



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
ЛАБОРАТОРИЯ „ВИРУСОЛОГИЯ“



Венелин Венциславов Цветков

**Изследване въздействието на физични и
биологични фактори върху реализацията на
херпесни вируси**

Автореферат
на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „доктор“
Професионално направление 4.3 Биологични науки
(Вирусология)

Научен ръководител:
Проф. д-р Стоян Ангелов Шишков
София 2022

Съдържание

1. Въведение	4
2. Цел и задачи	6
2.1. Цел.....	6
2.2. Задачи.....	6
3. Материали и методи	7
А. Изследване въздействието на растителни екстракти върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесен вирус тип 1, щам F и ацикловир резистентен херпесен вирус тип 2, щам DD.....	7
1. Материали.....	7
2 Методи	10
2.4. Определяне въздействието на изследваните екстракти върху репликацията на HSV-1 и HSV-2. Изследване преживяемостта на заразени със съответните вирусни щамове и третирани с изследваните екстракти клетки	13
Б. Определяне степента на протекция на лични препдазни средства чрез прилагане на модифициран VFE метод.	15
1. Материали	15
2. Методи.....	16
В. Ефект на активирана чрез плазмен източник хранителна среда и дестилирана вода върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV- 1	17
1. Материали	17
2. Методи:.....	19
4. Резултати.....	27
А. Изследване въздействието на растителни екстракти върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесен вирус тип 1, щам F и ацикловир резистентен херпесен вирус тип 2, щам DD.....	27
1. Изследване антивирусната активност на екстракти получени от <i>in vivo</i> култивирани представители на <i>Vaccinium vitis-idaea L.</i>	27
2. Установяване на ефективността на екстракти получени от <i>in vivo</i> култивирани представители на вид <i>Astragalus glycyphyllos L.</i>	35
Б. Определяне степента на протекция на лични препдазни средства чрез прилагане на модифициран VFE метод.	40
В. Ефект на активирани чрез плазмен източник хранителна среда и дестилирана вода върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV- 1 щам F.....	40
1. Изследване на цитотоксичното въздействие на третирана с използваната нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма хранителна среда.	40
2. Изследване въздействието на третирана с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма среда върху репликацията на HSV-1 (щам F).....	44

3. Изследване въздействието на третирана с нискотемпературната неравновесна газоразрядна плазма дестилирана вода върху извънклетъчните вируси на HSV-1, щам F	45
4. Определяне на тип и количество активни форми на кислород (ROS) продуцирани под въздействието на нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма	49
5. Заключение	56
6. ИЗВОДИ	57
7. Декларация за оригиналност (Приноси).....	61
8. Публикации свързани с дисертационния труд.....	62

1. Въведение

Представителите на семейство *Herpesviridae* са едни от най-разпространените вируси в природата. Изолирани от всички гръбначни животни, те предизвикват заболявания, протичащи с различна сила и клинична картина – от безсимптомни инфекции и самоограничаващи се по кожата лезии, до тежки генерализирани инфекции, менингити, енцефалити и злокачествени новообразувания. Сред над 90-те представители на семейство *Herpesviridae* човешките херпес вирусни патогени са девет на брой: Human alphaherpesvirus 1 (HSV-1); Human alphaherpesvirus 2 (HSV-2); Human alphaherpesvirus 3 (VZV); Human betaherpesvirus 5 (CMV); Human betaherpesvirus 6A; Human betaherpesvirus 6B; Human betaherpesvirus 7 (HHV-7); Human gammaherpesvirus 4 (EBV) и Human gammaherpesvirus 8 (KSAV), разпределени в три подсемейства: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae и Gammaherpesvirinae. От съществено значение за човешката патология са HSV-1 и HSV-2, които са и обект на изследване в настоящия дисертационен труд..

HSV-1 и HSV-2 поразяват човечеството от векове и са причина за скрити пандемии от лабиален и генитален херпес. Първичната HSV инфекция се осъществява до 5 - годишна възраст и обикновено е асимптоматична. По последни данни над 536 млн. души по света са заразени с HSV – 2 (генитален херпес) като ежегодно новозаразените са над 23,6 млн. души. В световен мащаб най-силно засегнатия от HSV-2 регион е на суб-Сахарна Африка. Серопревалентността в тези региони достига до над 80% от населението над 35 годишна възраст. В някои части на света серопревалентността на HSV-1 е над 90% [8]. Още по-обезпокоителен е и фактът, че в 80% от случаите вирусът се предава при отсъствие на кожни лезии или други симптоми. Този феномен е известен като “асимптомно вирусно предаване”. Рисков контингент за ново заразяване са новородените, при които инфекцията може да е фатална, като по данни на СЗО за 2011 година подобни рискови раждания са били 1 на всеки 3000 случая в САЩ. Друго социално значимо заболяване свързано с HSV 1 е херпессимплексният кератит. HSV-1 е най-честият причинител на слепота в Западния свят. Само в САЩ годишно се съобщават за 300 000 нови случая на очна инфекция причинена от HSV 1.

В борбата с херпесните инфекции се прилагат различни медикаменти, като с най-широко приложение са нуклеозидните аналози, които предизвикват дефекти в репликацията на вирусната нуклеинова киселина. 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. Сред създадените голям брой силно активни лекарствени препарати съществуват такива, които оказват множество странични, нежелани ефекти върху организма. Затова все по-голям интерес представляват фитопродуктите, т.е. биологично активни вещества, съдържащи се в растенията. Те се понасят много добре от човешкия организъм и често са по-слабо токсични. Лечебните растения съвсем не са загубили своето значение, въпреки увеличаването на относителния дял на синтетичните препарати. Тоталните растителни екстракти, поради факта, че съдържат повече от едно биологично активно вещество, имитират комбинирана терапия с няколко синтетични препарати (основен подход за преодоляване на появата на лекарствена резистентност).

Развитието на технологиите дава възможност да се изследват реакциите на организма при прилагането на различни иновативни терапии и да се проследи въздействието на технологиите върху вирусни и бактериални инфекции *in vitro* и *in vivo*. Технологиите, базирани на плазма, заемат все по-голямо място в иновативните методи за лечение. Една от най-бързо развиващите се области в плазмената технология е така наречената плазмена медицина, нововъзникваща област на медицината, в която се използва способността на неравновесните плазми да инициират, контролират и катализират различни сложни поведения и реакции в биологичните системи. Неравновесните плазми са неразрушителни за тъканите, безопасни и ефективни при въздействие върху бактериални и вирусни патогени.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване въздействието на растителни екстракти и третиран с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма разтвори, върху репликацията и извънклетъчните вириони на херпесни вируси. Определяне степента на протекция на лични препдазни средства.

2.2. Задачи

За изпълнение на поставената цел бяха набелязани следните задачи:

2.2.1. Изследване въздействието на растителни екстракти върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесен вирус тип 1, щам F и ацикловир резистентен херпесен вирус тип 2, щам DD

2.2.1.1. Установяване преживяемостта на клетки от клетъчна линия MDBK при въздействието им с растителни екстракти. Определяне на стойностите на МНК и ЦК₅₀.

2.2.1.2. Определяне въздействието на изследваните екстракти върху репликацията на HSV- 1 и HSV-2. Изследване преживяемостта на заразени със съответните вирусни щамове и третиран с изследваните екстракти клетки.

2.2.1.3. Определяне на въздействието на екстрактите спрямо извънклетъчните вириони.

2.2.2. Определяне степента на протекция на лични препдазни средства чрез прилагане на модифициран VFE метод.

2.2.2.1. Определяне на вирус филтрираща ефективност.

2.2.3. Ефект на активирана чрез плазмен източник хранителна среда и вода върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV- 1, щам F

2.2.3.1. Изследване на цитотоксичното въздействие на третирана с използваната нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма хранителна среда.

2.2.3.2. Определяне преживяемостта на заразени с вирус клетки и третиран с активирана с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма хранителна среда, чрез МТТ тест.

2.2.3.3. Изследване на въздействието на нискотемпературната неравновесна газоразрядна плазма върху извънклетъчните вириони.

2.2.3.4. Определяне на тип и количество активни форми на кислород (ROS) продуцирани под въздействието на нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма

3. Материали и методи

А. Изследване въздействието на растителни екстракти върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесен вирус тип 1, щам F и ацикловир резистентен херпесен вирус тип 2, щам DD

1. Материали

1.1 Клетъчна линия

Всички експерименти бяха проведени с монослойна епителоподобна клетъчната линия Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK). Произходът на упоменатата клетъчна линия е от бъбрек на бик (*Bos. taurus.*). Клетъчната линия поддържа продуктивна инфекция, при високи инфекциозни дози на HSV, което я прави подходяща за обработка и анализ на получените експериментални данни.

1.2. Хранителни среди

Клетките от линия MDBK бяха култивирани в среда (избрана от каталог за съответната клетъчна линич) Eagle's MEM (Dulbecco modified) – DMEM (Biochrom), обогатена с FBS –

8% за растежната и 4% за поддържащата хранителна среда, антибиотик (Gentamycin 0.008 мг/мл) и 10 mM HEPES. Киселинността на средата беше коригирана със 7% разтвор на NaHCO₃ и 1% разтвор на HCL.

1.3 Вирусни модели

При проведените от нас експерименти са използвани първи тип на Вирус Херпес Симплекс (HSV-1), щам F и втори тип на Вирус Херпес Симплекс (HSV-2), щам DD, който е ацикловир резистентен. Вирусите са култивирани в 24-часова монослойна култура на клетъчна линия MDBK с поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS.). За целта в пластмасови матраци за клетъчно култивиране (Orange Scientific) с площ 25 cm² се разлива 15 мл клетъчна суспензия с гъстота на клетките 1,5x10⁵ кл/мл След формиране на плътен монослой (най-често след 24 часа) в културата бяха инокулирани 0.2 мл неразредена вирусна суспензия. След 1 час адсорбция на стайна температура бяха добавяни 15мл поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS.). Матраците бяха инкубирани в термостат (Memmert) при температура 37°C. Цитопатичният ефект (ЦПЕ), предизвикан от вируса, се отчита ежедневно. При обхващане на 90-100% от клетъчния монослой – най-често след 24-я час – матраците бяха замразявани. След еднократно замразяване и размразяване, полученият вирусен сток беше титриран и разпределен в епендрофки, съхранявани при температура -70°C в хладилна камера.

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

Разтворът (с концентрация 5 мг/мл) беше приготвен, като 5 мг суха субстанция МТТ беше разтворен в 1 мл PBS, след което беше филтриран през Милипоров филтър (размер на порите 0.22µm) и съхраняван при - 20°C до момента на употребата му. Лизиращ разтвор за МТТ теста – DMSO (диметилсулфоксид).

1.4 Растителни екстракти

1.4.1. Екстракти получени от *in vivo* култивирани представители на *Vaccinium vitis-idaea L.*

В настоящия дисертационен труд бяха изследвани екстракти от плодовете на диворастяща червена боровинка *Vaccinium vitis-idaea L.* (сем. *Ericaceae*) Използваните

плодове бяха събрани през месец септември 2018 г. от: Стара планина (м. Беклемето) и Родопи (х. Перелик). Плодовете бяха събирани от предварително маркирани растения в средата на характерния за съответния район беритбен период и бяха транспортирани до лабораторията в рамките на 24h. След сортиране за отстраняване на неузрели, презрели или наранени екземпляри, плодовете бяха замразени в течен азот, стрити в мелница (TussueLiser, QIAGEN) и лиофилизирани (CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus).

Получени бяха общо шест извлека- тотален метанолов екстракт (базов екстракт), фракция В (фенолни киселини, флавоноиди) и фракция С (антоциани). Видът на екстрактите е представен в **таблица 1**.

Таблица 1. Описание и съкратено наименование на екстрактите.

Вид на растението	Семейство	№	Разтворител	Обем (мл)	Маса (g)	Конц. (mg/мл)	Съкратено наименование
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	<i>Ericaceae</i>	1	DMS.O	1.8	1.824	1013.3	S.t.pl. Total
		2	DMS.O	1.9	1.969	1036.3	Rod. Total
		3	DMS.O+MET	1.1+1.1	1.027	466.8	S.t.pl.B
		4	DMS.O+MET	0.9+0.9	0.934	518.9	Rod B
		5	DMS.O+MET	1.3+1.3	1.298	499.2	S.t.pl.C
		6	DMS.O+MET	1.4+1.4	1.402	500.7	Rod C

Извлеките от *Vaccinium vitis-idaea* L. бяха предоставени от гл. ас. д-р Ивайла Динчева - Агробиоинститут, София.

1.4.2. Екстракти получени от *in vivo* култивирани представители на *Astragalus glycyphyllos* L.

В настоящия дисертационен труд беше изследван метанолов обезмаслен екстракт от надземната част на *Astragalus glycyphyllos* L. Растителният материал беше събиран през месец юни 2017 г. от находище във Витоша през фаза на цъфтеж. В Хербариума на ИБЕИ, БАН е депозиран образец с № SOM-1400.

Екстрактът беше предоставен от проф. И. Кръстева от Фармацевтичният факултет към Медицинският университет – София.

2 Методи

2.1. Субкултуриране на клетъчната линия

Средата, в която клетките са култивирани се отлива (изтегля) и изхвърля. Монослоят беше промиван трикратно с фосфатно солеви буфер (PBS) или физиологичен разтвор без Ca^{2+} и Mg^{2+} или EDTA, за 1-2 минути, като съдът се разклаща, след което разтворът се изхвърля. Добавян беше дисоцииращ разтвор на трипсин-версен, temperиран предварително на 37°C . След 3-10 мин., когато клетките са напълно отделени, дисоцииращият разтвор се изтегля. Добавян беше малък обем растежна хранителна среда DMEM и клетките бяха ресуспендирани. Клетките от суспензията се преброяват и се довеждат до определен обем с плътност $1,5 \times 10^5$ кл/мл, след което бяха разливани в матраци (Orange Scientific) или плаки за клетъчно култивиране. Клетките бяха инкубирани в термостат при температурта 37°C .

2.2. Установяване преживяемостта на клетки от клетъчна линия MDBK при въздействието им с растителни екстракти. Определяне на стойностите на МНК и ЦК₅₀

Цитотоксична концентрация 50 (ЦК₅₀) се дефинира като концентрацията на изследваното вещество, при която настъпва 50% деструкция на клетките в резултат на токсичното действие на веществото.

