

**До проф. Христо Гагов,**  
Председател на научно жури,  
определено със заповед № РД-38-404 от 13.07.2022 г.  
на Ректора на Софийски Университет „Св.Климент Охридски“  
проф. Анастас Герджиков, дфн

## **РЕЦЕНЗИЯ**

от **проф. д-р Нели Стоянова Корсун, дмн,**  
на дисертационния труд на **Венелин Венциславов Цветков -**  
редовен докторант в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“  
на тема *„Изследване въздействието на физични и биологични фактори върху*  
*реализацията на херпесни вируси”*  
за получаване на образователна и научна степен **„доктор”** по професионално направление  
4.3. Биологически науки (Вирусология)

Като член на научното жури декларирам, че нямам с докторанта общи публикации и участия в научни форуми и проекти.

### **Кариерно развитие на докторанта**

Венелин Цветков е роден през 1993 г. Завършва средно образование в Математическата гимназия „Гео Милев“ гр. Плевен през 2012 г. От 10.2012 до 07.2016 г. е студент-бакалавър по молекулярна биология в Биологическия факултет на СУ „Св.Климент Охридски“, след което завършва магистратура по вирусология в същия факултет през 02.2018 г. Успехът му по време на магистратурата е отличен 6.00. От 17.07.2018 г. е редовен докторант в Лаборатория Вирусология на Биологическия факултет към СУ. По време на обучението си като докторант полага всички пет изпита от индивидуалния си план с отличен успех. От 07.2017 до 12.2019 г. работи като биолог в СМДЛ „Рамус“, София, а от 12.2019 до настоящия момент е монитор клинични проучвания. Владее английски език на ниво B2.

### **Актуалност на темата на дисертационния труд**

Високата заболяемост от херпесни инфекции, протичащи в редица случаи с тежки клинични прояви (енцефалит, менингит, кератит и др.), появата на резистентност на вирусите-причинители към съществуващите антивирусни лекарствени препарати и значителната токсичност на някои от тях поддържат актуалността на научната проблематика, насочена към откриването на нови антивирусни агенти с добър терапевтичен ефект. Проучването на природни продукти на растителна основа би довело до идентифициране на биологично активни субстанции с желано антихерпесно действие, но с по-слаба токсичност в сравнение със синтетичните препарати. Изследването на

въздействието на физични фактори като ниско-температурна плазма върху репликацията на херпесните вируси би предложило алтернативен подход в лечението на тези инфекции.

### **Обща характеристика на дисертационния труд**

Дисертационният труд е структуриран съгласно изискванията на Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). Той е с обем от 123 стр. Съдържа: заглавна страница; съдържание (3 стр.); използвани съкращения (3 стр.); въведение (2 стр.); литературен обзор (42 стр.); цел и задачи (2 стр.), материали и методи (19 стр.); резултати и обсъждане (31 стр.); заключение (2 стр.); изводи (4 стр.); декларация за оригиналност (приноси) (1 стр.); публикации, свързани с дисертационния труд (1 стр.); използвана литература (12 стр.). Съотношението между отделните раздели на дисертационния труд отговаря на приетите изисквания. Изложението е онагледено от 23 таблици и 31 фигури.

### **Преглед и оценка на дисертационния труд**

Във *въведението* е разгледана класификацията на херпесните вируси и са представени данни за широкото разпространение херпес-симплекс вирусите (HSV), както и за високата заболяемост от тези инфекции. Акцентуирано е на необходимостта от разработване на нови препарати с антивирусна активност, които да не са зависими от ензима тимидин-киназа и да са по-слабо токсични.

