

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор по „Вирусология” (секция „Патология”, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН) - член на Научното жури съгласно заповед № РД 38-337/08.07.2019 г. на Ректора на СУ «Св. Климент Охридски»

Относно дисертационен труд на тема: „Антихерпесен ефект на екстракти, получени от *Artemisia chamaemelifolia* Vill., *Sambucus nigra* L., *Sambucus elubus* L. и *Nepeta nuda* ssp. *Nuda* L.”

за получаване на образователна и научна степен „ДОКТОР” в професионално направление 4.3. “Биологични науки” (Вирусология) на докторанта Петя Яворова Ангелова с научен ръководител: проф. д-р Стоян Ангелов Шишков, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

1. Актуалност и значимост на дисертационния труд

Темата на дисертационния труд е изключително актуална, доказателство за което са следните факти:

- Човешките алфахерпесни вируси тип 1 и тип 2 (HNV-1 и HNV-2) са широко разпространение при хората, достатъчно е да споменем, че с HNV-1 са заразени > 90% от жителите на планетата. Тези вируси причиняват най-често асимптомни инфекции и самоограничаващи се лезии по кожата, но могат да доведат до тежки генерализирани инфекции, менингити и енцефалити, а HNV тип 1 е най-честият причинител на инфекциозна слепота в Западния свят. Особено опасно е заразяването на новородените в хода на родилния акт, тъй като инфекцията при тях може да бъде фатална. Активирането на латентна херпесвирусна инфекция е сериозен проблем и при имunosупресирани пациенти, включително при онкоболни на химиотерапия, като може да доведе до живото застрашаващи състояния и необходимост от прекратяване на лечението.
- Наличните в момента медикаменти за овладяване на херпесните инфекции – предимно нуклеозидни аналози, са с недостатъчна ефективност и/или изразени нежелани странични ефекти. Това не е изненадващо, защото действието им зависи от активността на вирусния ензим тимидинкиназа, чиято липса или промяна (мутация) прави съответните вирусни щамове устойчиви на терапия. Достатъчно е да споменем, че негативни по отношение на тимидин киназа щамове се изолират често от HIV-позитивни пациенти. От друга страна, одобрените от Световната здравна организация ваксини не осигуряват необходимия имунизационен ефект;

- Всичко това поражда необходимостта от идентифициране на ефективни нови антихерпесни агенти с добра биологична поносимост. Особено обещаващи в това отношение са природните, в това число растителните продукти, които: а) имат комплексен състав, в който отделните биологично активни съединения може да проявяват синергичен ефект; б) притежават многоетапен механизъм на действието, ограничавайки по този начин селекцията на устойчиви щамове; в) съдържат малки по размер биологично активни молекули, които по-бързо се абсорбират и метаболизират от организма. Неслучайно 7 от 10 синтетични продукта, одобрени за приложение в медицинската практика, са разработени на базата на природни продукти;

В този смисъл изборът на докторантката и нейния научен ръководител да се насочат към изследване на потенциалната антихерпесна активност на екстракти, получени от 4 използвани в традиционната медицина растения - *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (планински пелин, сем. Asteraceae), *Sambucus nigra* L. (дъбов бъз, сем. Adoxaceae), *Sambucus elubus* L. (тревист бъз, сем. Adoxaceae) и *Nepeta nuda* ssp. *Nuda* L. (гола коча билка, сем. Lamiaceae), е напълно обоснован.

2. Преглед на дисертационния труд

Дисертационният труд е изготвен съобразно общоприетата схема. Написан е на 201 страници и обхваща: Заглавна страница (1 стр.), Съдържане (1 стр.), Списък на използвани съкращения (2 стр.), Въведение (2 стр.), Литературен обзор (68 стр.), Цели и задачи (1 стр.), Материали и методи (15 стр.), Резултати (69 стр.), Дискусия (8 стр.), Изводи (2 стр.), Справка за приносите (1 стр.), Литература (27 стр.), Списъци на научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд (4 стр.),

Техническото оформление на дисертационния труд е на високо ниво. Включените в него таблици (24 броя) и фигури (62 броя) са с отлично качество.

Още във **Въведението** докторантката умело насочва вниманието на читателите към причините, насочили я към избраната от нея тема.