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

За определяне на ЦК₅₀ и МНК бе използван МТТ методът, описан от Mosmann. Преди 20 години Tim Mosmann предлага да се използва тетразолиевата сол 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) за определяне на клетъчната жизнелост. МТТ е водно-разтворима тетразолиева сол, придаваща жълтеникав цвят на разтвора. Поставен в клетъчната среда, МТТ преминава в клетъчния цитозол, достига до митохондриите и с помощта на митохондриалните дехидрогенази настъпва откъсване на тетразолиевия пръстен и превръщане на разтворимата жълта сол в неразтворим във вода формазанов продукт със син цвят. Способността на клетките да редуцират МТТ е показател за митохондриалната цялост и активност, което би могло да се интерпретира като мярка за

жизненост и/или клетъчна численост. За да бъде измерено количество на формазана клетките се обработват с разтвор, който ги лизира и едновременно с това разтваря сините кристали. Количеството на последните се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната от 540 nm. Мъртвите клетки не участват в това превръщане, поради нефункциониране на митохондриите им. Количеството на трансформираният МТТ до неразтворими формазанови кристали е правопропорционално на броя на живите клетки и дава информация за клетъчната жизненост. За определяне на токсичността на изследваните от нас екстракти беше използван следният работен протокол:

След преброяването на клетките, последните бяха ресуспендирани в растежна хранителна среда DMEM (с 8% FBS), последвано от разсяване на клетъчните суспензии, с концентрация $1,5 \times 10^5$ кл/мл, в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific), по 0.2 мл за ямка. В крайните редове и колони понякога се получава намаляване на обема при по-дълготрайно култивиране и в тях не бяха посявани клетки. Там беше накапван само физиологичен разтвор. Когато клетъчният монослой достигне между 90 – 100% конfluентност (обикновено след 24 часа), надстоящата течност беше отдекантирана и прибавена по 0.1 мл поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS) и по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания за всяко вещество. С всяко едно разреждане на веществото бяха накапвани поне 3 ямки. В няколко ямки се накапва само хранителна среда без вещество (по 0.2 мл) и служат за клетъчна контрола. Тъй като използваният обем вещество (с дадена концентрация) при накапване в ямката се разрежда два пъти, реалната концентрацията на всяко добавено разреждане е два пъти по-ниска от предварително приготвената. Така обработената плака се инкубира в термостат (Memmert) при температура 37°C в продължение на 72 часа. В края на третия ден във всяка ямка (с изключение на крайните редове и колони) се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МТТ (като крайната му концентрация в ямката става 0,5 мг/мл), след което плаката се инкубира в термостат (Memmert) при 37°C в продължение на 30 мин. Хранителната среда, с разтвореният в нея МТТ, след инкубацията се отстранява, след което се добавят 0.2 мл лизиращ разтвор. Така обработената плака се отчита спектрофотометрично при 540 nm с помощта на ELISA reader Multiscan MX. Клетъчната преживяемост се определя като процент на живите клетки в ямките, третирани с различни концентрации от изследваното вещество в сравнение с контролните нетретирани с вещество клетки. За целта се използва следната формула:

$$\begin{array}{l} \text{A540 оптична плътност на} \\ \text{третираните клетки} \\ \text{\% клетъчна} \quad = \text{-----} \times 100 \\ \text{преживяемост} \quad \text{A540 оптична плътност на} \\ \text{контролите} \end{array}$$

От построената крива “доза (концентрация) на веществото - клетъчна преживяемост” се изчисляват ЦК₅₀ и МНК.

2.3. Определяне на инфекциозен вирусен титър

2.3.1. Метод на крайните разреждания по Reed-Muench (Reed & Muench, 1938):

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда DMEM (с 8% FBS). Следваше разсяване на клетъчните суспензии, с концентрация $1,5 \times 10^5$ кл/мл, в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific) (по 0.2 мл за ямка). Непосредствено преди работа се изготвят падащи десетократни разреждания на вирусната суспензия в поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS). При достигане на 90 – 100% конfluентност на монослоя (обикновено след 24 часа), надстоящата течност във всяка ямка се отдекантира. Клетъчният монослой в ямките се заразява с предварително приготвените десетократни разреждания на вируса. Обема на инокулума за една ямка е 0.1мл. С всяко едно разреждане на вируса се заразяват по 4 ямки. В четири ямки се накапва само хранителна среда и служат като клетъчна контрола. Вирусът адсорбира един час в термостат (Memmert) при температура 37°C, след което към всяка ямка се добавя по 0.1 мл поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS). Така обработена плаката се инкубира в термостат при температура 37°C. Резултатите се отчитат микроскопски на 48-ия час от инфектирането на клетките. Инфекциозният вирусен титър се определя по наличието или липсата на вирусен цитопатичен ефект и се изчислява по следната формула:

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

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

2.4. Определяне въздействието на изследваните екстракти върху репликацията на HSV-1 и HSV-2. Изследване преживяемостта на заразени със съответните вирусни щамове и третирани с изследваните екстракти клетки.

Антивирусното действие на изследваните екстракти се определя чрез разработения от Mosmann МТТ тест и модифициран от Pauwels, Takeuchi, Sudo за бърз скрининг на съединения за антивирусно действие.

Под влияние на цитопатичното действие на вируса, клетките загиват. Определянето на клетъчната жизнестойност, чрез МТТ – тест на заразени с вирус и третирани с вещество клетки, е показателно за антивирусното действие на използваното вещество. От представените в литературата данни, отчитането на антивирусното действие трябва да става, когато отношението на абсорбцията на вирусната контрола спрямо абсорбцията на клетъчната контрола е по-малко или равно на 0.2 (80% инхибиране на формирането на формазанови кристали в съответната клетъчна линия, заражена с вирус). За адаптиране на метода към използваната от нас клетъчна линия, предварително беше определено времето, за което се достигат описаните по-горе стойности при заразяване на клетките с различна вирусна доза. За определяне на антивирусната активност на изследваните от нас екстракти се използва следният работен протокол:

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда DMEM (с 8% FBS). Следва разсяване на клетъчните суспензии в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific) при концентрация на клетките $1,5 \times 10^5$ кл/мл, по 0.2 мл за ямка. В крайните редове и колони се накапва само физиологичен разтвор. Когато клетъчният монослой достигне между 90 – 100% конфлуентност (обикновено след 24 часа), надстоящата течност във всяка ямка се отдекантира. Следва заразяване на клетъчния монослой. Обемът на инокулама за ямка е 0.1 мл, при работна доза 100 ТКИД₅₀. В няколко ямки (поне три) се накапва по 0.1 мл поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS.) служат като клетъчна контрола. Вирусът адсорбира за един час в термостат при температура 37оС. По време на вирусната адсорбция се приготвят разреждания на изследваните вещества. След изтичане на времето за вирусната адсорбция плаката се обработва както следва:

- Контрола клетки (незаразени с вирус и нетретирани с вещество клетки) – към ямките определени за клетъчна контрола (поне три) се накапват по 0.1 мл поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS).
- Контрола вирус (заразени с вирус и нетретирани с вещество клетки) – към ямките определени за вирусна контрола (поне 3) се накапва по 0.1 мл поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS).
- Заразени с вирус и въздействани с вещество клетки – в ямките се накапва по 0.1 мл от предварително приготвените разреждания на изследаните екстракти, като с всяко разреждане се накапват поне три ямки.

При интерпретиране на резултатите трябва да се има в предвид, че концентрацията на всяко добавено разреждане е два пъти по-ниска от предварително приготвената. Така обработената плака се инкубира в термостат при температура 37°C в продължение на 5 – 6 дни (в зависимост от развитието на цитопатичният ефект във вирусната контрола).

Във всяка ямка (с изключение на крайните редове и колони) се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МТТ (като крайната му концентрация в ямката става 0,5 мг/мл), след което плаката се инкубира в термостат (Memmert) при 37°C в продължение на 30 минути. Хранителната среда, с разтворения в нея МТТ, след инкубацията се отстранява и се добавя 0.2 мл от лизиращия разтвор. Така обработената плака бе отчитана спектрофотометрично при 540 nm с помощта на ELISA reader Multiscan MX.

Активността на веществото се изразява като процент протекция (преживяемост) на клетките и се определя по следната формула:

$$\frac{[\text{ODB} - \text{ODKB}]}{[\text{ODKKл.} - \text{ODKB}]} \times 100 (\%), \text{ където:}$$

ODB – абсорбция на заразените и третирани с вещество клетки

ODKB – абсорбция на заразените с вирус клетки (вирусна контрола без вещество)

ODKKл. – абсорбция на незаразени и не третирани с вещество клетки (клетъчна контрола).

За достоверността на експеримента от значение е в клетъчната контрола да няма поява на цитопатичен ефект и отношението на абсорбцията на вирусната контрола спрямо абсорбцията на клетъчната контрола да е по-малко или равно на 0,2. Като референтен инхибитор се използва ацикловир.

2.5. Определяне на ИК₅₀ и СИ

Инхибиращата концентрация 50 (ИК₅₀) е концентрацията на изследваното вещество, която инхибира с 50% вирусната репликация. При изчисляването на ИК₅₀ се взимат предвид данните от микротитрационния МТТ тест. ИК₅₀ се определя директно от кривата “доза–отговор”. Селективен индекс (СИ) бе изчислен по формулата:

ИК₅₀ / ЦК₅₀ където:

ИК₅₀ – Инхидираща концентрация 50

ЦК₅₀ – Цитотоксична концентрация 50

2.6. Определяне на въздействието на екстрактите спрямо извънклетъчните вириони

Въздействието върху извънклетъчните вириони беше определено чрез директен контактен метод. Равни обеми (по 0.25 мл) неразредена вирусна суспензия и поддържаща хранителна среда с екстрактът в МНК, при контрола от равни обеми неразредена вирусна суспензия и поддържаща хранителна среда (без екстракт), се инкубират на 37°C за 5 мин., 15 мин., 30 мин., 60 мин., 120 мин. и 240 мин. В края на всеки времеви интервал пробите и контролите се замразяват, размразяват и се определят титрите им по метода на Рийд и Менч.

Б. Определяне степента на протекция на лични предпазни средства чрез прилагане на модифициран VFE метод.

1. Материали

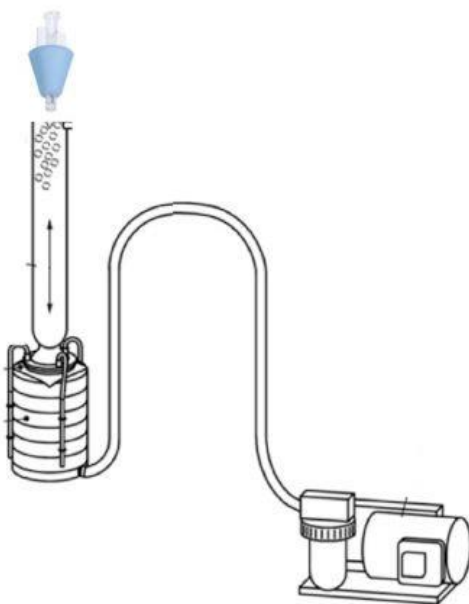
1.1 Шест степенен каскаден импактор на Андерсен

Шест степенен каскаден импактор на Андерсен, модел FSC-A6 произведен от Nonri Airclean Technology Co., LTD, с допълнително модифициран първи сегмент за по-добро уплътняване на ръбовете на тествания материал. Всеки от сегментите на импактора има прогресиращо, намаляващи отвори (от 1.18мм до 0.25мм) , симулиращи размера на алвеолите в човешкия бял дроб.

2. Методи

2.1 Вирус филтрираща ефективност (ВФЕ)

Метода е базиран на EN 14683:2019 + AC:2019. Филтриращата ефективност беше измерена на обект HSV 1 и клетъчна линия MDBK. Вирусната съспензия се трансформира в аерозол чрез MAD небулайзер при всеки тест. Използваната концентрация от 3×10^6 инфекциозни дози $50 (CCID_{50})$ в 3мл DMEM за 120 секунди. Получения аерозол се всмуква в системата през отвор в най-горния сегмент на шест степенния каскаден импактор на Андерсен, с поставено тестово петри на вси сегмент. Скоростта на въздушния поток се поддържа на 28.3 л/мин. Получени са проби, както и позитивни контроли по метода на ВФЕ. Направена бе негативна контрола без присъствие на вирус във въздушения поток, с цел да се определи присъстват ли допълнителни елементи повлияващи ефективността на постановката. Филтриращата ефективност се калкулира чрез определяне на вирусния титър на вси сегмент от импактора на Андерсен използвайки метода на Рийд и Менч.



Фигура 1. Схематично изображение на опитна постановка за вирус филтрираща ефективност

В. Ефект на активирана чрез плазмен източник хранителна среда и дестилирана вода върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV- 1

1. Материали

1.1 Плазмен източник:

При всички проведени експреименти беше използван повърхнинновълнов разряд в аргон при атмосферно налягане. Плазмата се създава от повърхнинна електромагнитна вълна с честота 2,45 GHz, проток на газа 5 л/мин в кварцова тръба с външен диаметър 8 мм и вътреяшен диаметър 4 мм (тръба 8/4). При провеждане на експреиментите са използвани три мощности – 13W, 15W и 20W, при които вълната създава аргонов плазмен факел извън кварцовата тръба във въздуха. Това позволява директно третиране на пробите в активната зона на разряда. Газоразрядните условия са подбрани така, че газовата температура на плазмата да не надвишава 40°C. Характерно за плазмената установка, с която работим в настоящата дипломна работа е, че третирането на пробите се извършва в активната зона, в която се създава плазмата. При диелектричният бариерен разряд и при плазмена струя, третирането се извършва чрез послесветене извън активната зоната на плазменият разряд. Предимство на повърхнинновълновия разряд е липсата на електроди, които се разпрашават и замърсяват плазмата. Друга характеристика на наличната плазмена установка е, че се получава по-голяма плазмена плътност в сравнение с други безелектродни разряди при същата мощност. Благодарение на високата вълнова честота и малката мощност, при която се работи, резултатите се постигат за кратко време и при студена плазма – плазменият факел не надвишава температура от 40 °С, (**фигура 2**). Така елиминираме топлинния ефект и резултатите са вследствие на останалите продуцирани от плазменият разряд фактори

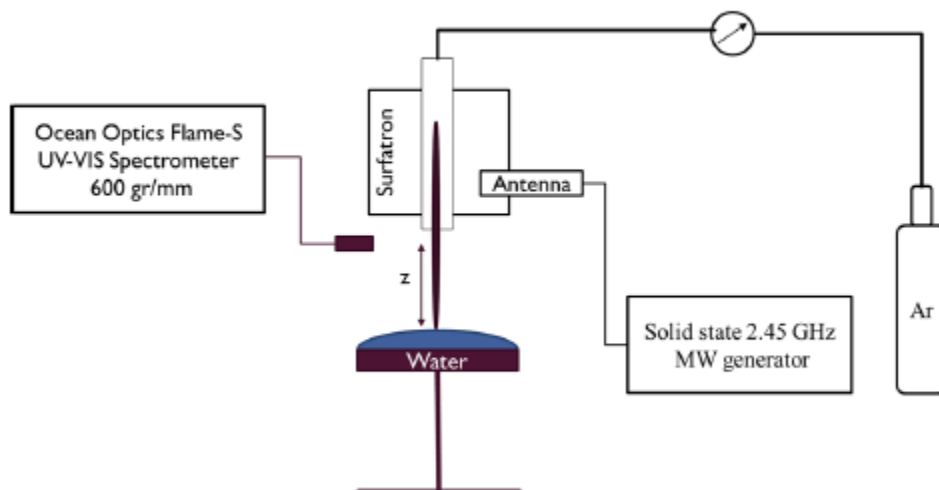
Плазмата е многокомпонентна система от електрони, йони и неутрални частици. Всеки тип частици се характеризира с различна средна енергия. Температурата на съответната компонента може да бъде дефинирана, когато системата е в термодинамично равновесие.

Йонната температура или температурата на плазмата, може да бъде изразена в енергетични единици. Според нея плазмата се дели на:

- нискотемпературна – при $T_i < 10^5$ К
- високотемпературна – при $T_i > 10^5$ К

На базата на средната кинетична енергия на частиците в плазмата, тя може да се раздели на:

- равновесна – при термодинамично равновесие се наблюдава равенство на електронната, йонната температури и температурата на неутралните частици;
- неравновесна – която и да е от компонентите не е равновесна функция; плазма в локално термодинамично равновесие – параметрите се менят в пространството и времето, но поради високата скорост на изменение в дадена точка, можем да приемем, че имаме термодинамично равновесие.