*Литературният обзор* е подробен, информативен, добре структуриран. В началото са представени исторически сведения за херпесните вируси и подробна класификация на 3-те подсемейства херпесни вируси. Разгледани са в детайли морфологията, геномът и капсидът на тези вируси. Значително място е отделено на репликацията на HSV и на неговата латентност. Важен раздел в обзора е посветен на имунния отговор на човешкия организъм спрямо инфекция с HSV, профилактиката и терапията на тези инфекции. Пряко свързан с темата на дисертацията е разделът «Инхибитори на вирусния репликативен цикъл», в който са разгледани противохерпесни инхибитори със синтетичен произход (пиримидинови и пуринови аналози) и инхибитори с природен произход. Приведени са многобройни примери за установена антихерпесна активност на екстракти от редица растения, което говори за добрата осведоменост на дисертанта по тази тема. Като иновативен подход в антихерпесната терапия е представена нискотемпературната неравновесна плазма, действието на която е проучено при различни вируси: норовируси, аденовируси, грипни и парагрипни вируси, HSV и др. В този раздел на обзора не всички съобщени данни са подкрепени с цитати, а някои цитати не отговарят на текста, към който са посочени. Липсва позоваване на литературни източници и в раздела за приложението на лични предпазни средства (маски). Не са посочени механизмите на вирусцидното действие на нискотемпературната неравновесна плазма. Като изключим тези пропуски, може да се направи заключение, че обзорът е компетентно написан и свидетелства за отличната

литературна осведоменост на докторанта, умението му да систематизира, обобщава и интерпретира съществуващата научна информация по проблема.

Собствените проучвания на докторанта започват с глава 3. *Цел и задачи*. Целта на дисертационния труд е изследване въздействието на растителни екстракти и третирани с нискотемпературна неравновесна газоразрядна плазма (ННГП) разтвори върху репликацията и извънклетъчните вириони на човешки херпесни вируси. Определяне степента на протекция на лични предпазни средства. Точно и ясно са формулирани 3 задачи със седем подзадачи, които включват основните направления в изследователския процес.

За постигане на поставените цели дисертантът използва главно вирусологични *методи*, базирани на клетъчно култивиране. Методите са подбрани правилно с оглед на поставените задачи. За всеки изследван биологичен и физичен фактор се изследва първоначално възможното му токсическо въздействие върху клетъчна култура (преживяемост), след което се оценява антивирусното му действие. Проучени са екстракти на три растителни вида и ННГП и тяхното вирусоцидно действие спрямо два представителя на херпесните вируси – HSV-1 (щам F) и HSV-2 (щам DD), който е ацикловир-резистентен. Като референтен инхибитор е използван ацикловир. Методите са описани много подробно, което позволява тяхното възпроизвеждане. Не е добре обяснена необходимостта от изследване на активните форми на кислород, продуцирани под въздействието на ННГП. Такова обяснение би трябвало да присъства в литературния обзор.

В раздела „*Резултати и обсъждане*“ са представени последователно всички опитни постановки и резултатите от тях. Графичните изображения на получените данни онагледяват много добре текста и подкрепят направените анализи.

При изследване на 6 екстракта от плодовете на диворастяща червена боровинка *Vaccinium vitis-idaea L.* (сем. *Ericaceae*), събрани в Стара планина и Родопите, се установява, че двата тотални екстракта имат най-ниска цитотоксичност. Инхибираща концентрация (ИК<sub>50</sub>), която инхибира с 50% репликацията на HSV-1 (F), е достигната само при тоталния екстракт от Стара планина (1,27 мг/мл), при който максималната нетоксична концентрация (МНК) е 6 мг/мл. При въздействие на този екстракт върху репликацията на HSV-2 (DD) е достигната ИК<sub>50</sub> от 2.09 мг/мл. Тоталният екстракт от Стара планина осигурява 74,4% и 98% протекция спрямо първия и втория щам на HSV, съответно, когато е в МНК. За сравнение при ацикловир е установена протекция в МНК от 100% и 10%, съответно.

При изследване на растението *Astragalus glycyphyllos L.* (метанолов обезмаслен извлек) е установена ИК<sub>50</sub> от 0,671 мг/мл спрямо HSV-1 (F) и 0.378 мг/мл. спрямо HSV-2 (DD). В МНК от 1 мг/мл екстрактът осигурява 74,49% протекция спрямо първия моделен вирусен щам и около 70% спрямо втория, т.е. екстрактът не проявява строго селективно действие по отношение на двата използвани щама.

