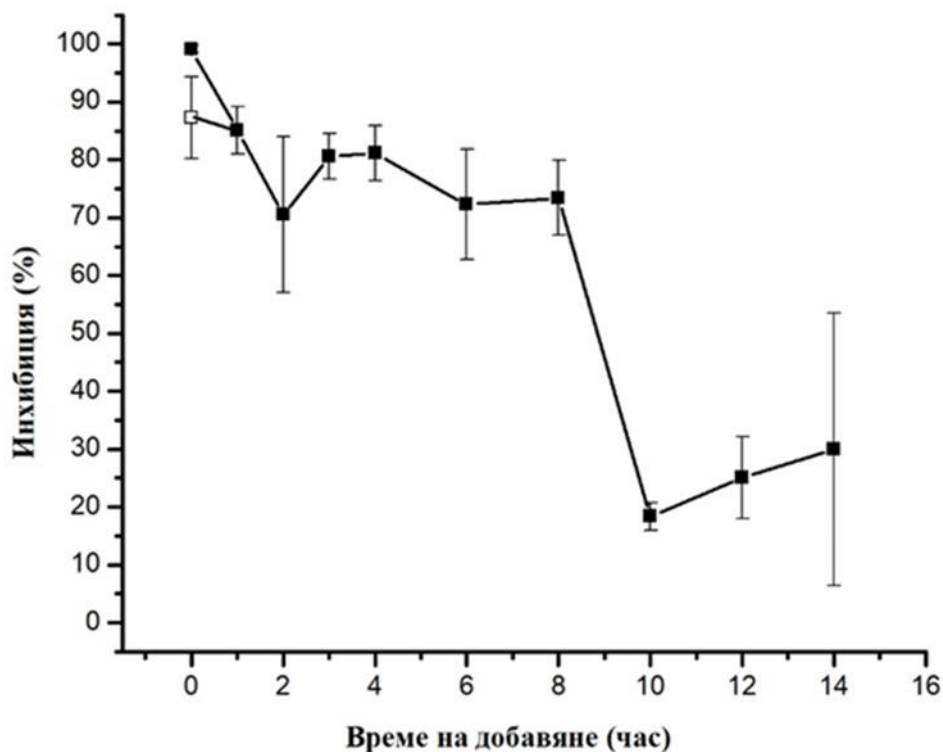
Фигура 40. Ефект върху репликацията на HHV-2, щам Ва при различно време на добавяне на: воден екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L., добавен в 0' час (—□—); добавен от 0-14 час (—■—) и АЦВ, добавен в 0' час (—○—) и добавен от 0-14 час (—●—).

Таблица 21. Инхибиране (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство на HHV-2, щам ВА при различно време на добавяне на водния екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. и АЦВ.

| Екстракт / вещество | Времени интервал (час) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | 0 | 0' | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | |
| <i>N. nuda</i> ssp. <i>nuda</i> | 99.70 | 93.71 | 92.58 | 89.55 | 88.45 | 84.71 | 87.11 | 84.36 | 78.45 | 39.44 | 43.67 | |
| АЦВ | 99.96 | 0 | 99.99 | 99.88 | 99.99 | 99.99 | 99.72 | 84.19 | 46.51 | 27.91 | 37.21 | |

Резултати при използването на щам DD са в съответствие с тези получени при работата с описаните по горе два щама. Най-високи стойности за инхибицията (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство – 99.09% и 87.28%, са определени съответно за 0 и 0' времеви интервали (фиг. 41, табл. 22), което потвърждава данните получени при теста за въздействие върху вирусната адсорбция и доказва влиянието на извлеката върху прикрепването на вируса към клетката. Водният екстракт инхибира около 80% продукцията на вирусното потомство след като бъде добавен между 1 и 8 час след заразяването. Действието му намалява след като бъде добавен 10 часа след заразяване (фиг. 41, табл. 22). Извлекът повлиява, макар и в по-слаба степен, събитията

от вирусният репликативен цикъл протичащи в клетката, с изключение на тези свързани с напускането на вируса.



Фигура 41. Ефект върху репликацията на HHV-2, шам DD при различно време на добавяне на: воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L., добавен в 0' час (□); добавен от 0-14 час (■).

