

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
**ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ “СТЕФАН АНГЕЛОВ”**

**Нели Миленова Вилхелмова-Илиева**

**Комбиниран ефект на елагитанини и ацикловир  
върху репликацията на вируси херпес симплекс**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане на  
образователна и научна степен “Доктор”**

**(Научна специалност 01. 06. 13. Вирусология)**

**Научен ръководител:**  
**Акад. Ангел Симеонов Гълъбов, дмн**

**София, 2012**

## Съдържание

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Използвани съкращения                                                                                | 3  |
| Увод                                                                                                 | 4  |
| 1. Цел и задачи                                                                                      | 4  |
| 2. Материали и методи                                                                                | 5  |
| 2.1. Материали                                                                                       | 5  |
| 2.2. Методи                                                                                          | 6  |
| 3. Резултати                                                                                         | 9  |
| 3.1. Ефект върху репликацията на HSV-1 и HSV-2                                                       | 9  |
| 3.1.1. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните елагитанини                       | 9  |
| 3.1.2. Антихерпесвирусна активност на елагитанините срещу HSV                                        | 10 |
| 3.1.3. Проучване на начина на действие на касталагин върху репликацията на HSV-1 (щам Victoria)      | 12 |
| 3.1.3.1. Влияние на касталагина върху извънклетъчните HSV-1 вириони (щам Victoria)                   | 12 |
| 3.1.3.2. Влияние на касталагина върху адсорбцията на HSV-1 (щам Victoria)                            | 13 |
| 3.1.3.3. Определяне кинетиката на ефекта на касталагин върху репликацията на HSV-1 щам Victoria      | 13 |
| 3.2. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV                                             | 14 |
| 3.2.1. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу HSV-1 щам Victoria                  | 14 |
| 3.2.2. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу HSV- 2 щам Bja                      | 14 |
| 3.2.3. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу резистентния на ACV HSV-1 щам R-100 | 14 |
| 3.2.4. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу резистентния на ACV HSV-2 щам PU    | 21 |
| 3.2.5. Определяне на комбинираната цитотоксичност                                                    | 21 |
| 4. Изводи                                                                                            | 23 |
| 5. Приноси                                                                                           | 23 |
| 6. Публикации свързани с дисертационният труд                                                        | 24 |
| 7. Участия в научни конференции свързани с дисертационният труд                                      | 24 |

## Използвани съкращения

|        |                                                              |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| HSV    | herpes simplex virus, вирус херпес симплекс                  |
| ACV    | ацикловир                                                    |
| TK     | тимидин киназа                                               |
| MDBK   | Madin-Darby bovine kidney                                    |
| PBS    | Phosphate buffered saline                                    |
| NR     | неутрално червено                                            |
| CC50   | цитотоксична концентрация 50%                                |
| LDH    | лактатдехидрогеназа                                          |
| MTT    | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| CGIC50 | Cell Growth Inhibitory Concentration 50                      |
| ЦПЕ    | цитопатичен ефект                                            |
| CCID50 | инфекциозни дози 50                                          |
| МИ     | множественост на инфекцията                                  |
| FFU    | focus forming units, микроскопски регистрирани микроплаки    |
| IC50   | инхибираща концентрация 50%                                  |
| ИЕ     | инфекциозни единици                                          |
| ОП     | оптична плътност                                             |
| SI     | селективен индекс                                            |
| МНК    | максимална нетоксична концентрация                           |
| SD     | стандартно отклонение                                        |
| CPE    | цитопатичен ефект                                            |

## Увод

Вирус херпес симплекс (HSV) е ДНК съдържащ обвит вирус, съществуващ като два типа: HSV-1 и HSV-2, от които HSV-1 се асоциира главно със заболяване на устата, а HSV-2 по-често се свързва с генитално заболяване. Те причиняват инфекции, които са едни от най-често срещаните при човека и са глобално разпространени. HSV може да причини различни заболявания, но най-често се характеризира с формирането на лезии върху кожата и лигавиците на инфектирания участък. Първичната инфекция може да е и асимптомна, след това вирусът винаги се транспортира чрез периферните сензорни нерви до ганглия, което впоследствие води до установяване на персистентна (латентна) пожизнена инфекция. При стимулиране може латентният вирус да се реактивира и причинява повтарящо се болестно състояние. Потенциално фаталните болести включват енцефалити у новородените и дисеминираните инфекции при пациенти с дефекти в клетъчния имунитет.

Ацикловир (ACV) както и други нуклеозидни аналози са ефективни при третирането на HSV инфекциите, но в редица случаи терапията е неуспешна, поради появата на ACV-резистентни мутанти. Затова е необходимо да се открият нови и по-ефективни антивирусни агенти, приложими за лечение на HSV инфекции.