Изследвани са воден извлек и хлороформен соксклет екстракт на растението *A. chamaemelifolia Vill.* Единствено при водния екстракт, когато е приложен в МНК, се отчита сравнително добър протективен ефект спрямо HSV-1 (F) и HSV-2 (DD) – 69,32% и 67,72%, съответно. Достигната е ИК<sub>50</sub> от 0,58 мг/мл и 0,62 мг/мл спрямо двата щама на HSV-1 и HSV-2, съответно, а МНК е 1 мг/мл. За разлика от водния екстракт, хлороформеният

соксклет екстракт проявява много слаба активност спрямо изследваните два щам на HSV-1 и HSV-2.

В дадения раздел присъстват анализи и обсъждане на собствените резултати. Обаче липсва сравняване с резултатите на други изследователи, които са провеждали сходни изследвания за установяване на антивирусно действие спрямо HSV на други растителни екстракти. В референтния списък са посочени няколко такива литературни източници, с чийто данни докторантът би могъл да съпостави собствените резултати. Подобни сравнителни анализи биха помогнали да се оценят нивата на протекция, получени при изследваните растения в настоящето проучване. Освен това на няколко места в изложението има повторение на еднакви текстови абзаци (стр. 10, 32, 69 и 71).

Сравнителни анализи с литературни данни липсват и в следващото проучване, целящо определяне степента на протекция на лични предпазни средства (лицеви маски). Изследването на защитните свойства на лицевите маски по отношение на SARS-CoV-2 беше от изключителна важност в началото на COVID-19 пандемията, когато имаше много противоречиви мнения по този въпрос. От тази гледна точка проведеното проучване е актуално и с голямо практическо значение. От приведените резултати в таблица 15 не става ясно каква е разликата между маски CFC1-10. В заключението на дисертационния труд е показано, че са изследвани над 90 лицеви маски, а в таблица 15 (показателите са на английски език) са приведени данни за 15 маски. Използваният термин „обществени лицеви маски“ не е много подходящ – вероятно се има предвид платнени лицеви маски, за разлика от медицинските (хирургически) и филтриращите.

Установените антивирусни ефекти на ННГП предлагат иновативен подход в лечението на херпесните заболявания (например херпесен кератит), който до сега не е прилаган в България. Като частично йонизиран газ, съставен основно от фотони, йони и свободни електрони, плазмата съдържа и биологично активни атоми (O и N), молекули (напр. O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и HNO<sub>2</sub>) и радикали {OH, NO и [O<sub>2</sub>(a1Δg)]}, с които се свързват нейните антибактериални и антивирусни ефекти. Докторантът е разработил подходящ алгоритъм за изследване на ефекта на ННГП върху репликацията на HSV. Първоначално се определя цитотоксичното въздействие на хранителна клетъчно-културелна среда, третирана с такава плазма, т.е. определя се времето на въздействие, при което се установява 50% клетъчна преживяемост, като се оценява значението на мощността на плазмения източник и необходимостта от разреждане на третираната с нетретирана хранителна среда. След определяне на подходящите условия се изследва въздействието на третирана с ННГП хранителна среда върху репликацията на HSV-1 (F). При нито една от 5-те опитни постановки не се наблюдава значителен процент протекция върху клетъчния монослой. Направен е извод, че третирането на хранителна среда с ННГП не оказва влияние върху репликацията и извънклетъчните вириони на HSV-1 (F). Дисертантът извършва подобни изследвания, като разрежда вирусната суспензия от HSV-1 (F) с дестилирана вода 1:1 и 1:2, след което тя се третира в активната зона на пламъка в различни времеви интервали. При третиране на вирусната суспензия, разреждана с дестилирана H<sub>2</sub>O в съотношение 1:1 и 1:2 и третирана при плазмена мощност 13 W, се установява максимална редукция на вирусния

титър с 1.23 log и 1.67 log, съответно при време на експозиция 300 сек. След това дисертантът определя ролята на активните форми на кислород, продуцирани под въздействието на ННГП, за антивирусните ефекти, както и техния тип и количество. Въз основа на проведените изследвания дисертантът прави извод, че количеството на активните форми на кислород е най-високо при малките интервали на третиране (5-10 сек.), след което то намалява при по-продължително третиране поради взаимодействие с азота от атмосферата и образуването на нитрати и нитрити. Това обяснение обаче противоречи на факта, че най-силен вирусоциден ефект е получен при разреждане на вирусната суспензия в съотношение 1:2 с дестилирана H<sub>2</sub>O при време на експозиция 300 сек. Как може да се обясни този факт?