Таблица 22. Инхибиране (%) на продукцията на инфекциозното вирусно потомство на HHV-2, шам DD при различно време на добавяне на водния екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L.

| Времени интервал (час) | 0 | 0' | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 |
|--------------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>N. nuda ssp. nuda</i> | 99.09 | 87.28 | 85.11 | 77.5 | 80.59 | 81.14 | 72.28 | 73.44 | 18.33 | 25.00 | 30.00 |

4.6 ЯМР – базирана метаболомика на воден екстракт от *N. nuda ssp. nuda* L.

Откриването на екстракт, какъвто е водният извлек от *Nepeta nuda ssp. nuda* L., с ясно изразно антихерпесно действие и в следствие установен етап от репликативния цикъл, върху който въздейства специфично, ни накара да потърсим метод, чрез който да се установят веществата влизащи в състава му. ЯМР-базираната метаболомика е анализ с чиято помощ много точно и бързо (изпълнението му отнема много малко време) може да се определи вида на биологично активните вещества в комплексна смес, каквато е растителния екстракт. Едно от предимствата на метода е, че чрез него могат да бъдат идентифицирани вещества, които имат много близки спектри.

Идентифицирането на съединенията беше проведено сравнявайки техния спектър (1D и 2D) спрямо този на чисти съединения (Mohamadi et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Olivier et al., 2008; Sen et al., 2016; Tagousop et al., 2017; Zahmanov et al., 2015; Wolfender et al., 2013). Резултати показаха присъствие основно на фенолни компонентни в ароматния регион (δ 5.5-9.0 ppm).

Основните фенолни киселини включваха розмаринова, хлорогенова, галова, ванилова, кафеена, протокатехинова, ферулова и канелена. Групата на флавоноидите включваше цирсимаритин, хризоериол, ванилин, рутин и кверцетин. Отчетените интензивни сигнали във въглехидратната област (δ 3.0-5.5 ppm) показаха присъствието на сукроза, α - и β -глюкоза. Сигнали за някои аминокиселини като аланин, глутамин, левцин, треонин и валин бяха идентифицирани в алифатната област (δ 0.5-3.0 ppm).

Получените от нас резултати са в съответствие с предишни такива, показващи че хидрокси-канелените киселини и особено производните на кефеената киселина като хлорогенова и розмаринова киселини са едни от най-силно разпространените вторични метаболити в растенията от род *Nepeta*. Те са най-преобладаващите в *N. nuda* subsp. *Lydiae* Davis. (Aras A. et al., 2016), както и в *N. Cataria* L., *N. Menthoides* Boiss., *N. Crassifolia* Boiss. и *N. kotschy* Boiss. (Hadi N. et al., 2017). В допълнение на това галовата, кафеената, протокатехиновата и ваниловата киселини са идентифицирани в *N. leucophylla* Benth. (Sharma A. & Cannoo D., 2016) и *N. nuda* subsp. *Lydiae* Davis. (Aras A. et al., 2016) както и в много други видове от род *Nepeta*, част от флората на различни европейски страни (Mišić et al., 2015). Кверцетинът и рутинът са мажорните вторични метаболити в дванадесет изследвани видове от род *Nepeta*. - *N. cataria* L., *N. sibirica* L., *N. pannonica* L. (Mišić D. et al., 2015) и много други (Aras A. et al., 2016; Hadi N. et al., 2017). При настоящото изследване беше установено присъствието на цирсимаритин. Това е флавоон с 5-хидрокси-6,7-диметокси А-пръстен, който се смята за хемотаксономичен маркер типичен за род *Nepeta*, заедно с друг флавоон 8-хидроксицирсмаритин (Jamzad Z. et al., 2003).