Литературният обзор представя кратки исторически сведения за херпесните вируси, предизвиканите от тях заболявания и първите химиотерапевтични средства с противохерпесно действие, както и обобщени съвременни данни за съвременната класификация на херпесните вируси; морфологията на човешките херпесни вируси тип 1 и тип 2 (HHV-1 и HHV-2); репликационния цикъл на HHV-1 и HHV-2; латентната инфекция с тези вируси; индуцирания от тях имуноен отговор; патогенезата на предизвиканите от тях заболявания. Във втората част на обзора е направен кратък преглед на средствата за терапия и профилактика на инфекциите с човешки херпесни вируси, като последователно са разгледани възможностите на имуноterapiaта с имуноглобулини и ваксини; наличните в момента инхибитори на вирусната репликация със синтетичен произход (пуринови и пиримидинови аналози, пирофосфатни аналози) и с природен произход (антибиотични средства, вирусни инхибитори с животински произход, фитотерапия). Специално място е посветено на представители на българската флора с антивирусна активност, като съвсем естествено вниманието на читателите е насочено към растенията, които са обект на изследване в представения дисертационен труд.

Литературният обзор е написан на висок научен стил, но в същото време се чете с лекота. Представява интерес и е от полза за всички, които се обучават и/или работят в областта на вирусологията, инфектологията, фармакологията, фитотерапията. Обзорът показва отличната осведоменост на докторанта в областта на дисертационната тема, умението ѝ да борави с литературни източници, да обобщава и анализира. Зад подготовянето му стоят много знания, мисъл, труд, професионален интерес и любопитство, любов към избраната специалност – всички те са го превърнали не само в ценен източник на съвременна информация, но и в увлекателно четиво. Отлично впечатление прави познаването на приноса на българските учени и цитирането на техните трудове. Литературният обзор е илюстриран с 1 таблица и 13 фигури.

Целта и задачите (5 на брой) са ясно и точно формулирани, което говори за добра предварителна подготовка и организация, за прецизно обмислена стратегия при изработването на експерименталната постановка. За изпълнението им са избрани подходящи **Материали и методи**, които са подробно описани. Активността на растителните екстракти е изпитана срещу Human alphaherpes virus тип 1 (HHV-1) – щам F и Human alphaherpes virus тип 2 (HHV-2) – щам БА, както и към устойчивия към действието на ацикловир щам ДД на HHV-2. Проучването е проведено с помощта на съвременни методи за клетъчно култивиране, методи за определяне на цитотоксичност (МТТ тест, който е приет за златен стандарт при оценяване на цитотоксична активност на вещества) и вирусологични методи (за пасиране на вирусните модели, за определяне на инфекциозен вирусен титър, метод на крайните разреждания на Reed и Muench, плаковия метод на Dulbecco, модифицирания от Pauwels метод на Mosmann за провеждане на многоциклов тест за потискане на цитопатичния ефект, многоциклов тест за редуция на вирусния добив, методи за определяне на вирусцидно действие, за определяне на влиянието на изпитваните вещества / екстракти върху адсорбцията и кинетиката на вирусната адсорбция, върху пенетрацията на вируса, за определяне на кинетиката на антивирусния ефект в постановка на едноциклов тест), ЯМР-базирана метаболомика.

Получените **резултати** напълно отговарят на поставените цели и задачи и са изложени в логична последователност. Резултатите са убедителни, при получаването им са използвани необходимите контроли.

Онагледени са с 22 таблици и 49 фигури (7 от които са в края на дисертационния труд), които улесняват възприемането на експерименталните данни. Представянето на резултатите на места е съпроводено от кратко обсъждане, което спомага за по-доброто им осмисляне, запознава ни с въпросите, които си е задавала докторантката при провеждането на експериментите, с мотивите, които са я водели към всяка следваща стъпка.