Фигура 2. Схематично изображение на експериментална постановка на повърхнинновълнов разряд в аргон при атмосферно налягане (Tsvetkov V., et all; Effect of Plasma-Activated Medium and Water on Replication and Extracellular Virions of Herpes Simplex Virus-1; 2020; Plasma Medicine, 10(1):15-26 (2020))

1.2. Работен разтвор на PEG 8000 (полиетиленгликол 8000)

Приготвя се 60% разтвор като 0.6 гр. суха субстанция PEG се разтваря в 1мл PBS., след което се филтрира през милипоров филтър (размер на порите 0.22 μm) и се съхранява при температура 4°C до момента на употребата му. Прилага се при пречистване на вирусни частици.

1.3. Хемилуминисцентна система за детекция на активни форми на кислород (RONS.)

Луцигенин (3мг/мл), NaOH (100 mM). Буфер – към 10 мл 100 mM Трис (pH 9.4) се добавя 0.2 мл хемолизат (10 мл H₂O + 0.02 мл тотална кръв).

Луминол 10 mM, 50 mM боратен буфер, пероксидаза извлечена от хрян (horseradish peroxidase).

2. Методи:

2.1. Изолиране и пречистване на HSV-1, щам F

След получаване на вирусна суспензия, вследствие на заразяване на конфлуентен монослой и последвало замразяване и размразяване, се пристъпва към събиране на супернатанта. За целта вирусната суспензия се центрофугира на 5000 оборота в минута (RPM) в продължение на 20 минути. Към събраната супернатанта се прибавя филтриран през стерилен филтър полиетилен гликол (PEG 8000) с концентрация 60 %, разтворен в PBS. Съотношението супернатанта към 60 % PEG 8000, е 3:1. След 24 часа престой при температура 4 °C следва центрофугиране на сместа на 5000 оборота в минута (RPM) за 40 минути. Утайката се ресуспендира в 1.2 мл PBS. Изолираният HSV-1 (F) се пречиства допълнително чрез използването на захарозен градиент с плътност от 20 % до 60 %. За получаване на вси един от пластове на градиента се смесват равни количества PBS. (10x) и 30 % разтвор на захароза. Към сместа се добавя нарастващо количество Percoll (pH 8.5–9.5), 1 мл за 20 %-ен градиент до 3 мл за 60 %-ен градиент. Разтворът се довежда до краен обем 5 мл с дестилирана вода. Вси един от пластове се създава по пътя на наслояването. Изливат се по 2 мл от вси пласт в центрофужна епруветка. След центрофугиране на 6000

оборота в минута (RPM) за 90 минути се събира ивицата между 20 % и 30 % разтвор на захароза.

2.2 Изследване на цитотоксичното въздействие на третирана с използваната нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма хранителна среда

За изследване на цитотоксичното въздействие (ЦВ) на плазмата и определяне на клетъчна жизненост бе използван МТТ методът, описан от Mosmann.

За определяне на токсичното въздействие на третираните разтвори беше използван следният работен протокол:

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в съответния обем растежна хранителна среда DMEM (с 8 % FBS). Следва разсяване на клетъчната суспензия, с концентрация на клетките 1.5×10^5 кл/мл, в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific) по 0.2 мл суспензия за ямка. Поради данни, получени експериментално, че в крайните редове и колони понякога се получава намаляване на обема при по-дълготрайно култивиране, в тях не се посяват клетки, а се накапва само хранителна среда без серум. Когато клетъчният монослой достигне между 90 и 100 % конfluентност (обикновено след 24 часа), надстоящата течност се отдекантира и се прибавя третирана в газоразрядната плазма среда DMEM (4 % FBS). Бяха приложени следните опитни постановки:

- Третирана среда при плазмена мощност 20 W. Средата се третира в активната зона на разряда, като продължителността на третиране е 30 сек., 60 сек., 90 сек., 120 сек., 240 сек., 300 сек.. Към всяка ямка се прибавя третираната среда в обем 0.1 мл, след което се добавят по 0.1 мл нетретирана поддържаща хранителна среда. За всяко едно от времената за третиране се накапват поне по три ямки.
- Плазмените параметри са същите като гореописаните. Средата се третира за същите времеви интервали. Обемът на накапаната третирана хранителна среда е 0.2 мл без да се добавя нетретирана такава.
- Средата се третира при плазмена мощност 15 W. Накапват се по 0.2 мл третирана поддържаща среда. Времеви интервали на третиране на средата са същите (30 сек., 60 сек., 90 сек., 120 сек., 240 сек., 300 сек.).

- Средата се третира при плазмена мощност 13 W. Накапват се по 0.2 мл третирана поддържаща хранителна среда. Времеви интервали за третиране са същите.

При всички опитни постановки третирането на поддържащата хранителна среда DMEM се извършваше непосредствено преди прибавянето ѝ към клетъчния монослой, като се третира в обем 5 мл. В няколко ямки на всяка плака се накапва само хранителна среда без да се третира на плазменият факел (0.2 мл) и служат за клетъчна контрола. Така обработените плаки се инкубират в термостат (Mettler) при температура 37 °C в продължение на 72 часа.

След определеният период за инкубация на плаките във всяка ямка (с изключение на крайните редове и колони) се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МТТ (като крайната му концентрация в ямката е 0.5 мг/мл), след което плаката се инкубира в термостат (Mettler) при температура 37 °C в продължение на 30 мин. След инкубация, хранителната среда, с разтворената в нея МТТ, се отстранява, след което се добавят 0.2 мл от лизиращия разтвор. Така обработената плака се отчита спектрофотометрично при дължина на вълната 540 nm с помощта на ELISA reader Multiscan MX. Клетъчната преживяемост се определя като процент на живите клетки в ямките, обработени с плазмено третирана среда при различните времена на експозиция и използваните мощности на плазмения източник (описани по-горе) в сравнение с нетретираните контролни клетки от културата. За целта приложихме следната формула:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = \frac{A_{540} \text{ оптична плътност на третираните клетки}}{A_{540} \text{ оптична плътност на контролните клетки}} \times 100$$

От построената крива “доза – клетъчна преживяемост” се изчисляват условията на третиране на средата при които се отчита 50 % клетъчна жизнестойност както и максимално поносимото въздействие на третираната при различни условия среда върху клетъчната преживяемост.

2.3. Определяне преживяемостта на заразени с вирус клетки и третираните с активирани с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма среда, чрез МТТ тест.

Антивирусното действие на среди, активирани чрез нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма, се определя от разработения от Mos.mann МТТ тест и модифициран от Pauwels, Takeuchi, Sudo за бърз скрининг на съединения за антихерпесно действие. Определянето на клетъчната жизнестойност чрез ММТ тест на клетки, заразени с вирус и третираните с активирани чрез плазмения източник среди, е показателно за антивирусното действие.

За определяне на антивирусната активност на третираните с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма среди беше използван следният работен протокол:

След преброяване на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда DMEM (с 8% FBS). Клетъчната суспензия се разсява в стерилни 96-ямякови плаки (Orange S.scientific) в обем 0.2 мл на ямка и в концентрация 1.5×10^5 кл/мл. Експериментите бяха провеждани при пълна конfluентност клетъчният монослой. Един час преди третирането на хранителната среда клетъчният монослой се заразяват с използвания вирусен щам 0.1 мл на ямка, в концентрация 10000 ТКИД₅₀/0.2мл. Следва един час адсорбция на вируса в термостат при температура 37 °С. Поддържаща хранителна среда DMEM (с 4 % FBS) се третира на плазмения източник в обем 5мл и параметри на източника: 13 W плазмена мощност, проток на газа 5 л/мин и времеви интервали на третиране: 30 сек., 60 сек., 90 сек., 120 сек., 240 сек., 300 сек. След обработката на средата, заразените с вирус клетки бяха третираните по следните методики:

- Последователно третиране с отстраняване на неадсорбиращия вирус. След 1 час адсорбция на вируса, вирусната суспензия се изтегля. Следва трикратно промивка с физиологичен разтвор. Във всяка ямка се добавят 0.2 мл обработена по гореописания начин поддържаща хранителна среда. След изчакване 5 мин. и 20 мин. третираната среда се отстранява и се заменя с 0.2 мл нетретирана среда.
- Последователно третиране с отстраняване на неадсорбиращия вирус. След 1 час адсорбция на вируса, вирусната суспензия се изтегля. Следва трикратно промивка с физиологичен разтвор. Във всяка ямка се добавят 0.2 мл обработена по гореописания начин

поддържаща хранителна среда без последващо отстраняване и замяна с нетретирана поддържаща среда.

- Последователно третиране без отстраняване на неадсорбиращия вирус. След 1 час адсорбция на вируса, във всяка ямка се добавят 0.1 мл обработена по гореописания начин поддържаща хранителна среда.
- Успоредно третиране на пробите. След отстраняване на растежната хранителна среда над клетъчния монослой, във всяка ямка се накапват в равни обеми (по 0.1 мл) вирусна суспензия и третирана поддържаща среда.

При всички работни протоколи за всяка плака се обработват и съответните контроли:

Контрола клетки (незаразени с вирус и нетретиран с активирана среда клетки) – към ямките, определени за клетъчна контрола (поне три), се накапват по 0.2 мл нетретирана поддържаща хранителна среда DMEM.

Контрола вирус (заразени с вирус и нетретиран с активирана среда клетки) – към ямките, определени за вирусна контрола (поне 3), се накапва по 0.1 мл поддържаща хранителна среда DMEM.

Така обработените плаки се инкубират в термостат (Memmert) при температура 37°C в продължение на 4–5 дена (в зависимост от развитието на цитопатичният ефект във вирусната контрола).

След съответният период на инкубация, във всяка ямка (с изключение на крайните редове и колони) се накапва по 0.02 мл работен разтвор на МТТ (като крайната му концентрация в съответната ямка е 0.5 мг/мл), след което плаките се инкубират в термостат (Memmert) при 37°C в продължение на 30 минути. Хранителната среда, с разтворената в нея МТТ, след инкубацията се отстранява и се добавят 0.2 мл от лизиращия разтвор. Така обработените плаки се отчитат спектрофотометрично при дължина на вълната 540 nm с помощта на ELISA reader Multiscan MX.

Наличието или отсъствието на антивирусна активност се определя като % преживяемост на клетките в условията на съответния експеримент и се изчислява по следната формула:

[ODB – ODKB]

----- X 100 (%), където:

[ODKкл. – ODKB]

ODB – абсорбция на заразените и третирани с плазмено активирана среда клетки

ОДКВ – абсорбция на заразените с вирус клетки (вирусна контрола)

ОДККл. – абсорбция на незаразени и нетретиранни с активирана поддържаща среда клетки (клетъчна контрола).

За достоверността на експеримента, от значение е в клетъчната контрола да няма поява на цитопатичен ефект и отношението на абсорбцията на вирусната контрола спрямо абсорбцията на клетъчната контрола да е по-малко или равно на 0.2.

2.4. Изследване на въздействието на нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма върху извънклетъчните вириони

За определяне на въздействието на нискотемпературната неравновесна газоразрядна плазма върху инфекциозността на вирус HSV-1щам F, е използван директен контактен метод. За целта са приложени следните работни протоколи:

- След определяне на вирусния титър ($10^{-6.50}$ ТКИД₅₀), вирусната суспензия се разрежда в съотношение 1:1 с dH₂O с краен обем 3 мл Така разредената суспензия се третира с плазмения източник при мощност на източника 13 W и проток на газа 5 l/min за времеви интервали на третирането 30 s., 60 s., 90 s., 120 s., 180 s., 240 s. След заразяване на клетъчен монослой с обработената вирусна суспензия беше определен вирусният титър по описаната по-горе методика (Определяне на инфекциозен вирусен титър чрез метод на крайните разреждания по Reed-Muench.
- След определяне на вирусния титър ($10^{-6.50}$ ТКИД₅₀), вирусната суспензия се разрежда в съотношение 1:2 с dH₂O с краен обем 3 мл Така разредената суспензия се третира с плазмения източник при мощност на източника 13 W и проток на газа 5 l/min за времеви интервали на третирането 30 сек., 60 сек., 90 сек., 120 сек., 180 сек., 240 сек.. След заразяване на клетъчен монослой с обработената вирусна суспензия се определя вирусният титър по описаната по-горе методика (Определяне на инфекциозен вирусен титър чрез метод на крайните разреждания по Reed-Muench.

2.5. Определяне на тип и количество активни форми на кислород (RONS) продуцирани под въздействието на нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма.

Количеството на водороден прекис беше изследвано в две различни опитни постановки:

- С участието на луцигенин: регистрира активни форми на кислород. Към 5 μ l буфер се добавя 0.03 мл луцигенин (3 мг/мл) и 0.01 мл NaOH (100 mM), смесват се в кювети и към така получената смес се прибавя 0.05 мл от третираната проба. Буферът се приготвя като към 10 мл 100 mM Трис (pH 9.4) се добавят 0.2 мл хемолизат (10 мл H₂O + 0.02 мл тотална кръв).

- С участието на луминол: регистрира водороден прекис – H₂O₂. Бяха използвани 50mM боратен буфер и 10mM луминол. Смесват се 10 мл боратен буфер и 0.1 мл луминол. От така полученият разтвор се накапват по 0.5 мл в кювети. Към всяка се прибавя по 0.005 мл пероксидаза извлечена от хрян (horseradish peroxidase), както и 0.005 мл от съответната проба.

Беше изследвано влиянието на третиран с плазма PBS в присъствието на H₂O₂ (0.0011 мл ; 50 mM), както и влиянието на PBS, dH₂O и физиологичен разтвор без добавяне на H₂O₂, върху хемилуминисцентният сигнал при третиране с плазма за съответните времеви интервали от 10 до 60 секунди и при плазмена мощност 13 W и 20 W, като се прилагат съответните опитни постановки.

- влияние на DMEM върху хемилуминесцентния сигнал в присъствие на H₂O₂ (0.001 мл; 50 mM)

- влияние на 4 % DMEM върху хемилуминесцентния сигнал в присъствие на H₂O₂ (0.001 мл; 50 mM)

- влияние на физиологичен разтвор върху хемилуминесцентния сигнал.

- влияние на dH₂O върху хемилуминесцентния сигнал.

- влияние на PBS върху хемилуминесцентния сигнал в присъствие на H₂O₂ (0.001 мл; 50 mM)

- влияние на PBS върху хемилуминесцентния сигнал

Като контрола бяха измерени стартовите сигнали, при които в системата присъства само H_2O_2 (0.001 мл; 50 mM). Гасителния ефект на DMEM беше използван за контрола по отношени на получените радикални форми. След добавяне на изследвания разтвор бяха измерени стартовият сигнал и изходните сигнали на съответните разтвори (по една от двете опитни постановки).