Напоследък в литературата се съобщава, че някои растения от традиционната медицина имат анти-HSV активност. В екстракти от растения са доказани голям брой малки молекули, като феноли, полифеноли, терпени, флавоноиди, захар съдържащи компоненти, за които е доказано, че са обещаващи антихерпесни агенти. Вид полифеноли са танините, към които се отнасят елагитанините. Елагитанините се характеризират с разнообразие от биологични активности, както и с антивирусна активност срещу различни вируси, в това число и херпесни.

Понеже елагитанините са вещества, които не са достатъчно изследвани, и данните за активността им и особено за механизма им на действие са малко, в настоящият дисертационен труд ние спираме вниманието си върху анти HSV-1 и HSV-2 активността на три елагитанина. Особено внимание ще обърнем на комбинираното действие на елагитанините с ACV върху репликацията на HSV-1 и 2.

## 1. Цел и задачи

### 1.1. Цел

Определяне ефекта на наонахидрокситерфеноил-съдържащите С-гликозилирани елагитанини касталагин, вескалагин и грандинин върху репликацията на вируси херпес симплекс тип 1 и 2, при самостоятелно приложение и в комбинация с ацикловир.

### 1.2. Задачи

За изпълнение на тази цел си поставихме следните основни задачи:

- 1.2.1. Определяне токсичността на елагитанините върху монослойни и растящи клетки от клетъчна линия MDBK.
- 1.2.2. Определяне ефекта на елагитанините върху репликацията на чувствителни към ACV щамове на HSV-1 и HSV-2.
- 1.2.3. Определяне ефекта на елагитанините върху репликацията на резистентни към ACV щамове HSV-1 и HSV-2.
- 1.2.4. Изследване ефекта на елагитанините върху херпесвирусната репликация при различна множественост на инфекцията.
- 1.2.5. Проучване на елагитаниновия ефект върху извънклетъчните вириони на HSV1.

- 1.2.6. Изследване ефекта на най-активния елагитанин върху адсорбцията на HSV-1.
- 1.2.7. Проучване кинетиката на антихерпесния ефект на най-активния елагитанин върху репликацията на HSV-1.
- 1.2.8. Изследване комбинирания ефект на касталагин, вескалагин и грандинин с ACV върху репликацията на чувствителни към ACV щамове на HSV-1 и HSV-2 и върху репликацията на резистентни към ACV щамове на HSV-1 и HSV-2.
- 1.2.9. Изследване на комбинираната токсичност на касталагин, вескалагин и грандинин с ACV върху монослойна клетъчна линия MDBK.

## **2. Материали и методи**

### **2.1. Материали**

#### **2.1.1. Клетки**

Монослойна клетъчна култура Madin-Darby bovine kidney (MDBK) (Национална Банка за Индустриални Микроорганизми и Клетъчни Култури, София).

#### **2.1.2. Вируси**

- Херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1), чувствителен към ACV, щам Victoria (получен от проф. Стефан Дундаров, Национален център по заразни и паразитни болести, София).

- Херпес симплекс вирус тип 1, чувствителен към ACV, щам DA (от колекцията на Института по микробиология, БАН).

- Херпес симплекс вирус тип 1, резистентен към ACV, щам R-100, на проф. G. Palu, Институт по микробиология, Университет Падуа, Италия, предоставен ни от Лабораторията по вирусология на БФ при СУ "Св. Климент Охридски". Щам R-100 се характеризира с мутация в гена кодиращ ензима ТК, който е с променена субстратна специфичност (ТК<sup>A</sup>).

- Херпес симплекс вирус тип 2 (HSV-2), чувствителен към ACV, щам Bja (получен от проф. Стефан Дундаров, Национален център по заразни и паразитни болести, София)

- Херпес симплекс вирус тип 2, чувствителен към ACV, щам ХА (от колекцията на Института по микробиология, БАН).

- Херпес симплекс вирус тип 2, резистентен към ACV, щам PU, на проф. G. Palu, предоставен ни от Лабораторията по вирусология на БФ при СУ "Св. Климент Охридски" - характеризира се с мутация в гена за тимидин киназа, поради което ензимът не се експресиращ - ТК негативен мутант (ТК<sup>-</sup>).

#### **2.1.2. Изследвани вещества**

Нонахидрокситерфеноил-съдържащи С-гликозилирани елагитанини: касталагин, вескалагин и ликсозо-съдържащия грандинин, изолирани от дъб (*Quercus robur*), пречистени, структурно охарактеризирани, синтезирани и любезно предоставени от екипа на Prof. S. Quideau от Университета в Бордо, Франция (S. Quideau et al, 2003).

Ацикловир [9-(2-hydroxyethoxymethyl)-guanine] (ACV).