Наблюдавания ефект вероятно се дължи на комплексния химичен състав на екстракта. За повечето от съединенията му е доказан антихерпесен ефект. Протокатехиновата киселина въздейства активно върху репликацията на HHV-2, като определеният СИ е по-висок от този на ацикловира (Hassan S. et al., 2017). Розмариновата киселина проявява вирусцидна активност спрямо ацикловир чувствителни и резистентни щамове на HHV-1, и инхибира прикрепването на вируса към клетката, но не и пенетрацията (Astani A. et al., 2012; Astani A. et al., 2014). Кверцетинът и галовата киселина също проявяват антихерпесна активност, като възможния механизъм на действие включва инхибиране на извънклетъчните вириони на HHV и блокиране прикрепването към клетъчната мембрана, а също така е възможно и въздействие върху етапи от вътреклетъчната вирусна репликация (Kratz J. et al., 2008, 2008a; Chiang L. et al., 2003; Kaul T. et al., 1985). Кафеената киселина и транс-канелената киселина не проявяват вирусцидна активност и тяхното антихерпесно действие се дължи или на взаимодействие с молекули от клетъчната мембрана и блокиране на вирусната адсорбция и пенетрация (транс-канелена киселина) (Gravina H. et al., 2011) или инхибиране на етапи от вътреклетъчната репликация преди завършване на вирусната ДНК репликация (кафеена киселина) (Ikeda K. et al., 2011).

5. Изводи.

Изследвана е активността на воден и хлороформен извлек, получени от надземните части на *Artemisia chamaemelifolia* Vill. – Планински пелин, воден извлек от плода на *Sambucus ebulus* L. – Тревист бяз, три водни екстракта от плода, цвета, листата на *Sambucus nigra* L. – Дървовиден бяз, както и воден извлек, изготвен от надземните части на *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. – Гола коча билка, растящи в естествените им популационни ареали в България, спрямо репликацията на щам F на човешки алфахерпесен вирус тип 1 и щам ВА, и щам DD (резистентен към АЦВ) на човешки алфахерпесен вирус тип 2, в условия *in vitro*.

1. Водният извлек от *A. chamaemelifolia* Vill. е по-слабо токсичен от хлороформения. Извлеките от цвят и листа на *S. nigra* L. са по-слабо токсични от извлеките от плодове на *S. ebulus* L. и Дървовиден бяз. Стойностите на ЦК₅₀ за водния извлек от *N. nuda* ssp. *nuda* L. показват, че последният е с ниска токсичност. Преживяемостта на клетъчната линия намалява два пъти при удължаване на времето на контакт с екстракта.

2. Водният екстракт от *A. chamaemelifolia* проявява слаба вирусцидна активност. Хлороформеният извлек от същото растение не повлиява инфекциозността на извънклетъчните вириони. И четирите извлека на растенията от род *Sambucus* инактивират извънклетъчните вириони на щамата в различна степен. Най-активен е екстрактът от плод на Тревист бяз, докато вирусцидният ефект на извлекът от листата на *S. nigra* L. е най-слаб. Екстрактът от *N. nuda* ssp. *nuda* L. не повлиява инфекциозността на извънклетъчните вириони на щам F, ВА и DD.

3. Водният извлек от *A. chamaemelifolia* Vill. инхибира репликацията на щамовите F, ВА и DD в приблизително еднаква степен в постановка на последователното му добавяне. Активността му се повишава при добавянето му едновременно със заразяването на клетките с щам F. Данните се потвърждава от степента на редукция на инфекциозното вирусно потомство при последователно добавяне на извлека. Хлороформеният екстракт не повлиява репликацията на вирусите.

4. При последователно прилагане водните извлеци от листа и плод от Дървовиден бяз слабо инхибират репликацията на щамове F и ВА. Останалите два извлека – от плод на Тревист бяз и от цвят на Дървовиден бяз, не достигат 50 % протекция. Сравнявайки стойностите на ЕК₅₀ при двете опитни постановки, в постановка на едновременно добавяне, активността на екстракта от плода на *Sambucus nigra* L. спрямо репликацията на щам F на ННУ-1 остава непроменена. При заразяване с последния, при същата опитна постановка се повишава активността на извлеките от цвят и листа на Дървовиден бяз и от плод на Тревист бяз. Инхибиторната активност на извлеките от плод и листа на Дървовиден бяз и от плод на Тревист бяз се потвърждават от резултатите, получени от теста за редукцията на инфекциозното вирусно потомство.