4. Резултати

А. Изследване въздействието на растителни екстракти върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесен вирус тип 1, щам F и ацикловир резистентен херпесен вирус тип 2, щам DD

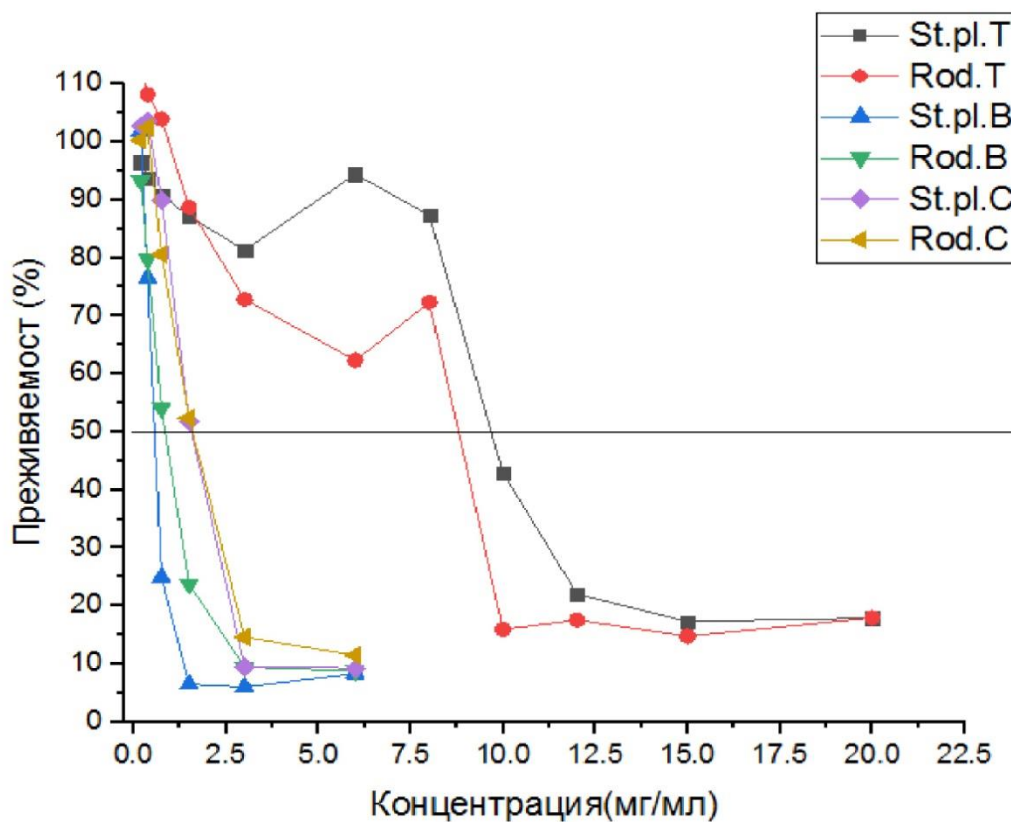
1. Изследване антивирусната активност на екстракти получени от *in vivo* култивирани представители на *Vaccinium vitis-idaea L.*

1.1. Установяване цитотоксичното въздействие на екстрактите върху клетките от използваната клетъчна култура. Определяне на стойностите на МНК и ЦК₅₀

Съгласно целта и задачите на настоящата дипломна работа, първоначално беше определено цитотоксичното действие на всеки един от използваните от нас екстракти. Приложихме МТТ тест за определяне на живите и мъртви клетки.

В използваната експериментална постановка са тествани концентрации в граници от 0.187 мг/мл до 20 мг/мл на екстрактите от *Vaccinium vitis - idaea L.*

Получените стойности за всеки екстракт са представени в **таблица 2** и са изобразени графично на **фигура 3**.



Фигура 3. Преживяемост на клетки от клетъчна линия MDBK, въздействани с екстракти от *Vaccinium vitis-idaea L.*

Таблица 2. Данни за цитотоксичността (МНК и ЦК₅₀) на екстракти от *Vaccinium vitis - idaea L.*

Екстракт	МНК (мг/мл)	ЦК ₅₀ (мг/мл)
St.pl. Total	6	9,63
Rod. Total	3	8,81
St.pl.B	0.5	0,556
Rod. B	0.75	0,84
St.pl.C	1	1,56

Rod. C	1	1,61
---------------	---	------

От получените данни беше установено, че при тоталния екстракт S.t.Pl.T, ЦК₅₀ е 9,63мг/мл, а МНК е 6 мг/мл. Вторият тотален екстракт Rod.T проявява МНК 3мг/мл, а неговата стойност за ЦК₅₀ е 8,81 мг/мл. Максималната нетоксична концентрация установена при екстрактите от фракция В е съответно: при екстракта от Стара планина е 0,5 мг/мл, а при екстракта от Родопи – 0,75 мг/мл. Съответните стойности на ЦК₅₀ при тези екстракти е: при St.pl.B – 0.556 мг/мл, а при Rod.B е 0.84 мг/мл. Екстрактите от фракция С имат еднакви стойности за МНК (1мг/мл), като отчетената ЦК₅₀ на двата екстракта е съответно при St.pl.C -1.56 мг/мл, а при Rod.C е 1,61 мг/мл. При сравняване на експерименталните данни (стойности за ЦК₅₀) се установява, че с най-голяма цитотоксичност са екстрактите от фракция В, а с най-малка са тоталните екстракти.

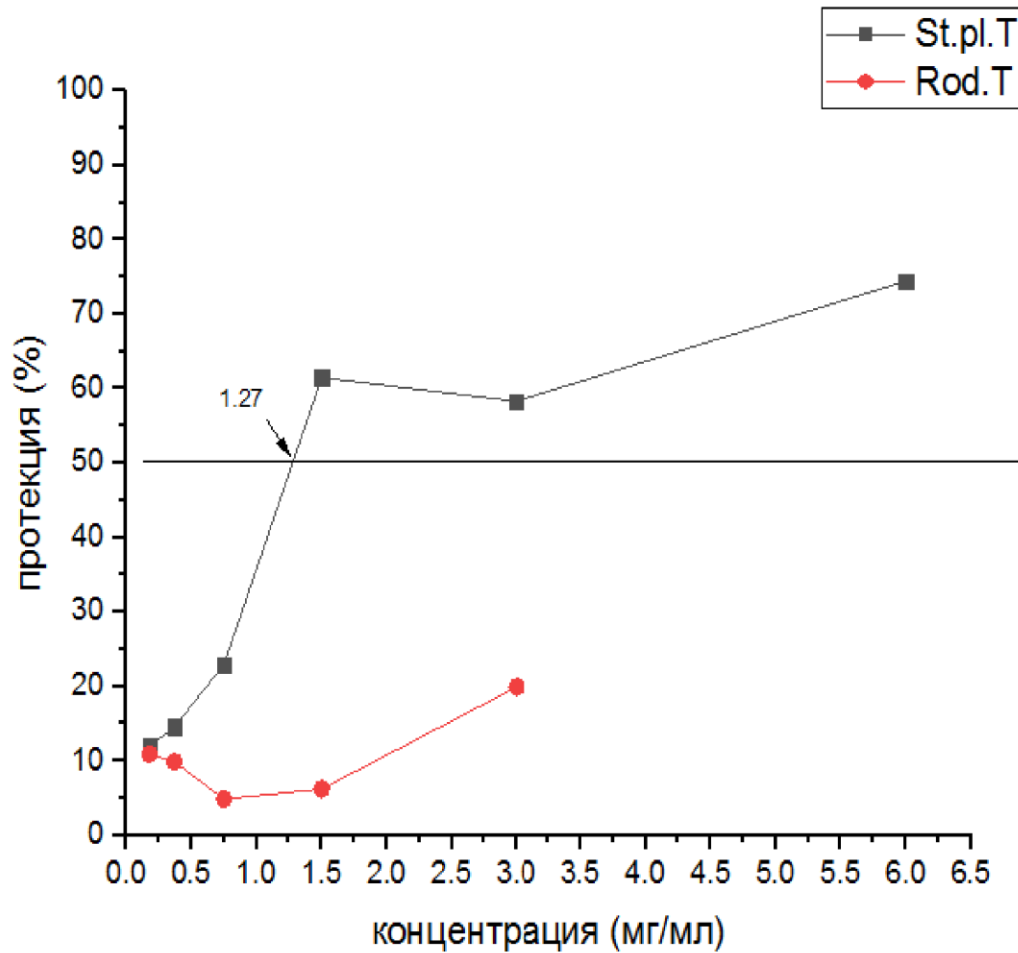
Йерархичната редица изглежда по следния начин (от по – висока към по – ниска токсичност):

S.t.pl.B >Rod.B >S.t.pl.C >Rod.C >Rod.T >S.t.pl.T

1.2. Изследване преживяемостта на заразени с HSV-1 (F) и третирани с изследваните екстракти клетки.

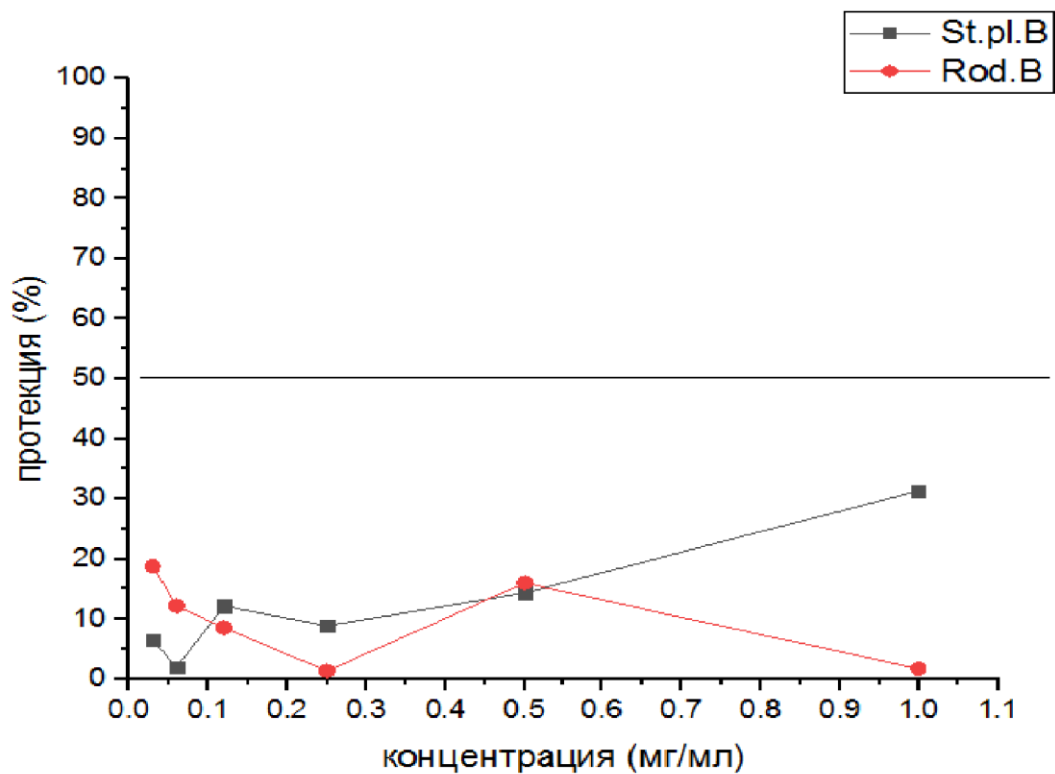
Влиянието на растителните екстракти върху репликацията на HSV-1 щам (F) и на HSV-2 щам (DD- ацикловиррезистентен) бе определено чрез разработения от *Mos.mann* МТТ тест и модифициран от *Pauwels, Takeuchi, Sudo* за бърз скрининг на съединения за антивирусно действие. При експериментите използвахме работна доза 100 ТКИД₅₀ (при титър на вируса 10^{-6.33} ТКИД₅₀). Като положителна контрола при всеки експеримент използвахме ацикловир.

Получените резултати от проведените експерименти са представени графично на **фигура 3, фигура 4, фигура 5** и таблично на **таблица 3**.



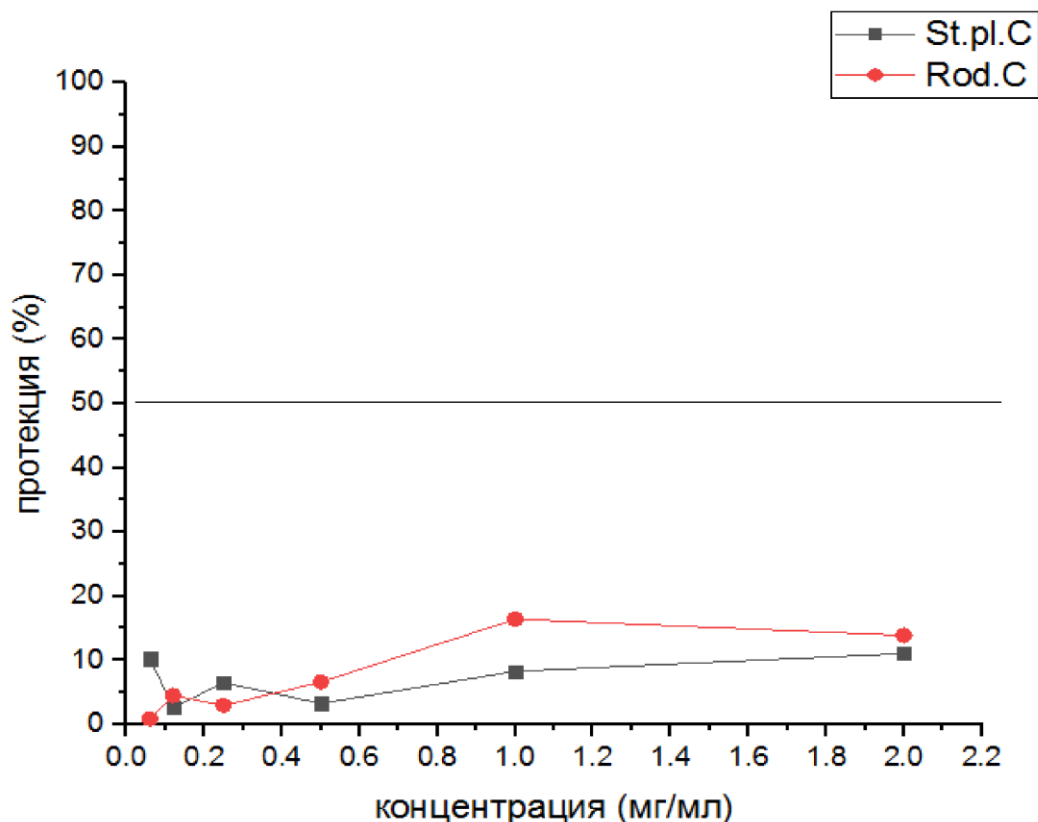
Фигура 4. Въздействие върху репликацията на HSV-1 (F) при третиране с тотални екстракти (St.pl.T и Rod.T) от *Vaccinium vitis -idaea L.*

От графиката на **фигура 14** е видно, че ИК₅₀ (1,27 мг/мл) е достигната при екстракта St.pl.T, но не и при Rod.T, като и двата екстракта са изследвани в концентрации започващи от 6 мг/мл (МНК).



Фигура 5. Въздействие върху репликацията на HSV-1(F) при третиране с екстракти от *Vaccinium vitis -idaea L*, фракция В (St.pl.B и Rod.B)

При екстрактите от фракция В, както става видно от графиката не се достига ИК₅₀. Те също са изследвани в падащи двукратни концентрации, започващи от 1 мг/мл.



Фигура 6. Въздействие върху репликацията на HSV-1 (F) при третиране с екстракти от *Vaccinium vitis-idaea L.*, фракция С (St.pl.C и Rod.C)

Резултатите за двата екстракта от фракция С също са представени графично и става ясно, че при нито един от тях не се достига процент протекция на клетките над 50% и следователно не се достига ИК₅₀.

Представените графично данни на **фигура 4**, **фигура 5** и **фигура 6** са обединени в **таблица 3**.

Таблица 3. Данни за процент протекция и ИК₅₀ на екстракти от *Vaccinium vitis-idaea L.*, върху репликацията на HSV-1 (F).