## 2.2. Методи

**2.2.1. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните елагитанини и ACV върху монослойна клетъчна култура MDBK.**

**2.2.1.1. Определяне на индивидуалната цитотоксичност чрез оцветяване с neutral red (NR).** Върху монослой от клетки MDBK се добавя всяко едно от веществата в необходимите концентрации. Използва се оцветяване с багрилото неутрално червено (NR). Преживяемостта на клетките се изчислява като % спрямо клетъчна контрола по формулата:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = (\text{брой живи клетки} / \text{брой живи клетки в контролата}) \times 100$$

**2.2.1.2. Определяне на индивидуалната цитотоксичност чрез определяне на мембранната цялост като зависимост от количеството лактатдехидрогеназа (LDH) отделено в средата.** Определеното количество LDH се използва като индикатор на относителната клетъчна жизненост, като функция от мембранната цялост. Клетъчната жизненост се изчислява по формулата:

$$\% \text{ клетъчна жизненост} = [(\text{ОП проба} - \text{ОП негативна контрола}) / (\text{ОП позитивна контрола} - \text{ОП негативна контрола})] \times 100$$

**2.2.1.3. Определяне на индивидуалната цитотоксичност чрез оцветяване с MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).** Върху монослой от клетки MDBK се добавя всяко едно от веществата в необходимите концентрации. Използва се оцветяване с MTT. Преживяемостта на клетките се изчислява като % спрямо клетъчна контрола по формулата:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = (\text{брой живи клетки} / \text{брой живи клетки в контролата}) \times 100$$

**2.2.2. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните елагитанини и ACV върху растящи клетки от монослойна клетъчна култура MDBK.**

**2.2.2.1. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на елагитанините и ACV върху растящи клетки чрез директно определяне броя на живите клетки с помощта на светлинен микроскоп.** Към суспензия от клетки MDBK се прибавя съответно разреждане на веществото. Изброяват се жизнените клетки с помощта на светлинен микроскоп. Процентът на подтискане на растежа на клетките се определя чрез сравняване с контролата и се построява крива на клетъчния растеж в присъствие на различните концентрации на веществото от която се определя  $CGIC_{50}$ .

**2.2.2.2. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните вещества върху растящи клетки чрез оцветяване с NR.** Към суспензия от клетки MDBK се прибавя съответно разреждане на веществото. Отчитането на жизнените клетки става чрез оцветяване с неутрално червено (NR).

**2.2.3. Определяне на инфекциозния вирусен титър по метода на крайното разреждане.**

Чрез микроскопско наблюдение на клетъчния монослой се отчита цитопатичния ефект (ЦПЕ), индуциран от съответния вирусен щам. Инфекциозният вирусен титър се определя по два метода:

А) по метода на Reed и Muench (1938);

Б) колориметрично чрез оцветяване с NR или MTT.

#### **2.2.4. Определяне на индивидуалния антивирусен ефект на изследваните вещества.**

**2.2.4.1. Определяне на антивирусния ефект на изследваните вещества с микроплако редуциращ тест (микроскопски регистрирани микроплаки).** Използва се такова разреждане на вируса, което отговаря на 100 FFU/ 0.1ml (МИ = 0.0025). Изброяват се микроскопски регистрираните микроплаки и се пресмята процента протекция в пробите спрямо вирусната контрола по формулата:

$$\% \text{ инхибиция} = [ 1 - ( \text{брой микроплаки в пробата} ) / ( \text{брой микроплаки във вирусната контрола} ) ] \times 100$$

**2.2.4.2. Определяне на антивирусния ефект на изследваните вещества чрез инхибиране на цитопатичния ефект и оцветяване с neutral red.** Инхибирането на цитопатичния ефект се определя чрез поглъщане на багрилото неутрално червено от жизнените клетки. Получените стойности се използват за пресмятане на процент протекция на клетките, като се използва формулата:

$$[ \text{ОП ( проба )} - \text{ОП ( контр. вирус )} / \text{ОП ( контр. токсичност )} - \text{ОП ( контр. вирус )} ] \times 100,$$

където: ОП – оптична плътност.

**2.2.4.3. Определяне на антивирусния ефект на изследваните вещества чрез инхибиране на цитопатичния ефект и оцветяване с МТТ.** Инхибирането на цитопатичния ефект се определя чрез поглъщане на багрилото МТТ от жизнените клетки. Получените стойности се използват за пресмятане на процент протекция на клетките, като се използва формулата:

$$[ \text{ОП ( проба )} - \text{ОП ( контр. вирус )} / \text{ОП ( контр. токсичност )} - \text{ОП ( контр. вирус )} ] \times 100$$

**2.2.4.4. Определяне на антивирусния ефект на изследваните вещества чрез инхибиране на цитопатичния ефект, при използване на различна множественост на инфекцията и оцветяване с МТТ.** Работено е с такова разреждане на вируса, което отговаря на 100, 200, 1000 или 2000 CCID<sub>50</sub>/ 0.1ml (МИ съответно е равна на 0.0025, 0.005, 0.025 и 0.05). Инхибирането на цитопатичния ефект се определя чрез поглъщане на багрилото МТТ от жизнените клетки.