Разделът **„Дискусия“** безспорно е най-сериозното изпитание за зрелостта на докторанта и умението му не просто да трупа информация, а активно да използва придобитите нови знания. Смятам, че Петя Ангелова се е справила успешно с това предизвикателство, което на свой ред говори за отлично свършената обучителна работа от страна на научния ѝ ръководител. Безпристрастно и обективно са обсъдени собствените данни за влиянието на изпитваните екстракти върху репликацията на използваните като експериментални модели човешки херпесни вируси. В хода на анализирането им авторката си задава въпросите „Как“ и „Защо“, а търсейки отговорите им намира мястото и доказва значението на получените от нея оригинални данни, обуславя приноса им в идентифицирането на безопасни нови агенти с

ефективно противохерпесно действие. Отново проличава добрата теоретична подготовка и логическото мислене на автора.

Въз основа на получените резултати са формулирани десет **извода**, както и три оригинални **приноса**, които приемам.

Списъкът с **цитираната литература** обхваща 297 заглавия, 6 от които са на кирилица. Повече от 50% от използваните литературни източници са от последните 10 години.

3. Оценка на съответствието между Автореферата и дисертационния труд

Авторефератът е изработен в пълно съответствие с дисертационния труд и представя в съкратен вариант същността на проучването, последователността на експерименталната работа, получените резултати и направените на тяхната основа изводи и приноси.

4. Публикации на докторанта по темата на дисертационния труд

Петя Ангелова е първи автор на две публикации, едната от които е в списание с импакт фактор. Получените резултати са представени на десет научни форума, единият от които в чужбина (Италия).

5. Критични бележки и коментари, въпроси към докторанта

Нямам забележки по същество.

В раздел „Материали и методи“ не е упоменат методът, чрез който е проведен статистическият анализ на експерименталните данни.

Макар и рядко, в текста се откриват и някои правописни грешки – най-често замяна на пълен с непълен член или обратно, пропуснати запетайки, поставяне на точка в края на заглавието и др.

Посочените пропуски и технически грешки по никакъв начин не намаляват качествата на дисертационния труд.

Към докторанта имам следните три въпроса:

1. Кои са основните предизвикателства при изпитването на биологичната (антивирусната) активност на продукти от растителен произход? Възможно ли е да бъдат преодолени и как може да стане това?
2. Трябва ли да продължат проучванията върху изолираните от изпитваните растения екстракти и в каква посока трябва да стане това?
3. Известно е, че много от биологично активните молекули, за които е установена антивирусна активност *in vitro*, се оказват много по-слабо ефективни при провеждане на тестове *in vivo*. На какво се дължи това „разминаване“ и как може да повишим „достоверността“ на изследванията *in vitro*?

6. Лични впечатления от докторанта

По време на обучението си в магистратурата по „Вирусология“, Петя Ангелова беше моя студентка; професионалните ни контакти продължават и до днес. Петя ме впечатли със своята любознателност, с будния си ум, с чувството за отговорност, с всеотдайността и упоритостта, с които върви по избрания от нея път. Със задоволство бих искала да отбележа сериозният напредък, който Петя е отбелязала през последните

няколко години – усвоените биомедицински познания и практически умения в областта не само на вирусологията, но и на фитохимията/фитотерапията, експерименталната фармакология.

7. Заключение

За първи път са получени данни за антивирусната активност (влиянето върху вирусната репликация) на 7 екстракта (водни и хлороформни извлеци) от *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (планински пелин, сем. Asteraceae), *Sambucus nigra* L. (дъбов бъз, сем. Adoxaceae), *Sambucus elubus* L. (тревист бъз, сем. Adoxaceae) и *Nepeta nuda* ssp. *Nuda* L. (гола коча билка, сем. Lamiaceae) по отношение на култивирани в лабораторни условия човешки херпесни вируси HHV-1 и HHV-2 (включително устойчиви към действието на Ацикловир щамове). Актуалната тема, получените оригинални резултати и успешното им популяризиране, безспорните приноси в областта на вирусологията, експерименталната фармакология и фитотерапията и, не на последно място – израстването на докторанта като способен и перспективен млад учен, заслужават най-висока оценка. Всичко това ми дава основание да смятам, че дисертационният труд отговаря напълно на Закона за развитие на академичния състав в Република България, както и на правилника за неговото приложение в СУ „Св. Кл. Охридски”, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на Уважаемото Научно жури да присъдят на Петя Яворова Ангелова образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. „Биологични науки” (Вирусология).

07. 10. 2019 г.

.....
/проф. Р. Александрова, доктор/