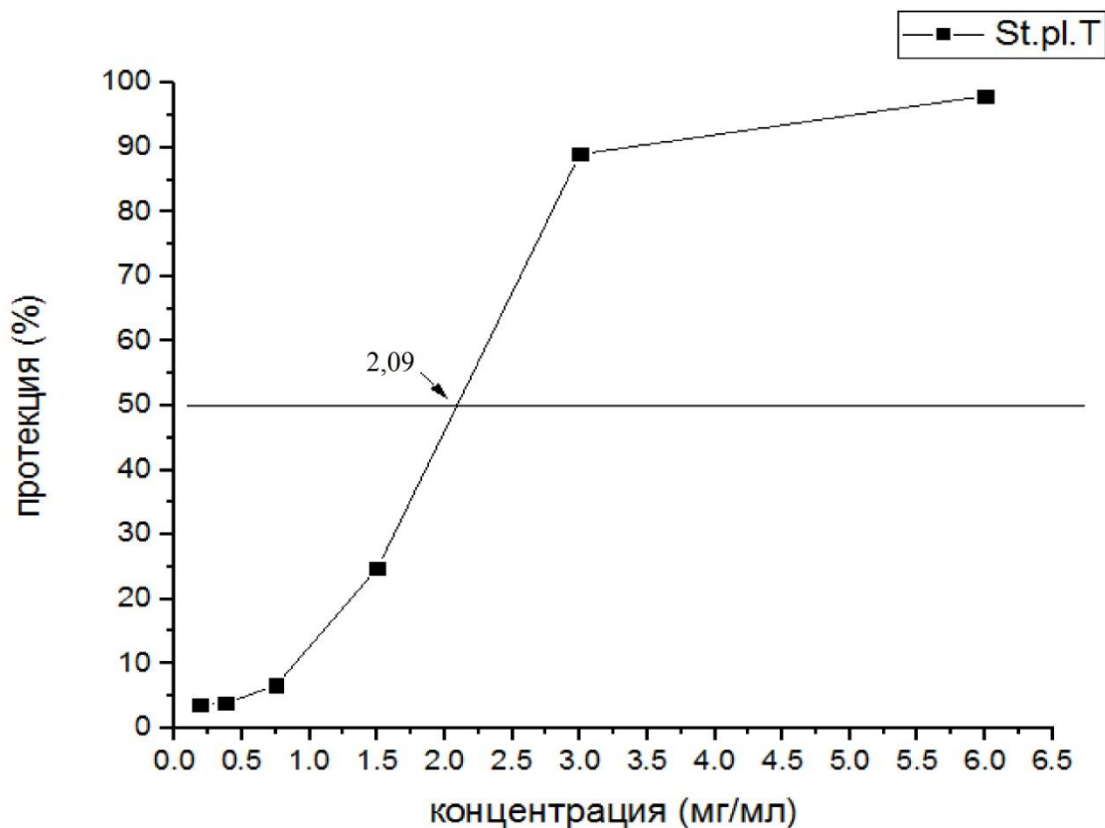
Екстракт	% протекция на клетките в МНК	ИК ₅₀ мг/мл	ЦК ₅₀ мг/мл	Селективен индекс
St.pl.T	74.44	1.27	9.63	0.13
Rod. T	19.96	н.д.	8.81	н.д.
St.pl.B	23,5	н.д	0.556	н.д
Rod. B	9.2	н.д	0.84	н.д
St.pl.C	8.3	н.д	1.56	н.д
Rod.C	16.41	н.д	1.61	н.д
АЦВ	100	0.000430	0.218	452.08

*н.д. – няма данни

От данните представени в **таблица 9** е видно, че най-голям процент на клетъчна протекция има екстрактът St.pl.Total (74,44%). Достигнатата при него инфекциозна концентрация е 1,27 мг/мл и е изчислен селективен индекс - 0,13. При втория тотален екстракт Rod.T процента протекция в неговата МНК е 19,96%. При екстрактите от фракция В бе отчетен процент на протекция, както следва за St.pl.B 23,5%, а за Rod.B 9,2%. Екстракта St.pl.C проявява процент протекция на клетките в МНК 8,3%, а екстракта Rod.C – 16,41%. Селективен индекс е изчислен само за екстракта St.pl.T, тъй като при останалите екстракти не се достига ИК₅₀.

1.3. Изследване преживяемостта на заразени с HSV-2, щам DD и третирани с тоталният екстракт от Стара планина клетки.

За изследване на преживяемостта на заразени с HSV-2, щам (DD), клетки е използван само един от тоталните екстракти - St.pl.T, който показва най-високи стойности за клетъчна протекция при изследването на HSV-1q щам F. Получените резултати от проведеният експеримент са представени на **таблица 4** и изобразени графично на **фигура 7**.



Фигура 7. Въздействие на тотален екстракт (St.pl.T) от *Vaccinium vitis-idaea* L. върху репликацията на HSV-2 (DD).

От графиката е видно, че е достигнатият процент протекция на клетките в МНК на екстракта е 98%.

Таблица 4. Данни за процент протекция и ИК₅₀ на тотален екстракт от *Vaccinium vitis-idaea* L., спрямо HSV-2 (DD).

Екстракт	% протекция на клетките в МНК	ИК ₅₀ мг/мл	ЦК ₅₀ мг/мл	Селективен индекс
St.pl.T	98	2,09	9.63	0.22
АЦВ	10	н.д.	0.218	н.д.

*н.д. – няма данни

Екстрактът (St.pl.T) е изследван в концентрации от 0,187 мг/мл до 6 мг/мл, като в неговата МНК (6мг/мл), отчетеният процент на протекция на клетките е 98%. Достигната ИК₅₀ на екстракта, при този експеримент, е 2,09 мг/мл, а изчисленият сективен индекс - 0,22. За сравнение, същия екстракт достига ИК₅₀ от 1.27 мг/мл приложен при експериментите с щам F

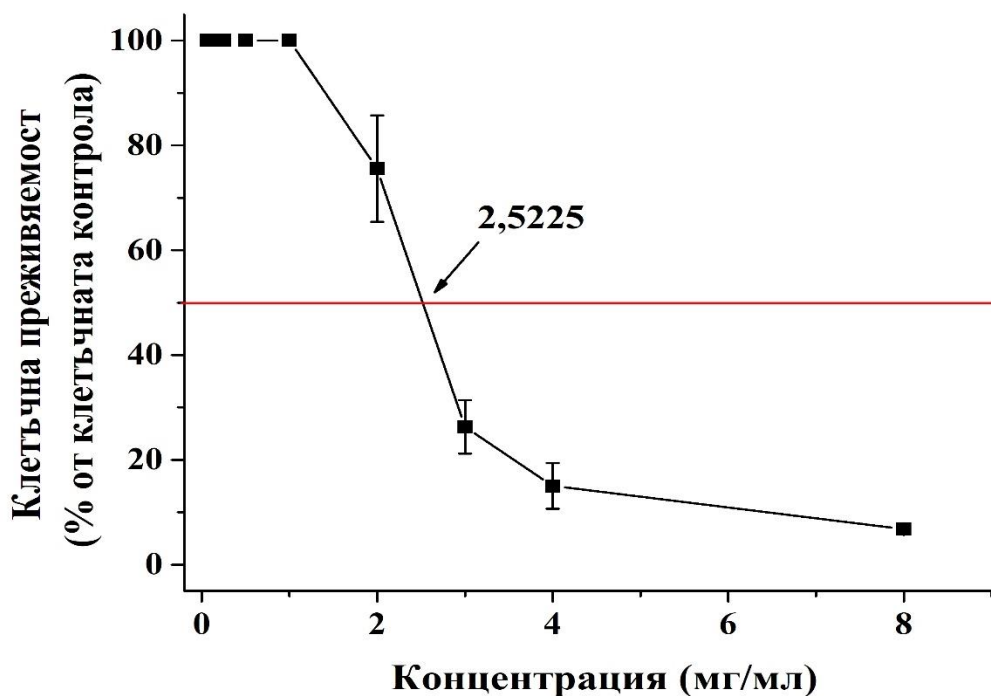
1.4. Определяне на въздействието на екстрактите спрямо извънклетъчните вириони

За по-пълното проучване на антихерпесния ефект на екстрактите от *Vaccinium vitis-idaea L.* бе изследвано и въздействието им върху екстрацелуларните вириони, чрез директен контактен метод. Екстрактите бяха приложени в концентрация отговаряща на тяхната МНК. Беше проследена промяната в инфекциозността на вируса при различна продължителност на контакт с изследвания екстракт (5, 15, 30, 60, 120, и 240 минути). При провеждането на описания експеримент не беше отчетена инактивация на вирионите, в следствие на третирането с различните екстракти. При отчитането на резултатите, разлика в титъра на третираните ямки и нетретираната вирусна контрола не се наблюдава.

2. Установяване на ефективността на екстракти получени от *in vivo* култивирани представители на вид *Astragalus glycyphyllos L.*

2.1. Определяне преживяемостта на третиран с метанолов обезмаслен извлек от *Astragalus glycyphyllos L.*, клетки от клетъчна линия MDBK. Определяне на стойностите на МНК и ЦК₅₀

Използваните при експеримента концентрации на метаноловият обезмаслен извлек от *Astragalus glycyphyllos L.* са в граници от 0.0625 мг/мл до 8 мг/мл. Резултатите получени при проведените експерименти са представени в **таблица 5** и изобразени графично на **фигура 8**.



Фигура 8. Преживяемост на клетки от клетъчна линия MDBK, въздействани с обезмаслен метанолов екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L.

Таблица 5. Данни за цитотоксичност на метанолов обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L.

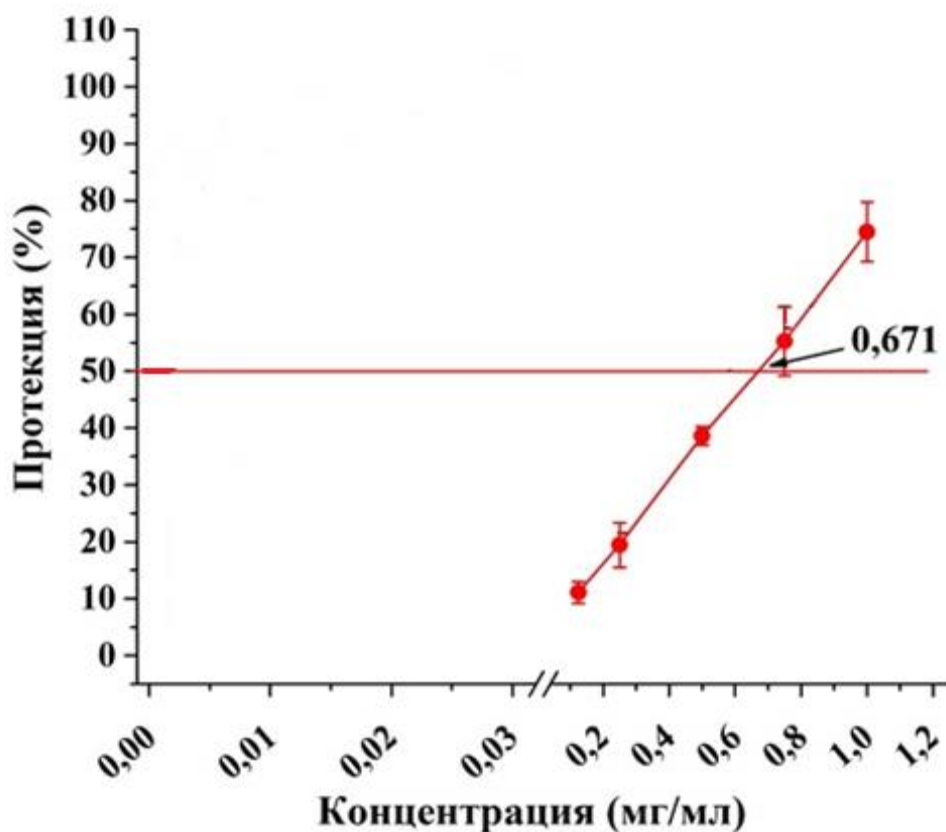
МНК (мг/мл)	ЦК ₅₀ (мг/мл)
1	2.5225

От получените резултати е видно, че максималната концентрация, при която се достига 100 % преживяемост на клетките е 1 мг/мл. При концентрация на веществото 2.5225 мг/мл преживяемостта е 50%. Наблюдава дозозависимо намаляване на токсичността на екстракта.

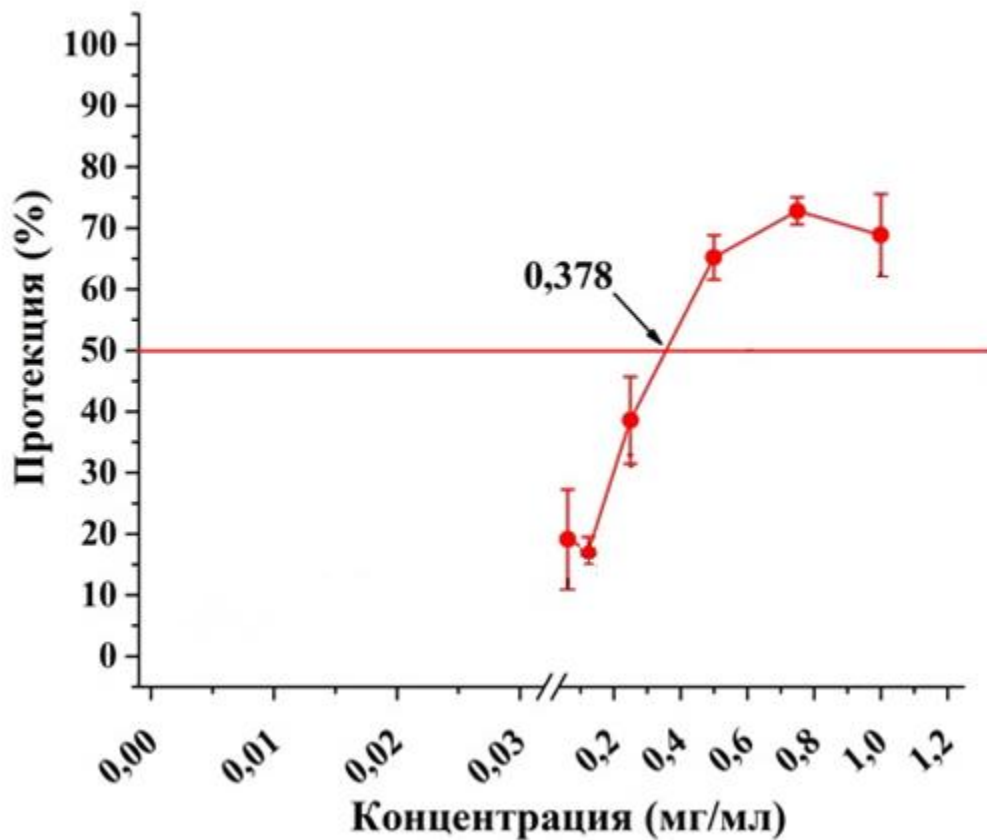
2.2. Изследване преживяемостта на заразени с HSV-1 (F) и HSV - 2 (DD) и третиран с метанолов обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L клетки.

При приложената експериментална постановка за потвърждаване досотверността на резултатите от експеримента е използван АЦВ като референтен инхибитор.

Резултатите са обединени в **таблица 6** и графично изобразени на **фигура 8**, за HSV-1 (F) и **фигура 9** за HSV-2 (DD).



Фигура 9. Ефект на метанолов обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L. (—●—) върху репликацията на HSV-1 щам F.



Фигура 10. Ефект на метанолов обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L. (—●—) върху репликацията на HSV-2 щам DD.

От данните на **фигура 10** е видно, че метаноловият обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L. показва протективен ефект спрямо HSV-1 (F). В МНК протекцията достига 74.49 % (ИК₅₀ = 0.672 мг/мл) протекция съответно при експериментална постановка. С понижаване на дозата, антивирусното действие на веществото намалява .