**2.2.5. Определяне на селективните индекси ( SI ).** Селективният индекс отразява съотношението между токсичността и ефективността на даден антивирусен препарат. В проведените експерименти SI са определяни по формулата:

$$SI = CC_{50} / IC_{50}$$

**2.2.6. Влияние на касталагина върху извънклетъчните HSV-1 вириони.** Смесват се равни обеми вирус (10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>) и касталагин в различна концентрация. След това се определя инфекциозният вирусен титър на всички контактни проби по метода на крайното разреждане (Reed и Muench, 1938) и се определя Δlog (Гълъбов, 1978).

**2.2.7. Влияние на касталагина върху адсорбцията на HSV-1.** Монослой от клетки MDBK се покрива със смес от равни части вирус и касталагин в различна концентрация. Пробите се инкубират на 4°C в продължение на 15, 30, 45 и 60 мин. След трикратно замразяване и размразяване се определя инфекциозният вирусен титър и се определя Δlog (Shindarov и съавт., 1970; Гълъбов, 1978).

### **2.2.8. Определяне кинетиката на ефекта на касталагин върху репликацията на HSV-1 щам Victoria**

Използва се експериментална постановка на timing-of-addition study при проследяване на растежната крива на вируса (МИ = 0.025) (Гълъбов, 1978). На всяка проба беше определен инфекциозният вирусен титър по метода на крайното разреждане (Reed и Muench, 1938).

### **2.2.9. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV.**

**2.2.9.1. Определяне на комбинирания антивирусен ефект на елагитанините с ACV отчетен чрез микроплако-редуциращ тест.** След адсорбцията на вируса се прибавят разреждания на елагитанините и ACV поотделно или в двойни шахматни комбинации. Използвани са концентрации  $2IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}/2$ ,  $IC_{50}/4$ ,  $IC_{50}/8$  на веществата. след което се изброяват микроскопски регистрираните микроплаки. Антивирусния комбиниран ефект се определя на основата на три-дименсионалния модел разработен от Prichard и Shipman (Prichard and Shipman, 1990), с помощта на компютърна програма MacSynergy<sup>TM</sup> II (Prichard et al., 1992).

**2.2.9.2. Определяне на комбинирания антивирусен ефект на елагитанините с ACV отчетен чрез инхибиране на цитопатичния ефект и оцветяване с neutral red.** Комбинираният антивирусен ефект се отчита чрез оцветяване с NR. За определяне на комбинирания антивирусен ефект се използва три-дименсионалния модел на Prichard и Shipman.

**2.2.9.3. Определяне на комбинирания антивирусен ефект на елагитанините с ACV отчетен чрез инхибиране на цитопатичния ефект и оцветяване с МТТ.** Комбинираният антивирусен ефект се отчита чрез оцветяване с МТТ. Комбинираният антивирусен ефект на веществата се определя по модела на Prichard и Shipman.

**2.2.10. Определяне на комбинираната цитотоксичност чрез оцветяване с МТТ.** Използвани са концентрации  $2IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}/2$ ,  $IC_{50}/4$ ,  $IC_{50}/8$  на веществата, които са използвани за определяне на комбинираната им антивирусна активност. Използва се оцветяване с МТТ, а комбинираната цитотоксичност на веществата се определя по модела на Prichard и Shipman.

**2.2.11. Определяне на комбинираната цитотоксичност чрез оцветяване с NR.** Използвани са концентрации  $2IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}/2$ ,  $IC_{50}/4$ ,  $IC_{50}/8$  на веществата, които са използвани за определяне на комбинираната им антивирусна активност. Използва се оцветяване с NR, а комбинираната цитотоксичност на веществата се определя по модела на Prichard и Shipman.

### **2.2.12. Статистическа обработка на резултатите.**

**2.2.12.1. Определяне на стандартно отклонение (standard deviation, sd) с помощта на програмата OriginPro 7.5.**

**2.2.12.2. Student's t-test,** при който се получава сравняване на две групи от резултати. Данните са получени с програмата GraphPad Prism4.



### 3. Резултати

#### 3.1. Ефект върху репликацията на HSV-1 и HSV-2

##### 3.1.1. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните елагитанини

##### 3.1.1.1. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните елагитанини върху монослойна клетъчна култура MDBK.

Цитотоксичността на елагитанините касталагин, вескалагин и грандинин беше определена върху MDBK стационарни и растящи клетки. Паралелно беше тествана и токсичността на ACV. Цитотоксичността върху клетъчна култура намираща се в стационарна фаза, бе измерена с помощта на три метода: чрез оцветяване с NR, чрез определяне на количеството на LDH, отделено в средата и чрез оцветяване с MTT. Отчитането на резултатите се правеше на 48h и 72h за NR и на 24 h, 48 h и 72 h за LDH и MTT теста. Както се вижда на Табл. 1., елагитанините са по-цитотоксични от ACV, стойностите на  $CC_{50}$  на тези вещества са значително по-ниски от тази на ACV ( $p < 0.0001$ ; Student's *t*-test). Най-ниски стойности на  $CC_{50}$  за елагитанините се отчитат с MTT теста, докато най-високи стойности се получават при определянето на LDH в средата. Данните получени от оцветяването с NR заемат междинна позиция. ACV показва най-ниски стойности на  $CC_{50}$  при оцветяването с NR и най-високи при LDH теста.