5. Водният извлек от *N. nuda* ssp. *nuda* L. инхибира във висока степен репликацията на щамове F, ВА и DD приблизително еднакво в постановка на последователно добавяне. Активността му е по-изявена при добавянето му

едновременно със заразяване на монослоя с шамовете. Тази тенденция се потвърждава и чрез теста, определящ степента на редукция на инфекционното вирусно потомство.

6. Водният екстракт от *N. nuda* ssp. *nuda* L. блокира прикрепването на шамовете F, BA и DD към клетъчната повърхност във висока степен. Активност се наблюдава още на 15^{-та} минута от контакта на водният извлек с вируса. Извлекът не повлиява проникването на шамовете F, BA и DD в клетката.

7. Извлекът от Гола коча билка повлиява вътреклетъчното развитие на шамове F, BA и DD, протичащи след навлизането им в клетката. Етапът на сглобяване на дъщерните вириони и напускането им от клетката е засегнат най-слабо.

8. Чрез ЯМР-базирана метаболомика се установи наличието на голям брой вторични метаболити, принадлежащи към различни групи химични съединения.

9. Действието на екстрактите, проявяващи антивирусната активност, не е шамово специфично.

10. Водните извлеци от *A. chamaemelifolia* Vill. и *N. nuda* ssp. *nuda* L. инхибират репликацията на шам DD към който референтния инхибитор не е активен.

6. Декларация за оригиналност (Приноси).

1. За първи път са получени данни за ефектите от прилагането на воден и хлороформен извлек, получени от надземните части на *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (*Asteraceae*) – Планински пелин и воден извлек, изготвен от надземните части на *Nepeta nuda* ssp. *nuda* L. (*Lamiaceae*) – Гола коча билка, растящи в естествените им популационни ареали в България, спрямо репликацията на шам F на човешки алфагерпесен вирус тип 1, шам BA и шам DD (резистентен към АЦВ) на човешки алфагерпесен вирус тип 2, в условия *in vitro*. За два от тях е установено антигерпесно действие.

2. За първи път са получени данни за ефектите от прилагането на воден извлек от плода на *Sambucus ebulus* L. (*Adoxaceae*) – Тревист бъз и водни екстракти от плода, цвета, листата на *Sambucus nigra* L. (*Adoxaceae*) – Дървовиден бъз, растящи в естествените им популационни ареали в България, спрямо репликацията на шам F на човешки алфагерпесен вирус тип 1 и шам BA на човешки алфагерпесен вирус тип 2, в условия *in vitro*. За всички извлеци е установено антигерпесно действие.

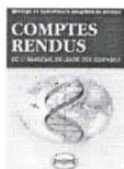
3. Водните извлеци от *A. chamaemelifolia* Vill. и *N. nuda* ssp. *nuda* L. инхибират репликацията шам DD (резистентен към АЦВ). Това ги превръща в алтернатива при лечение на инфекция с шамове на HHV-1 и HHV-2, при които терапията с АЦВ е неефективна.

7. Публикации свързани с дисертационния труд.

1. Angelova P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova, D. Todorov and S. Shishkov. 2016. Inhibition of Human Herpes Virus Type 2 Replication by water Extract from *Nepeta nuda* L. Acta Microbiologica Bulgarica, 2016, Sofia, Bulgaria, Volume 32, Issue 2, Pages 148-149.

2. Angelova P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, D. Todorov, K. Shishkova, D. Dragolova, S. Shishkov and V. Kapchina-Toteva. Antitherpes virus activity of extracts from *Artemisia*

chamaemelifolia Vill. Доклади на Българската академия на науките (Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences) (Приета за публикация – Протокол №2/27.02.2018)



ДОКЛАДИ НА БЪЛГАРСКАТА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES
Академично издателство "Проф. Марин Дринов"
ул. "Акад. Г. Бончев" бл. 6, 1113 София
Тел. 979-30-36; 971-70-65
www.proceedings.bas.bg; e-mail: comprend@bas.bg

Служебна бележка

Редакционната колегия на списание „Доклади на БАН“ дава настоящата служебна бележка на

Петя Ангелова, Антон Хинков, Венелин Цветков, Даниел Тодоров, Калина Шишкова, Даниела Драголова, Стоян Шишков, Венета Капчина-Тотева

в уверение на това, че статията

“Antih herpes virus activity of extracts from *Artemisia chamaemelifolia* Vill.”