В края на дисертационния труд докторантът представя *заключение*, в което обобщава основните резултати, постигнати в изследванията. Направени са 19 *извода*, които в синтезиран вид повтарят получените резултати при всички проведени експерименти. Според мен би могло да се посочи като извод, че тоталният екстракт от плодовете на диворастваща червена боровинка *Vaccinium vitis-idaea* L. (сем. *Ericaceae*), събрани в Стара планина и в по-малка степен екстрактите на другите изследвани растения са перспективни в лечението на заболявания, причинени от ацикловир-резистентни щамове на HSV-2.

Приемам посочените от дисертанта три *приноса*. Според мен първите два приноса са с оригинален характер, а третият е с научно-приложен характер.

Използваните *литературни източници* са 155, от които 16 са от български автори, а 4 са на български език. Само 7 (4,5%) публикации са от последните 10 год. (2012-2021 г.).

### **Оценка на автореферата**

Авторефератът е с обем 62 стр. Съдържанието му представя в систематизиран вид основните резултати от дисертационния труд.

### **Публикационна активност и съответствие с минималните национални изисквания**

Във връзка с темата на дисертацията има отпечатани 3 пълнотекстови научни публикации. Две от публикациите са в списания с импакт фактор: *Compt. Rend. l'Acad. Bulg. Sci.* с IF<sub>2018</sub> 0,251 (Q2) и *Plasma Medicine* с IF<sub>2020</sub> 0,828 (Q3). Третата статия е публикувана в списание Годишник на СУ „Св. Кл. Охридски“, Биологически факултет=Annuaire de l'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski". Faculte de Biologie (ISSN 0204-9902), което присъства в Националния референтен списък на съвременни български научни издания с научно рецензиране. В две от публикациите дисертантът е първи автор. Той покрива и надхвърля минималните национални изисквания за придобиване на образователната и научна степен (ОНС) „доктор“, посочени в Правилника за прилагане на ЗРАСРБ (изм. и доп., ДВ, бр. 15 от 19.02.2019 г.): група А (дисертационен труд – 50 точки) и група Г (изисквани 30 точки). Дисертантът има една публикации в списание с Q2 (20 точки) и една публикация в списание с Q3 (15 точки). Така той събира 50 точки по показател А и 35 точки по показател Г. Той покрива и специфичните минимални изисквания към кандидатите за

придобиване на ОНС «доктор» в СУ «Св.Кл.Охридски»: минимум 2 публикации, от които поне 1 публикация от група I (публикации в списания от Q1 и Q2) или група II (публикации в списания от Q3 и Q4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Венелин Венциславов Цветков е актуален, отлично изпълнен с някои забележки по оформлението. Проведени са трудоемки научни изследвания, изискващи голяма прецизност и опит, включително с използване на иновативен метод, приложен за първи път в нашата страна. Получените от докторанта резултати представляват съществен принос в усилията за откриване на нови антивирусни препарати в областта на херпесните заболявания. Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания по темата на дисертацията и способност за самостоятелни научни изследвания. Дисертационният труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ (изм. и доп. ДВ. бр.15 от 19 февруари 2019 г.), на Правилника за прилагането му и на Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски“. Давам положителна оценка и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Венелин Венциславов Цветков образователната и научна степен „Доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки (Вирусология).

30.09.2022 г.

.....

/проф. д-р Н. Корсун, дмн/

**Член на научното жури:** проф. д-р Нели Стоянова Корсун, дмн

*Научна специалност:* Вирусология

*Адрес и контакти:* Отдел Вирусология,

Национален център по заразни и паразитни болести

бул. “Столетов“ 44А, гр. София 1233

Електронни адреси: neli\_korsun@abv.bg; korsun@ncipd.org

Телефон: (02) 9318132