**Табл. 1.** Токсичност на изследваните вещества върху клетъчна култура MDBK.

| Вещества   | $CC_{50}^{NR} \pm SD(\mu M)$ |                     | $CC_{50}^{LDH} \pm SD(\mu M)$ |                   |                     | $CC_{50}^{MTT} \pm SD(\mu M)$ |                       |                     |
|------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------|
|            | 48h                          | 72h                 | 24h                           | 48h               | 72h                 | 24h                           | 48h                   | 72h                 |
| Касталагин | 53.9<br>$\pm 4.2$            | 41.9<br>$\pm 3.9$   | 79.5<br>$\pm 5.4$             | 63.1 $\pm$<br>4.9 | 63.0<br>$\pm 2.4$   | 45.2<br>$\pm 5.9$             | 39.5<br>$\pm 2.6$     | 35.1<br>$\pm 3.1$   |
| Вескалагин | 68.2<br>$\pm 3.9$            | 54.0<br>$\pm 4.4$   | 81.2<br>$\pm 3.5$             | 85.5<br>$\pm 1.6$ | 80.0<br>$\pm 1.8$   | 44.2<br>$\pm 6.5$             | 27.0<br>$\pm 1.6$     | 26.2<br>$\pm 2.1$   |
| Грандинин  | 35.5<br>$\pm 5.2$            | 29.9<br>$\pm 2.9$   | 100.0<br>$\pm 6.3$            | 96.4<br>$\pm 5.7$ | 94.0<br>$\pm 3.7$   | 50.4<br>$\pm 2.5$             | 36.6<br>$\pm 8.2$     | 32.8<br>$\pm 8.2$   |
| ACV        | 1296<br>$\pm 49.4$           | 506.0<br>$\pm 17.0$ | >3000                         | >3000             | 661.0<br>$\pm 21.2$ | >3000                         | 1963.0 $\pm$<br>175.7 | 666.5<br>$\pm 75.6$ |

\*\*\* $p < 0.0001$  при сравняване на стойността за всеки елагитанин със съответната стойност на ACV

##### 3.1.1.2. Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните вещества върху растящи клетки от монослойна клетъчна култура MDBK .

Индивидуалната цитотоксичност на елагитанините и ACV за растящи клетки се определяше чрез намиране на концентрацията, подтискаща нарастването броя на клетките с 50% ( $CGIC_{50}$ ), спрямо контролата (без инхибитор в растежната среда), достигнала стационарна фаза. Цитотоксичният ефект се изследваше чрез третиране на клетъчната суспензия с различни концентрации на инхибиторите, разтворени в растежната среда. Цитотоксичният ефект се определи по два начина: чрез директно определяне броя на живите клетки с помощта на светлинен микроскоп, и чрез оцветяване с NR. Процесът на подтискане на растежа на клетките се определяше на 24h, 48h и 72h и се построяваха криви на клетъчния растеж. Резултатите от Табл.2. показват значително по-ниски стойности на  $CGIC_{50}$ , в сравнение с тези на  $CC_{50}$ , получени със същата методика, което се обяснява с по-голямата

**Табл. 2.** Токсичност на изследваните вещества върху растящи клетки от клетъчна култура MDBK.

| Вещества   | CGIC <sub>50</sub> <sup>CCT</sup> ±SD(μM) |            |              | CGIC <sub>50</sub> <sup>NR</sup> ±SD(μM) |            |            |
|------------|-------------------------------------------|------------|--------------|------------------------------------------|------------|------------|
|            | 24h                                       | 48h        | 72h          | 24h                                      | 48h        | 72h        |
| Касталагин | 21.9 ± 2.2                                | 10.6 ± 2.1 | 3.9 ± 0.7    | 17.8 ± 1.1                               | 13.4 ± 1.3 | 5.2 ± 1.3  |
| Вескалагин | 20.2 ± 2.3                                | 19.3 ± 0.5 | 14.9 ± 2.0   | 20 ± 1.1                                 | 19 ± 0.7   | 17.2 ± 1.6 |
| Грандинин  | 15.3 ± 1.5                                | 5.4 ± 0.7  | 3.9 ± 0.8    | 17.3 ± 1.6                               | 8.8 ± 1.3  | 4.5 ± 1.1  |
| ACV        | 618 ± 28.1                                | 380 ± 17.2 | 213.0 ± 11.4 | 694.5 ± 22.9                             | 413 ± 11.8 | 221 ± 13.3 |

\*\*\*p<0.001 при сравняване на стойността за всеки елагитанин със съответната стойност на ACV

чувствителност спрямо токсични фактори на млади растящи и делящи се клетки в сравнение с клетките в покой. Резултатите получени от двата метода на отчитане са доста близки. И трите елагитанина показват значително висока цитотоксичност в сравнение с ACV (p<0.001; Student's *t*-test).