е приета за печат в списание „Доклади на БАН“ – 2018 г. (ПРОТОКОЛ № 2/27.02.2018 г.)

Редактор:



София, 15 ноември 2018 г.

8. Съобщения свързани с дисертационния труд.

1. Hinkov, A., D. Seimenska, P. Denev, M. Kratchanova, P. Angelova, S. Shoshkov. INHIBITORY EFFECT OF EXTRACTS FROM SAMBUCUS NIGRA L. AND SAMBUCUS EBULUS L. AGAINST HSV-1 AND HSV-2. 2014. 13th Congress of Microbiologists in Bulgaria with international participation, October 7th-10th, 2014, Tryavna.
2. Hinkov, A., P. Angelova, V. Cvetkov, K. Shishkova, D. Todorov, L. Hristova, D. Dragolova, S. Shishkov, V. Kapchina-Toteva. ANTIHERPES VIRUS ACTIVITY OF EXTRACTS FROM THE MEDICINAL PLANT ARTEMISIA CHAMAEMELIFOLIA VILL., 2015. 2nd Intern. Confer. Natural Product Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, Oct. 2015, Plovdiv, Bulgaria. Book of abstracts, PP83, p. 173
3. Tsvetkov V., P. Angelova, K. Shishkova, A. Hinkov, S. Shishkov. Anti-viral activity of medical Bulgarian plants againsts Human Herpes Virus type 1 and 2. The tenth workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, November, 17-19, 2015, IEMPAM-BAS, Sofia, Bulgaria., p-3.
4. Angelova P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova. D. Todorov and S. Shishkov. 2016. Inhibition of Human Herpes Virus Type 2 Replication by water Extract from *Nepeta nuda* L. The fourth national congress of virology (Days of Virology in Bulgaria) with international participation, May, 18th-20th, 2016, Sofia, Bulgaria, p- 148-149.
5. Angelova P. A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova, D. Dragolova, V. Kapchina-Toteva and S. Shishkov. 2016. Activity of water extract from *Nepeta nuda* L. (Lamiaceae) against replication of human herpes virus type 1 (Herpesviridae). Youth scientific conference "Kliment's days", November, 17th – 18th, 2016, Sofia, Bulgaria, p-47-48.
6. Angelova P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova. D. Dragolova, V. Kapchina-Toteva and S. Shishkov. 2016. Activity of water extract from *Nepeta nuda* L. against ACV-resistant Human Herpes virus type 2. The eleventh workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, December, 14-16, 2016, IEMPAM-BAS, Sofia, Bulgaria., p-3.
7. Angelova P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, D. Todorov, K. Shishkova, D. Dragolova and S. Shishkov. 2017. Inhibition of cell attachment of Human Herpes Virus type 2 (causative agent of genital herpes) by water extract from *Nepeta nuda* L. 3rd International conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf, October 18th - 21th, Bansko, Bulgaria, p 117.
8. Angelova P., A. Hinkov, D. Todorov, V. Tsvetkov, K. Shishkova, S. Shishkov. 2018. Inhibitory effect of extracts from *Sambucus nigra* L. against Human herpes virus type 1. The XXVIII International Science Conference on Union of scientists, June, 31st May - 1st June, 2018, Stara Zagora, Bulgaria, p-57-58.
9. Todorov D., P. Angelova, A. Hinkov, V. Tsvetkov, K. Shishkova, S. Shishkov. 2018. *Sambucus ebulus* L.- inhibitory effect against Human Herpes virus type 1. The XXVIII International Science Conference on Union of scientists, 31st May - 1st June, 2018, Stara Zagora, Bulgaria, p-56.
10. Angelova P., A. Hinkov, D. Todorov, S. Shishkov, D. Dragolova, Zh. Yordanova, D. Djilianov. 2018. Anti-Herpes activity of Bulgarian endemic plants. 2nd World Congress and Expo on Traditional and Alternative Medicine, June, 14th-16th, 2018, Rome, Italy.