Таблица 6. Данни за антивирусната активност на метанолов обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L. върху репликацията на HSV-1 щам F и HSV-2 щам DD.

Екстракт	Екстракт/вещество добавен/о един час след заразяването на клетъчният монослой			
	HSV-1 (F)		HSV-2 (DD)	
	ИК ₅₀ (мг/мл)	СИ	ИК ₅₀ (мг/мл)	СИ
	Метанолов обезмаслен екстракт	0,671	0.26	0,378

Метаноловият обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L. протектира в МНК (таблица 12, фигура 10 и фигура 11) клетките от клетъчната линия заразена с HSV-1 щам F и HSV-2 щам DD. Данните за ИК₅₀ са сравнително близки, което показва че екстрактът не проявява строго селективно действие по отношение на един от двата използвани щама.

2.3. Въздействие на метанолов обезмаслен екстракт от *Astragalus glycyphyllos* L върху извънклетъчните вириони на HSV-1 щам F и HSV-2 щам DD.

Използваната концентрация при проведените експерименти съответства на МНК на метаноловият обезмаслен екстракт. Не бе установена разлика в титъра на въздействаната вирусна суспензия и нетретираната такава в нито един от времевите интервалите.

Б. Определяне степента на протекция на лични предпазни средства чрез прилагане на модифициран VFE метод.

Широко разпространени Обществени лицеви покрития (community face covering) или CFC, както и филтриращи лицеви маски (filtering facepiece) или FFP ниво 2 и 3 според EN149:2001. Разликите при различните типове маски тип FFP 2 и 3 идват от броя на слоевете от нетъкан текстил използван при направата им. Маските към категория CFC, за разлика от многопластовите FFP типове маски, притежават само един слой от синтетичен материал. Поставени на пътя на вирусния поток, те намаляват титъра на пробата с 0,17 логаритъм сравнено с вирусната контрола, което се равнява на 33.00% ефективност. При увеличаване на броя на слоеве, било то от памук или нетъканен текстил, титъра на използвания вирус намалява с между 0,34 – 0,67 логаритъма. Филтриращата ефективност варира между 55.00% и 79.00%. При третиране на CFC изградени от три слоя вирусния титър се понижава с 2 логаритъма, филтриращата ефективност се равнява на 99.00%. Всички стандартизирани FFP2 и 3 маски са съставени от три слоя. Поставени на пътя на вирусния поток, маските от този тип намаляват вирусния титър с два логаритъма (филтрираща ефективност – 99.00%)

В. Ефект на активирани чрез плазмен източник хранителна среда и дестилирана вода върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV- 1 щам F

1. Изследване на цитотоксичното въздействие на третирана с използваната нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма хранителна среда.

Първоначално беше изследвано цитотоксичното въздействие на плазмата и беше определена клетъчната жизненост. Приложен беше МТТ тест за определяне на живите и мъртвите клетки.

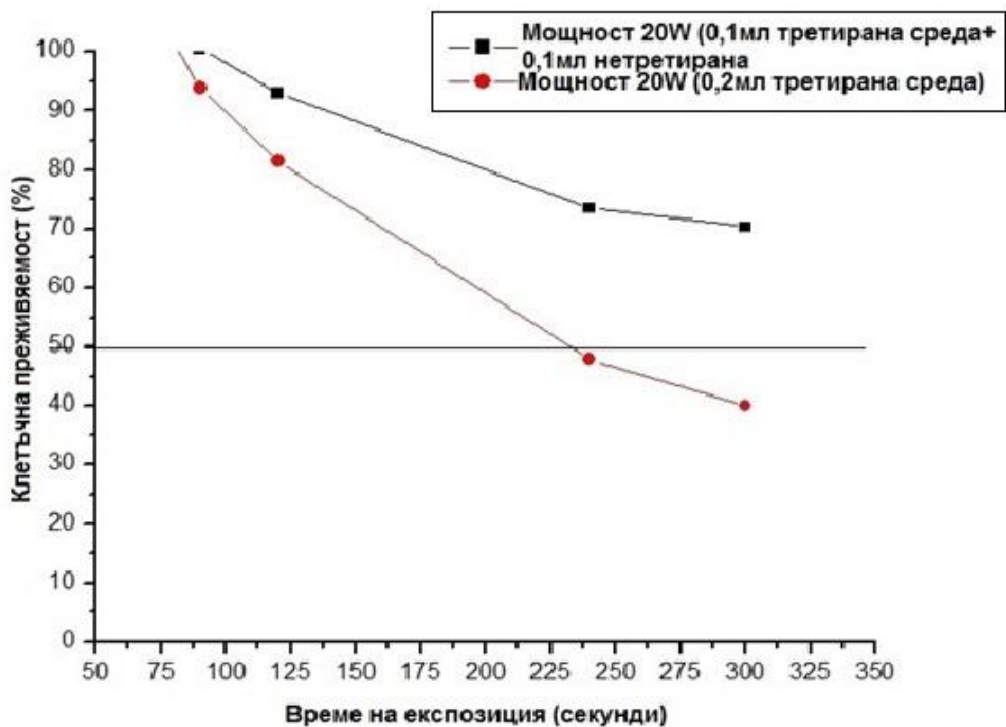
В експерименталните постановки бяха тествани хранителни среди DMEM (4 % FBS), третирани с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма при различни мощности, както и различни обеми на накапаната третирана и нетретирана среда.

Получените стойности при прилагане на различните опитни постановки са представени в **таблица 7** и са изобразени графично на **фигура 12** и **фигура 13**. Беше определено цитотоксичното въздействие (ЦВ₅₀) на третираната при различни времеви интервали и плазмени параметри среда, при които се отчита 50 % клетъчна жизненост.

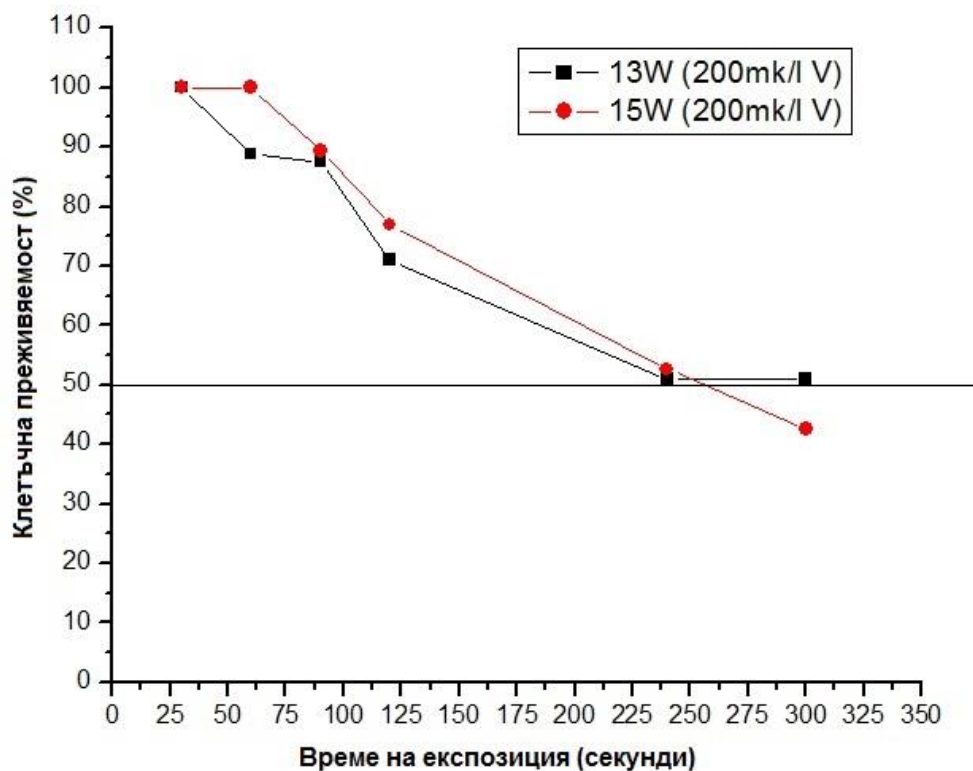
Таблица 7. Данни за ЦВ₅₀ на третирана с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма хранителна среда.

Постановка	ЦВ₅₀ (сек)
20 W 0.1 мл третирана среда + 0.1 мл нетретирана среда	н.д.*
20 W 0.2 мл третирана среда	232
15 W 0.2 мл третирана среда	258
13 W 0.2 мл третирана среда	н.д.*

*н.д. – няма данни



Фигура 13. Преживяемост на MDBK клетки при третиране с мощност на плазмения източник 20 W и добавени обеми 0.1 мл третирана среда + 0.1 мл нетретирана среда (■) и 0.2 мл третирана среда без добавяне на нетретирана среда (●)



Фигура 14. Преживяемост на MDBK клетки при третиране с мощности на плазмения източник 15 W (●) и 13 W (■) и добавени обеми 0.2 мл третирана среда без добавяне на нетретирана среда

Получените резултати показват, че само при две от експерименталните постановки се получават резултати, достигащи до под 50 % преживяемост на клетките от клетъчната култура – при поддържане на клетките с 0.2 мл третирана среда и мощност на плазмения източник 20 W и при 0.2 мл третирана среда при мощност 15 W. При използването на 20 W мощност на плазмения източник 50 % преживяемост на клетките се отчита на 232 s, а при използването на 0.2 мл третирана среда при мощност 15 W, 50 % преживяемост на клетките се отчита на 258 сек.

При третиране на клетъчния монослой с 0.1 мл плазмено третирана среда и добавяне на 0.1 мл нетретирана среда преживяемостта на клетките достига до 70 % при третиране на пробата за 300 сек.

При третиране на клетките с 0.2 мл плазмено третирана среда без добавяне на нетретирана преживяемостта на клетките се доближава до 50 %.

От получените данни можем да заключим, че мощността на плазмения източник не оказва влияние върху времето за достигане до ЦВ₅₀.

2. Изследване въздействието на третирана с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма среда върху репликацията на HSV-1 (щам F)

Чрез МТТ тест беше определена преживяемостта на заразени с вирус клетки и третирани със среда, обработена с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма. Получените експериментални стойности са представени в **таблица 8**

Таблица 8. Антивирусен ефект на третирана с плазма хранителна среда при различните опитни постановки

Условия на експеримента	Протекция (%) на клетките	ЦВ ₅₀
13 W 0.2 мл третирана среда (5 мин)	33,63	н.д*
13 W 0.2 мл третирана среда (20 мин)	30,60	н.д*
13 W 0.2 мл третирана среда последователно	50,24	н.д*
13 W 0.1 мл третирана последователно	37,95	н.д*
13 W 0.1 мл третирана успоредно	н.д*	н.д*

*н.д. – няма данни

При нито една от опитните постановки не се наблюдава значителен процент протекция върху клетъчния монослой. Най-висок процент протекция се достига при плазмена мощност 13 W и последователно третиране на средата без последващо

отстраняване на същата. Най-малък процент протекция на клетките се установява при 13 W плазмена мощност и отстраняване на третираната среда след 5 мин. и заменянето ѝ с нетретирана.

3. Изследване въздействието на третирана с нискотемпературната неравновесна газоразрядна плазма дестилирана вода върху извънклетъчните вириони на HSV-1, щам F

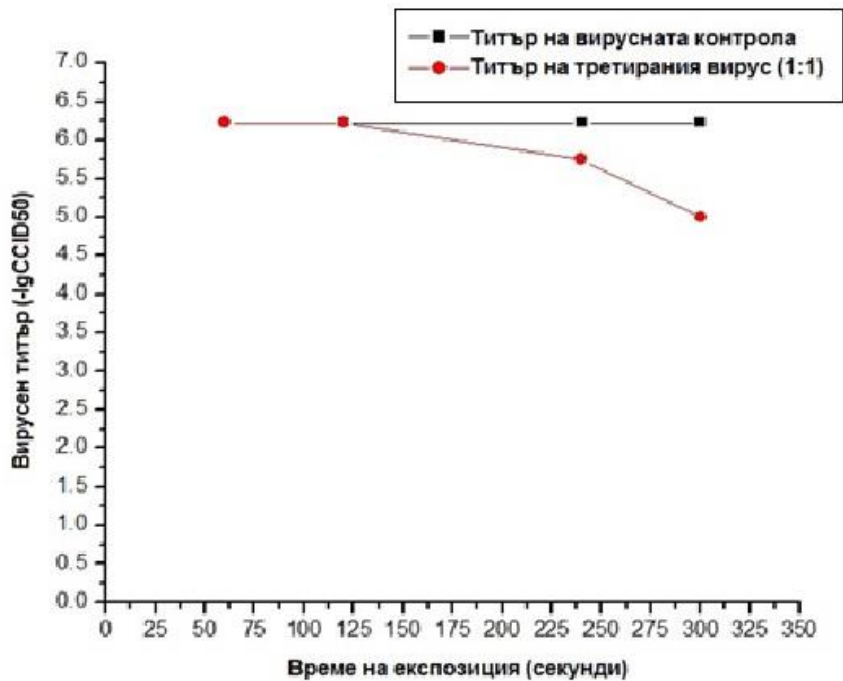
За определяне на въздействието на нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма върху инфекциозността на вирус HSV-1, щам F е използван директен контактен метод. Използваният вирус беше титриран и експериментите бяха проведени с $10^{-6,50}$ ТКИД₅₀.

За провеждане на експериментите бяха приготвени двукратни и трикратни разреждания на вирусната суспензия с крайни обеми по 3 мл, в съответствие с описаните в раздел **материали и методи**, работни протоколи. Така направените разреждания бяха директно третирани в активната зона на пламъка при мощност на плазмения източник 13 W за времеви интервали 60 сек., 120 сек., 240 сек. и 300 сек.

Резултатите, получени при проведените от нас експерименти, са представени в **таблици 9, 10 и фигури 14 и 15**

Таблица 9. Промяна в титъра на вирусната проба, разреждана с дестилирана вода в съотношение 1:1 и третирана за определените времеви интервали при мощност на плазмения източник 13 W

Времеви Интервали (секунди)	Титър на вируса контролата	Титър на вируса в пробата	$\Delta \log$
60	6.23	6.23	0
120	6.23	6.23	0
240	6.23	5.75	0.48
300	6.23	5.00	1.23



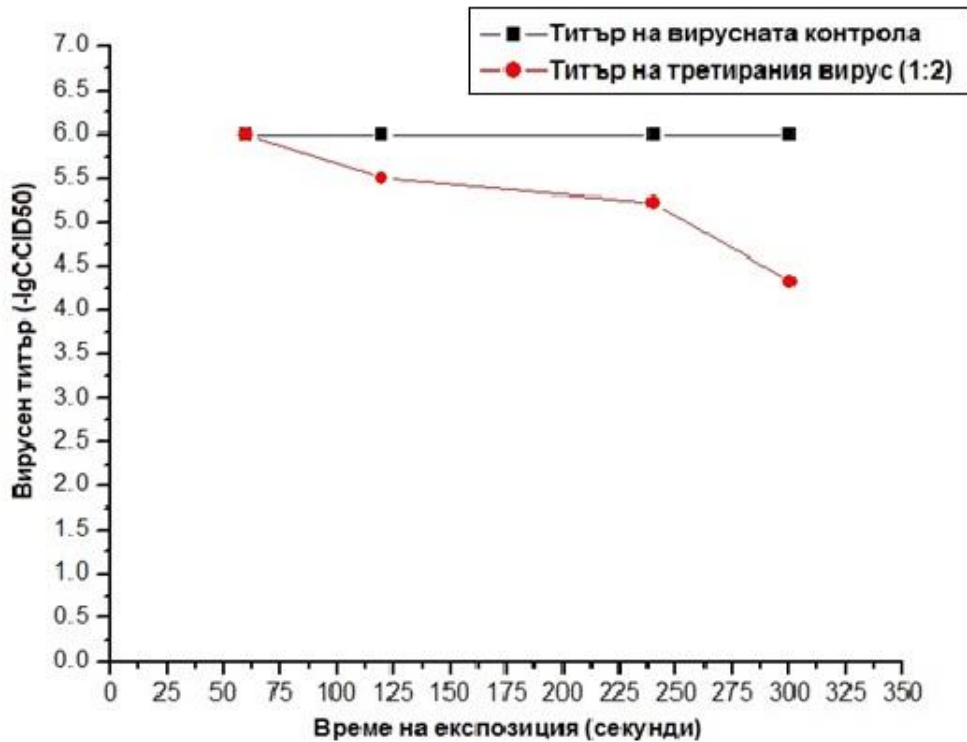
Фигура 15 Промяна в титъра на вирусната проба (●), разредена с дестилирана вода в съотношение 1:1 и третирана за определените времеви интервали при мощност на плазмения източник 13 W спрямо титъра на вирусната контрола (■)

От получените данни може да се направи извода, че при третиране на вирусната суспензия разредена в dH₂O в съотношение 1:1 и третирана при плазмена мощност 13 W, първите резултати се проявяват след 240-та секунда, като намалението на вирусния титър е с 0.48 log, при време на експозиция 300 секунди, вирусния титър намалява с 1.23 log.