### 3.1.2. Антихерпесвирусна активност на елагитанините срещу HSV

**3.1.2.1. Определяне на индивидуалната антивирусна активност на изследваните вещества.** Антивирусният ефект на всеки елагитанин и на ACV се определяше по три метода: микроплако-редуциращ тест (микроскопски регистрирани микроплаки, focus forming units reduction assay, FFU reduction assay); инхибиране на цитопатичния ефект (Cytopathic effect (CPE) inhibition test), отчитан чрез оцветяване с 1) NR или 2) МТТ. И при трите метода ефекта се определяше в постановка доза-отговор, като всяко тестирано вещество се приготвяше в серия последователни логаритмични моларни разреждания.

**Табл. 3.** Антихерпесвирусна активност (SI) на елагитанините и ACV срещу чувствителните на ACV HSV-1 щамове Victoria и DA

| Метод                            | Вещества   | SI = CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> |                       |         |                           |                  |
|----------------------------------|------------|-----------------------------------------|-----------------------|---------|---------------------------|------------------|
|                                  |            | Victoria                                |                       |         | DA                        |                  |
|                                  |            | Микроплако редуциращ тест               | ЦПЕ инхибиращ тест NR | МТТ     | Микроплако редуциращ тест | ЦПЕ инх. Тест NR |
| Цитотоксичност измерена чрез NR  | Касталагин | 4498.0                                  | 930.0                 | 64.2    | 5390.0                    | 163.3            |
|                                  | Вескалагин | 909.0                                   | 378.7                 | 83.2    | 4546.0                    | 136.4            |
|                                  | Грандинин  | 88.7                                    | 40.4                  | 29.6    | 113.0                     | 77.2             |
|                                  | ACV        | 972.8                                   | 881.6                 | 762.4   | 1270.5                    | 1107.7           |
| Цитотоксичност измерена чрез LDH | Касталагин | 5258.3                                  | 1087.9                | 75.1    | 6310.0                    | 191.2            |
|                                  | Вескалагин | 1140.0                                  | 475.0                 | 104.3   | 5700.0                    | 171.0            |
|                                  | Грандинин  | 241.0                                   | 109.5                 | 80.3    | 3213.3                    | 209.6            |
|                                  | ACV        | >2256.0                                 | >2040.0               | >1764.0 | >2941.0                   | >2564.0          |
| Цитотоксичност измерена чрез МТТ | Касталагин | 3291.6                                  | 681.0                 | 47.0    | 3950.0                    | 119.7            |
|                                  | Вескалагин | 360.0                                   | 150.0                 | 33.0    | 1800.0                    | 54.0             |
|                                  | Грандинин  | 91.5                                    | 41.6                  | 30.5    | 1220.0                    | 79.6             |
|                                  | ACV        | 1476.0                                  | 1335.4                | 1154.7  | 1924.5                    | 1677.8           |

Резултатите за антивирусния ефект бяха отчитани на 48-мия час за чувствителните на ACV HSV-1 щамове Victoria и DA и HSV-2 щамове Вја и ХА, и на 72-рия час за резистентните на ACV щамове HSV-1 (R-100) и HSV-2 (PU), и бяха определени IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration 50) – концентрацията на всяко едно вещество, която намалява броя на микроплаките, съответно на цитопатичния ефект с 50% спрямо вирусната

контрола (без инхибитор в средата). От стойностите на  $CC_{50}$  и  $IC_{50}$  се определяха селективните индекси (SI) на веществата (табл. 3-5). От табл.3 се вижда, че с най-висока активност спрямо HSV-1 е касталагина, която превъзхожда тази на ACV при използване на микроплако-редуциращия тест. При отчитане с NR активността на касталагина отново е висока, но близка или по-ниска от тази на ACV.

При отчитане с MTT стойностите за ефекта на касталагин са най-ниски, в сравнение с другите два метода, но се запазва силният анти-вирусен ефект, по-добре изразен спрямо щам DA. Вескалагин също проявява силен антивирусен ефект, като чрез микроплако-редуциращия тест показва активност близка до тази на ACV, докато при оцветяването с NR и MTT - стойностите са значително по-ниски, но-все пак показващи висока активност.