Резултатите получени при третиране на вирусна съспензия разредена в съотношение 1:2 при плазмена мощност 13 W са представени в **таблица 10** и графично изобразени на **фигура 15**.

Таблица. 10 Промяна в титъра на вирусната проба, разредена с дестилирана вода в съотношение 1:2 и третирана за определените времеви интервали при мощност на плазмения източник 13 W

Времеви Интервали (секунди)	Титър на вируса контролата	на в	Титър на вируса в пробата	$\Delta \log$
60	6.00		6.00	0
120	6.00		5.50	0.50
240	6.00		5.23	0.77
300	6.00		4.33	1.67



Фигура 16. Промяна в титъра на вирусната проба (●), разредена в съотношение 1:2 с дестилирана вода и третирана за определените времеви интервали при мощност на плазмения източник 13 W спрямо титъра на вирусната контрола (■)

От получените данни се вижда, че първите резултати се установяват след 120-та секунда на третиране при разреждане 1:2, като вирусния титър намалява с 0.5 log. При времетраене на плазменото третиране 300 s вирусният титър намалява с 1.67 log

4. Определяне на тип и количество активни форми на кислород (ROS) продуцирани под въздействието на нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма

При прилагане на първата опитна постановка, описана в раздел **материали и методи**, бяха измерени стартовите сигнали, при които в системата присъства само H_2O_2 (0.001 мл; 50 mM). След добавяне на 0.05 мл от изследвания разтвор беше измерен и изходния сигнал. Отчетените резултати са представени в **таблица 11**.

Таблица 11. Сравнение на хемилуминесцентния сигнал преди и след добавяне на DMEM, 4% DMEM и PBS в присъствие на H_2O_2

Постановка	Стартов сигнал	Изходен сигнал
DMEM	1700 mV	80 mV
4% DMEM	1700 mV	200 mV
PBS.	1700 mV	470 mV

Получените резултати показват, че и трите изследвани разтвора имат силен гасителен ефект спрямо водородния прекис, като се вижда че най-силен ефект има DMEM, а най-слаб PBS. Като възможна причина за тази силна гасителна активност се приема богатия компонентен състав на всеки от разтворите. Изхождайки от получените данни преминахме към изследване на по-бедни по отношение на компонентния си състав разтвори.

Съпоставяйки получените данни, с резултатите получени от експериментите за цитотоксичното въздействие на плазмата и ниският процент протекция на клетките при изследване влиянието на плазмено третираната среда върху репликацията на HSV-1, съдим че хранителната среда, използвана в работните протоколи, има висок гасителен ефект върху получените радикали, което най-вероятно се дължи на богатия компонентен състав и наличието на витамини в използваната среда.

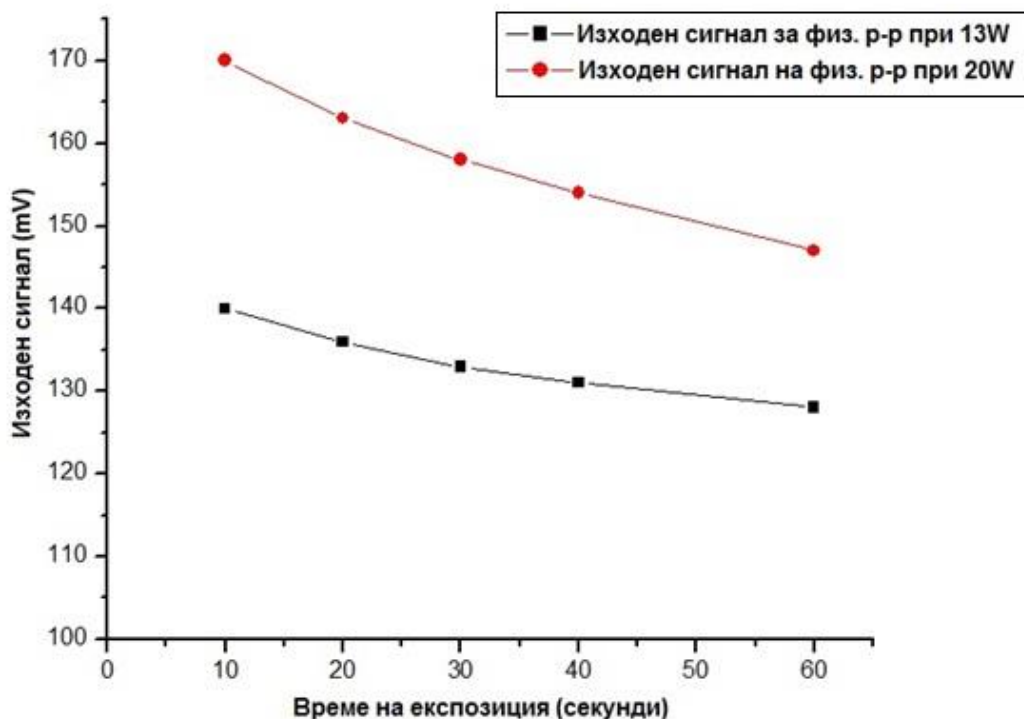
Беше изследвано влиянието върху хемилуминесцентния сигнал на третиран, с повърхнинновълнова нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма за различни времеви интервали (от 10 до 60 секунди) при две мощности 13 W и 20 W, физиологичен

разтвор. Беше приложена първата опитна постановка описана в раздел **материали и методи**.

Получените резултати са представени таблично в **таблица 12** и графично изобразени на **фигура 16**

Таблица 12. Ефект на третиран с плазма физиологичен разтвор върху хемилуминисцентния сигнал

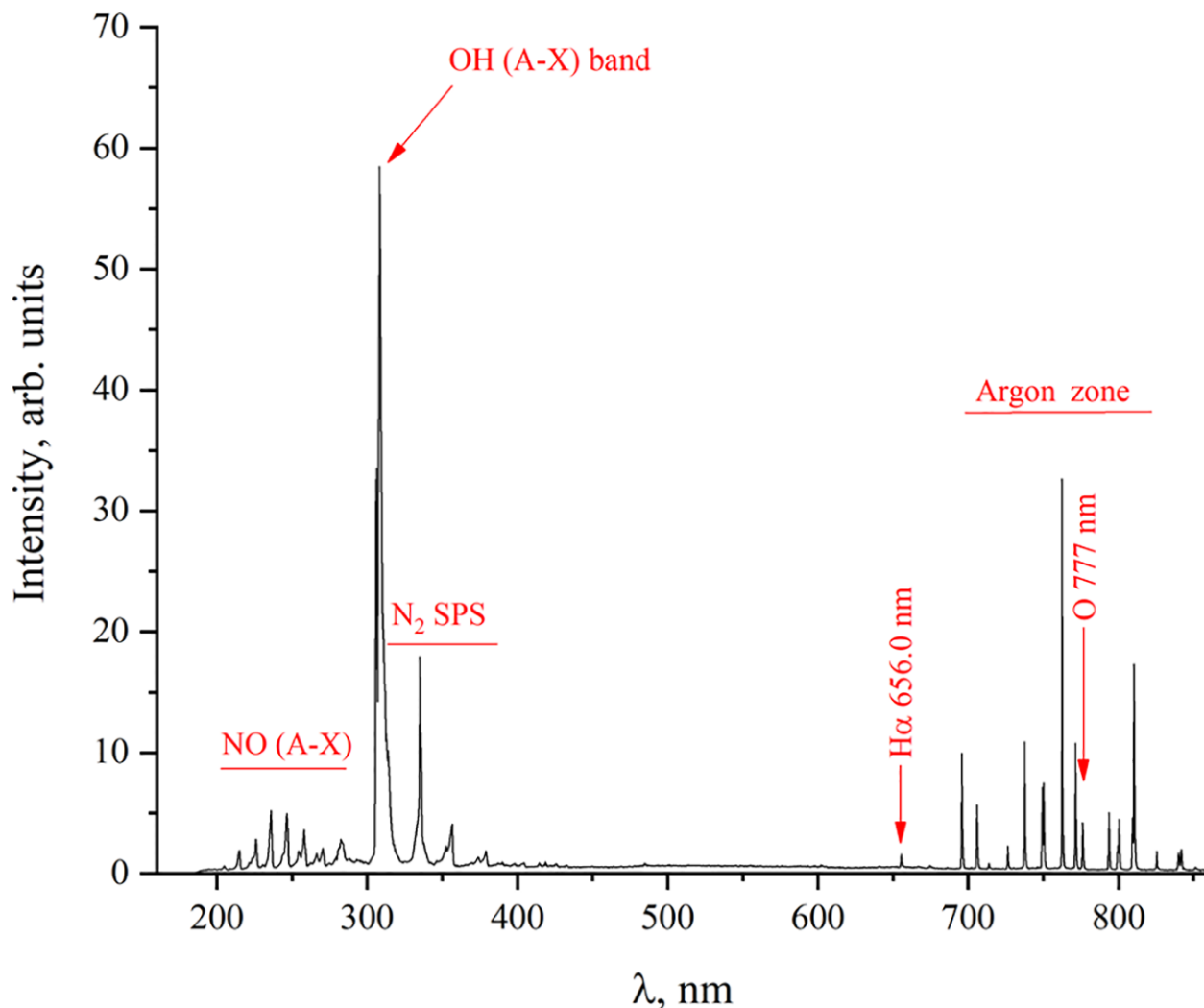
Време на експозиция (сек)	Получен сигнал при 13W (в mV)	Получен сигнал при 20W (в mV)
10	140	170
20	136	163
30	133	158
40	131	154
60	128	147



Фигура 17. Ефект на третиран с плазма физиологичен разтвор върху хемилуминисцентния сигнал

Получените резултати подкрепят теорията за гасителният ефект на многокомпонентните разтвори. Данните сочат, че при ранните интервали на облъчване нивата на активни кислородни форми (в частност H_2O_2) са по-високи. Понижаването на сигнала в последствие, може да се обясни с взаимодействието на прекиса с хлоридните йони в разтвора и получаване на хипохлоридни йони

След проведени изследвания, фокусирани върху емисионния спектър на получената плазма, станва ясно че ROS (Reactiv Oxygen Species) присъстват в системата. Става ясно и че ОН радикали се наблюдават с голям интензитет на мястото на контакт вода-плазма, поради дисоциацията на водните молекули. Концентрацията на ОН зависи от контактната повърхностна площ на плазма и вода, както и от приложената мощност използвана за получаване на плазма. Подобни изследвания проведени в отсъствието на вода, показват че не се наблюдава промяна на температурата или радикалите. Атомния кислород не допринася за промяна на изходната плазма.



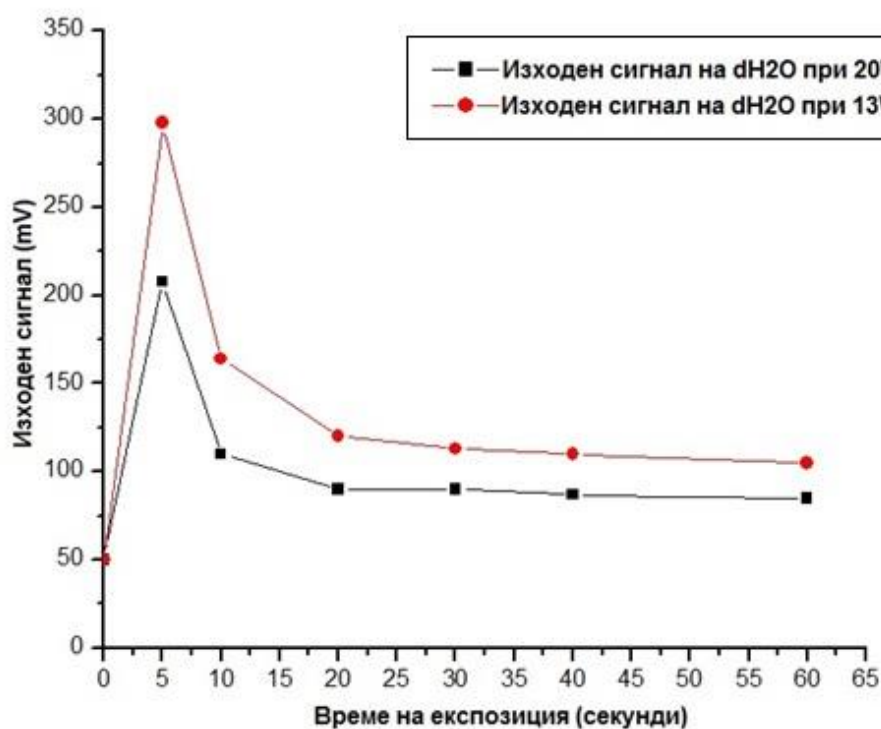
Фигура 18. Оптичен емисионен спектър при контакт на повърхността плазма-вода (Tsvetkov V., et all; Effect of Plasma-Activated Medium and Water on Replication and Extracellular Virions of Herpes Simplex Virus-1; 2020; Plasma Medicine, 10(1):15-26 (2020))

В нашите експерименти беше определено влиянието на студена плазма върху тип и количество на активни форми на кислород (ROS) при третиране на дестилирана вода чрез използване на хемилуминисцентната система, описана в раздел **материали и методи**. Изходният сигнал беше измерван на всеки 10 секунди след като беше третирана с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма за различни времеви интервали (от 10 до 60 секунди) при две плазмени мощности – 13 W и 20 W, като приложихме първата

опитна постановка описана в раздел материали и методи. Резултатите са представени в **таблица 13** и изобразени графично на **фигура 18**

Таблица 13 Влияние на dH₂O върху хемилуминисцентния сигнал

Време на експозиция (сек)	Получен сигнал при 20W (в mV)	Получен сигнал при 13W (в mV)
0	50	50
5	208	298
10	110	164
20	90	120
30	90	113
40	87	110
60	85	105



Фигура 19. Влияние на dH₂O върху хемилуминисцентния сигнал

От резултатите се вижда, че при малките времеви интервали на третиране количеството на активни форми на кислород е най-високо. Вероятно на това се дължи по-силният вирусоциден ефект при разреждане на вирусната суспензия в съотношение 1:2 с

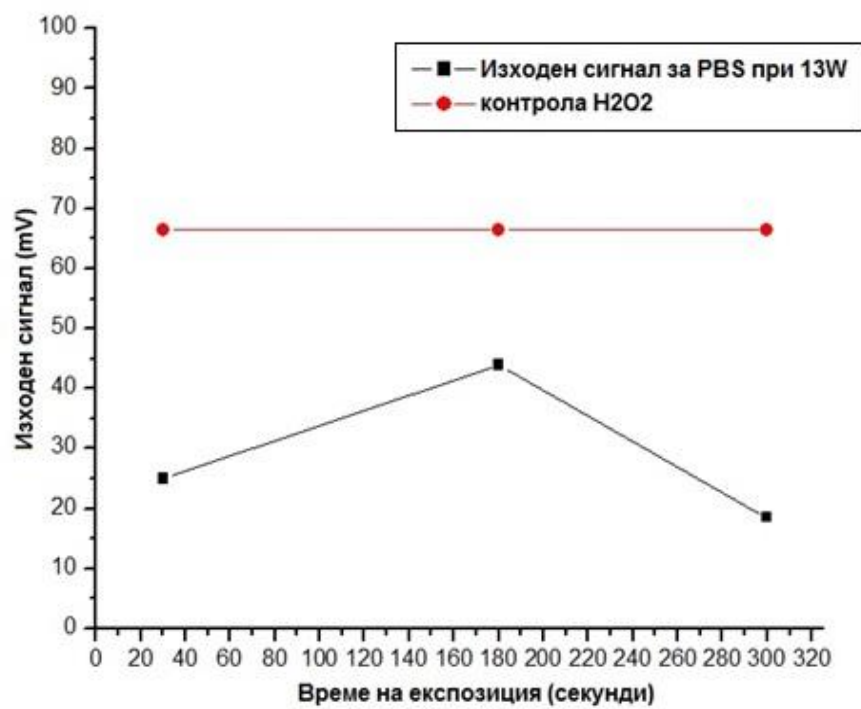
dH₂O. Намалването на количеството на активните форми на кислород при продължително третиране би могло да се дължи на взаимодействие с азота от атмосферата и образуването на нитрати и нитрити.

За изследване на влиянието на PBS върху хемилуминесцентния сигнал, използвахме подсилена хемилуминесценция, за получаване на по ясен сигнал. Разтвора беше третиран за 30 сек., 180 сек. и 300 сек. при плазмена мощност 13 W. Метода е описан като втора опитна постановка в раздел **материали и методи**.

Резултатите са представени в **таблица 14** и онагледени на **фигура 19**.

Таблица 14. Влияние на PBS върху хемилуминесцентния сигнал

Време на експозиция (сек)	Изходен сигнал за PBS при 13W (в mV)
30	25
180	44
300	18,5



Фигура 20. Влияние на PBS върху хемилуминесцентния сигнал

Една от възможните причини за промяна на количеството на активните форми на кислород при 180-та секунда и рязкото намаляване след това.

5. Заключение

Представителите на семейство Herpesviridae са едни от най-разпространените вируси в природата. Изолирани от всички гръбначни животни, те предизвикват заболявания, протичащи с различна сила и клинична картина – от безсимптомни инфекции и самоограничаващи се по кожата лезии, до тежки генерализирани инфекции, менингити, енцефалити и злокачествени новообразувания.

В борбата с херпесните инфекции се прилагат различни медикаменти, като с най-широко приложение са нуклеозидните аналози, които предизвикват дефекти в репликацията на вирусната нуклеинова киселина. Съществен проблем, свързан с въздействието на този клас медикаменти е тяхната зависимост от вирусния ензим тимидинкиназа. Друг недостатък на посочените лекарствени препарати е предизвикването на лекарствена резистентност. Все по-голям интерес представляват фитопродуктите, т.е. биологично активни вещества, съдържащи се в растенията. Тоталните растителни екстракти, поради факта, че съдържат повече от едно биологично активно вещество, имитират комбинирана терапия, което е и основен подход за преодоляване на появата на лекарствена резистентност. Предвид изложеното се насочихме към изследване на антихерпесното действие на екстракти от *Vaccinium vitis-idaea* L., *Astragalus glycyphyllos* L. и *Artemisia chamaemelifolia* Vill. Най-силен протективен ефект беше отчетен при въздействието на инокулирани с HSV 2 (DD) клетки и третиран с тоталният екстракт от *Vaccinium vitis-idaea* L., от растения събрани от Стара планина – 98%. Екстрактите получени от другите изследвани от нас растения, показаха около 70% протекция спрямо HSV-1 (F) и HSV-2 (DD).

Развитието на технологиите дава възможност за изследването и прилагането на различни методи за проследяване въздействието им върху вирусни и бактериални инфекции *in vitro* и *in vivo*. Технологиите, базирани на плазма, заемат все по-голямо място в иновативните методи за лечение. Една от най-бързо развиващите се области в плазмената технология е така наречената плазмена медицина, нововъзникваща област на медицината, в която се използва способността на неравновесните плазми да инициират, контролират и катализират различни сложни поведения и реакции в биологичните системи. Неравновесните плазми са щадящи за тъканите, безопасни и ефективни при въздействие върху бактериални и вирусни патогени.

При изследване ефектът на активирана чрез плазмен източник (разработен от екип български учени) хранителна среда върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV- 1 щам F, беше установено, че третираната среда не осъществява протекция на инокулираните с вирус клетки. Допускаме, че това се дължи на високият гасителен ефект на многокомпонентните разтвори върху наличието и продължителността на живот на кислородните радикали генерирани от плазмения източник.

При изследване на вирусоцидното действие на плазмено третирана вирусна суспензия, разрежена в съотношение 1:2 с dH₂O, беше установено намаляване в титъра на вирусната проба, спрямо контролата с 1.67 log. Това отново потвърждава предположението ни, че монокомпонентните разтвори генерират кислородни радикали в по-голяма степен, които са в основата на вирусоцидното действие.

Предвид възникналата пандемия от COVID-19, се появи глобална нужда от ефективни, евтини, лесни за производство и достъпни лични предпазни средства (маски за лице), чрез които да се намали предаването на патогени разпространяващи се по еерозолен път. Във връзка с това част от изследователските лаборатории насочиха силите си в определяне

степената на ефективност на предпазни маски за лице. Екипът на лаборатория Вирусология се включи в общите усилия за определяне на ефективността на произведените и предлагани маски за лице с филтрираща ефективност. От над 90 предоставени ни за изследване лицеви маски с филтрираща ефективност, след провеждане на експериментите за определяне степената на протекция чрез прилагане на модифициран VFE метод, резултатите показаха, че филтриращите лицеви маски тип FFP осигуряват най - голяма степен на защита в сравнение с Обществените лицеви маски, като филтриращата ефективност е 99%.

6. ИЗВОДИ

От получените резултати при изследване въздействието на растителни екстракти върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесен вирус тип 1, щам F и ацикловир резистентен херпесен вирус тип 2, щам DD могат да бъдат направени следните изводи:

1. При сравняване на експерименталните данни получени за стойностите k_d ЦК₅₀ при изследване на екстракти от *Vaccinium vitis-idaea L.*, беше установено, че най-голяма цитотоксичност проявяват екстрактите от фракция В (St.pl.B), а най-малка тоталният екстракт (St.pl.T) . Построената йерархична редица на изследваните екстракти получени от *Vaccinium vitis-idaea L.* изглежда по следния начин:
 - i. St.pl.B >Rod.B >St.pl.C >Rod.C >Rod.T >St.pl.T
2. След проведените експериментални постанови за определяне на антивирусната активност на екстракти от *Vaccinium vitis-idaea L.* беше установено, че един от тях проявява най-голям процент клетъчна протекция. Тоталния екстракт от Стара планина в МНК проявява 74.44 % протекция на клетъчния монослой инфектиран с HSV-1 (F) . Достигната е ИК₅₀ 1.27 мг/мл и е определен селективен индекс 0.13. При втория тотален екстракт Rod.T процента протекция в неговата МНК е 19,96%, което би могло да означава, че почвеният състав оказва влияние върху състава на БАВ съдържащи се в растението. При експериментите проведени с HSV-2 (DD), екстрактът показва 98% протекция и достига ИК₅₀ от 2.09 мг/мл. Селективният индекс е 0,22

3. При отчитането на резултатите получени при въздействието на екстрактите спрямо извънклетъчните вириони на *HSV-1* (F), разлика в титрите на третирувания вирус и вирусната контрола не се наблюдава.
4. При определяне преживяемостта на третирувани с метанолов обезмаслен извлек от надземни части на *Astragalus glycyphyllos* L., клетки от клетъчна линия MDBK беше определена максимално нетоксичната концентрация- 1мг/мл. ЦК₅₀ е 2,52 мг/мл
5. След проведените експериментални постановки за определяне на антивирусната активност на екстракта от *Astragalus glycyphyllos* L., беше установена проявата на определена клетъчна протекция. Екстрактът в МНК проявява 74.49 % протекция на клетъчния монослой инфектиран с HSV-1 (F) . Достигната е ИК₅₀, 0.6721 мг/мл и е определен селективен индекс 0.26. При използване на HSV-2 (DD), екстрактът показва протекция и достига ИК₅₀ от 0.378 мг/мл. Селективният индекс е 0.15. Спрямо същият щам АЦВ не показва протективно действие. От получените данни за селективен индекс може да се заключи, че екстрактът не проявява строго селективно действие по отношение на един от двата използвани щама.
6. При отчитането на резултатите за въздействието на екстракта от *Astragalus glycyphyllos* L. спрямо извънклетъчните вириони на *HSV-1* (F) и HSV-2 (DD), разлика в титрите на третирувания вирус и вирусната контрола не се наблюдава.
7. След провеждане на експериментите за определяне степента на протекция на лични предпазни средства чрез прилагане на модифициран VFE метод., резултатите показват че филтриращите лицеви маски тип (FFP) осигуряват по голяма степен на защита в сравнение с Обществените лицеви маски, като филтриращата ефективност е 99%.
8. При изследване на цитотоксичното въздействие на използваната нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма, само при две от експерименталните постановки се достига до под 50 % преживяемост на клетъчния монослой - при поддържане на

клетките с 0.2 мл третирана среда и плазмена мощност 20 W и при 0.2 мл третирана среда и плазмена мощност 15 W. Тези стойности се достигат съответно при 232 сек. на третиране и при 258 сек. на третиране.

9. При нито една от опитните постановки не се наблюдава значителен процент протекция върху клетъчния монослой. Най-висок процент протекция се достига при плазмена мощност 13 W и последователно третиране на средата без последващо отстраняване на същата. Най-малък процент протекция на клетките се установява при 13 W плазмена мощност и отстраняване на третираната среда след 5 мин. и заменянето ѝ с нетретирана.
10. От получените резултати за вирусоцидното действие на плазмено третирана вирусна суспензия, може да се направи извода, че при третиране на вирусната суспензия разредена в dH₂O в съотношение 1:1 и третирана при плазмена мощност 13 W, първите резултати се проявяват след 240-та секунда, като намалението на вирусния титър е с 0.48 log, при време на експозиция 300 секунди, вирусния титър намалява с 1.23 log.
11. При изследване на вирусоцидното действие на плазмено третирана вирусна суспензия, разредена в съотношение 1:2 с dH₂O, беше установена намаляване в титъра на вирусната проба, спрямо контролата с 1.67 log.
12. При изследване на тип и количество активни форми на кислород, получени при третиране с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма в присъствие на H₂O₂ и при използване на опитна постановка, включваща луцигенин, беше установен силен гасителен ефект на среда DMEM и среда DMEM (с 4% FBS).
13. Резултатите от изследване влиянието на третиран с плазма физиологичен разтвор върху хемилуминесцентния сигнал, при прилагане на първата опитна постановка в присъствие на луцигенин, показаха, че при ранните интервали на измерване нивата на активни форми на кислород (в частност H₂O₂) са по-високи.

14. При изследване влиянието на третирана с плазма dH₂O върху хемилуминесцентния сигнал, при прилагане опитна постановка в присъствие на луцигенин, беше установено силно понижение на активните форми на кислород след кратките времеви интервали на третиране, което би могло да се обясни с взаимодействието на формираните радикали с азота от атмосферата и образуването на нитрати и нитрити.

15. При изследване на влиянието на PBS върху хемилуминесцентния сигнал и използване на подсилена хемилуминесценция с участието на луминол беше установено намаляване на изходния сигнал при използване на 13 W плазмена мощност.

16. Съпоставяйки получените данни, с резултатите получени от експериментите за цитотоксичното въздействие на плазмата и ниският процент протекция на клетките при изследване влиянието на плазмено третираната среда върху репликацията на HSV-1, съдим че хранителната среда, използвана в работните протоколи, има висок гасителен ефект върху получените радикали, което най-вероятно се дължи на богатия компонентен състав и наличието на витамини в използваната среда.

7. Декларация за оригиналност (Приноси)

1. Отчетен беше сравнително силен протективен ефект при въздействието на инокулирани с HSV 2 (DD) клетки и третирани с тоталният екстракт от *Vaccinium vitis-idaea* L ., от растения събрани от Стара планина – 98% . Екстрактите получени от другите изследвани от нас растения, показаха около 70% протекция спрямо HSV-1 (F) и HSV-2 (DD).
2. За първи път в световен мащаб е изследвано въздействието на третирани с повърхнинновълнова неравновесна газоразрядна плазма (конструирана от български екип учени) хранителна среда и вода, за антивирусно и вирусоцидно действие. При изследване на вирусоцидното действие на плазмено третирана вирусна суспензия, разрежена в съотношение 1:2 с dH₂O, беше установен о намаление на титъра на вируса във вирусната проба, спрямо контролата с 1.67 log.
3. Екипът на лаборатория Вирусология се включи в общите усилия за определяне на ефективността на произведените и предлагани маски за лице с филтрираща ефективност. От над 90 предоставени ни за изследване лицеви маски с филтрираща ефективност, след провеждане на експериментите за определяне степента на протекция чрез прилагане на модифициран VFE метод , резултатите показаха, че филтриращите лицеви маски тип FFP осигуряват най - голяма степен на защита в сравнение с Обществените лицеви маски, като филтриращата ефективност е 99%. Достоверността на получените чрез този метод резултати са потвърдени от сертифицирана европейска лаборатория.

8. Публикации свързани с дисертационния труд

1. Angelova, P., A. Hinkov, V. Tsvetkov, D.Todorov, K. Shishkova, D. Dragolova, S. Shishkov, V.Карчина-Toteva. 2018. Antiherpes virus activity of extracts from *Artemisia chamaemelifolia* Vill. Compt. Rend. l'Acad. Bulg. Sci., Vol 72, No11, pp.1475-1483.

IF2017 = 0.251; SJR2017 = 0.21 Q2

2. Tsvetkov V., A. Hinkov, D. Todorov, E. Benova, I. Tsonev, T. Bogdanov, S. Shishkov, K. Shishkova 2020. Effect of plasma-activated medium and water on replication and extracellular virions of Herpes Simplex Virus-1. Plasma Medicine, Vol 10, pp.15-26
IF2022=0.83; SJR2022=0.264 Q3

3. Tsvetkov V., D. Todorov, A. Hinkov, K. Shishkova, S. Shishkov 2022. Study of community face coverings and commercially available face masks using a modified viral filtration method. Annual of Sofia University "St. Kliment Ohridski" Faculty of Biology, Book 4, volum 107, pp. 124-131