**Табл. 4.** Антихерпесвирусна активност (SI) на елагитанините и ACV срещу чувствителните на ACV HSV-2 щамове Bja и XA

| Метод                            | Вещества   | SI = $CC_{50}/IC_{50}$    |               |         |                           |              |
|----------------------------------|------------|---------------------------|---------------|---------|---------------------------|--------------|
|                                  |            | Bja                       |               |         | XA                        |              |
|                                  |            | Микроплако редуциращ тест | ЦПЕ инх. тест |         | Микроплако редуциращ тест | ЦПЕ инх.тест |
|                                  |            |                           | NR            | MTT     |                           | NR           |
| Цитотоксичност измерена чрез NR  | Касталагин | 89.9                      | 61.3          | 53.9    | 336.9                     | 122.5        |
|                                  | Вескалагин | 123.9                     | 72.5          | 73.3    | 378.9                     | 113.7        |
|                                  | Грандинин  | 71.0                      | 45.5          | 29.6    | 208.8                     | 64.5         |
|                                  | ACV        | 810.5                     | 44.8          | 648.0   | 790.2                     | 682.1        |
| Цитотоксичност измерена чрез LDH | Касталагин | 105.2                     | 717.0         | 63.1    | 394.4                     | 143.4        |
|                                  | Вескалагин | 155.5                     | 91.0          | 92.0    | 475.0                     | 142.5        |
|                                  | Грандинин  | 192.8                     | 123.6         | 80.3    | 567.0                     | 175.3        |
|                                  | ACV        | >1875.0                   | >1724.0       | >1500.0 | >1829.0                   | >1579.0      |
| Цитотоксичност измерена чрез MTT | Касталагин | 65.8                      | 44.9          | 39.5    | 246.9                     | 89.5         |
|                                  | Вескалагин | 49.0                      | 28.7          | 29.0    | 150.0                     | 45.0         |
|                                  | Грандинин  | 73.2                      | 47.0          | 30.5    | 215.3                     | 66.5         |
|                                  | ACV        | 1227.0                    | 1128.2        | 981.5   | 1197.0                    | 1033.2       |

Грандинина проявява най-слаба активност и при трите използвани метода. Спрямо HSV-2 и трите елагитанина проявяват значителна антивирусна активност, която е сравнително близка за трите вещества, и при трите използвани метода. По-силен ефект те демонстрират при щам XA (табл. 4).

Спрямо резистентните на ACV щамове HSV-1 (R-100) и HSV-2 (PU) отново ефекта е значително по-изразен при HSV-1, като най-активен е касталагина, а най-слабо активен е грандинина. Най-високи стойности отново се получават при микроплако-редуциращия тест, а най- ниски при оцветяването с MTT. При HSV-2 ефекта е по-слаб, и трите вещества проявяват близка активност и по трите използвани метода (табл. 5).

### 3.1.2.2. Определяне на антивирусния ефект на изследваните вещества чрез инхибиране на цитопатичния ефект при използване на различна множественост на инфекцията.

За определяне на антивирусния ефект на елагитанините върху HSV-1 (Victoria) и HSV-2 (Bja) при използване на различна вируса инокулационна доза беше използван метода на инхибиране на ЦПЕ чрез оцветяване с MTT. Бяха използвани вирусни инокулационни дози 100, 200, 1000 и 2000  $CCID_{50}$  (съответно 0.0025, 0.005, 0.025 и 0.05 МИ).

**Табл. 5.** Антихерпесвирусна активност (SI) на елагитанините и ACV срещу резистентните щамове HSV-1 (R-100) и HSV-2 (PU)

| Метод                            | Вещества   | SI = CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> |                       |             |                           |                       |              |
|----------------------------------|------------|-----------------------------------------|-----------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|--------------|
|                                  |            | R-100                                   |                       |             | PU                        |                       |              |
|                                  |            | Микроплако редуциращ тест               | ЦПЕ инхибиращ тест NR | MTT         | Микроплако редуциращ тест | ЦПЕ инхибиращ тест NR | MTT          |
| Цитотоксичност измерена чрез NR  | Касталагин | <b>1047.5</b>                           | <b>419.0</b>          | <b>38.0</b> | <b>97.4</b>               | <b>77.6</b>           | <b>34.9</b>  |
|                                  | Вескалагин | <b>900.0</b>                            | <b>270.0</b>          | <b>38.6</b> | <b>117.4</b>              | <b>90.0</b>           | <b>49.0</b>  |
|                                  | Грандинин  | <b>650.0</b>                            | <b>175.9</b>          | <b>20.0</b> | <b>103.1</b>              | <b>74.8</b>           | <b>24.9</b>  |
|                                  | ACV        | <b>25.3</b>                             | <b>18.6</b>           | <b>16.0</b> | <b>29.0</b>               | <b>25.0</b>           | <b>17.0</b>  |
| Цитотоксичност измерена чрез LDH | Касталагин | <b>1575.0</b>                           | <b>630.0</b>          | <b>57.3</b> | <b>146.5</b>              | <b>116.6</b>          | <b>52.5</b>  |
|                                  | Вескалагин | <b>1333.3</b>                           | <b>400.0</b>          | <b>57.1</b> | <b>174.0</b>              | <b>133.3</b>          | <b>72.7</b>  |
|                                  | Грандинин  | <b>2043.5</b>                           | <b>553.0</b>          | <b>62.6</b> | <b>324.1</b>              | <b>235.0</b>          | <b>78.3</b>  |
|                                  | ACV        | <b>33.0</b>                             | <b>24.3</b>           | <b>21.0</b> | <b>38.0</b>               | <b>32.8</b>           | <b>22.3</b>  |
| Цитотоксичност измерена чрез MTT | Касталагин | <b>877.5</b>                            | <b>351.0</b>          | <b>32.0</b> | <b>81.6</b>               | <b>65.0</b>           | <b>293.0</b> |
|                                  | Вескалагин | <b>436.7</b>                            | <b>131.0</b>          | <b>18.7</b> | <b>57.0</b>               | <b>43.7</b>           | <b>23.8</b>  |
|                                  | Грандинин  | <b>713.0</b>                            | <b>193.0</b>          | <b>21.8</b> | <b>113.0</b>              | <b>82.0</b>           | <b>27.3</b>  |
|                                  | ACV        | <b>33.3</b>                             | <b>24.5</b>           | <b>21.1</b> | <b>38.3</b>               | <b>33.0</b>           | <b>22.5</b>  |

Резултатите бяха отчитани на 48-мия час и бяха определени IC<sub>50</sub> на всяко вещество при всяка една от горепосочените вирусни инокулационни дози. От стойностите на CC<sub>50</sub> (определени чрез оцветяване с NR, определяне количеството на LDH в средата и оцветяване с MTT) и IC<sub>50</sub> се изчисляват селективните индекси (SI) на веществата при различните вирусни дози (табл. 6). От получените резултати се вижда, че с повишаване на вирусната доза активността на елагитанините намалява при МИ = 0.005, което не се наблюдава при ACV.

### 3.1.3. Проучване на начина на действие на касталагин върху репликацията на HSV-1 (щам Victoria)

#### 3.1.3.1. Влияние на касталагина върху извънклетъчните HSV-1 вириони (щам Victoria).

Проучен беше ефектът на касталагин върху извънклетъчните вириони на HSV-1. Смесени бяха равни обеми вирус (10<sup>5</sup> CCID<sub>50</sub>) и касталагин в МПК (10μM). Пробите бяха инкубирани на стайна температура за различни интервали от време (15, 30, 60, 90 и 120 мин.) и на 37°C (60, 120 и 150 мин.).

**Табл. 6.** Антихерпесвирусна активност (SI) на елагитанините и ACV срещу HSV-1 (щам Victoria) и HSV-2 (щам Bja), при използване на различна вирусна доза, определена чрез оцветяване с MTT.

| Метод                       | Вещества   | SI = CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> |                   |                   |                   |                   |                   |                  |                  |
|-----------------------------|------------|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                             |            | Victoria, МИ*                           |                   |                   |                   | Bja, МИ*          |                   |                  |                  |
|                             |            | 0.0025                                  | 0.005             | 0.025             | 0.05              | 0.0025            | 0.005             | 0.025            | 0.05             |
| Цитотокс. измерена чрез NR  | Касталагин | <b>64.2</b>                             | <b>20.0</b>       | <b>16.8</b>       | <b>1.7</b>        | <b>45.0</b>       | <b>14.7</b>       | <b>11.2</b>      | <b>1.7</b>       |
|                             | Вескалагин | <b>73.3</b>                             | <b>16.0</b>       | <b>7.8</b>        | <b>2.4</b>        | <b>37.8</b>       | <b>28.4</b>       | <b>11.7</b>      | <b>2.3</b>       |
|                             | Грандинин  | <b>762.3</b>                            | <b>17.7</b>       | <b>9.3</b>        | <b>1.2</b>        | <b>25.4</b>       | <b>16.5</b>       | <b>8.0</b>       | <b>1.2</b>       |
|                             | ACV        | <b>1154.7</b>                           | <b>576.0</b>      | <b>498.5</b>      | <b>480.0</b>      | <b>648.0</b>      | <b>462.8</b>      | <b>405.0</b>     | <b>335.7</b>     |
| Цитотокс. измерена чрез LDH | Касталагин | <b>74.1</b>                             | <b>23.4</b>       | <b>19.7</b>       | <b>2.1</b>        | <b>52.6</b>       | <b>17.2</b>       | <b>13.1</b>      | <b>2.1</b>       |
|                             | Вескалагин | <b>91.9</b>                             | <b>20.0</b>       | <b>9.9</b>        | <b>2.8</b>        | <b>47.5</b>       | <b>35.6</b>       | <b>14.7</b>      | <b>2.8</b>       |
|                             | Грандинин  | <b>80.3</b>                             | <b>48.2</b>       | <b>25.4</b>       | <b>3.6</b>        | <b>68.8</b>       | <b>44.8</b>       | <b>21.8</b>      | <b>3.3</b>       |
|                             | ACV        | <b>&gt;1764.7</b>                       | <b>&gt;1333.3</b> | <b>&gt;1153.8</b> | <b>&gt;1111.1</b> | <b>&gt;1500.0</b> | <b>&gt;1071.4</b> | <b>&gt;937.5</b> | <b>&gt;777.2</b> |
| Цитотокс. измерена чрез MTT | Касталагин | <b>47.0</b>                             | <b>14.6</b>       | <b>12.3</b>       | <b>1.3</b>        | <b>32.9</b>       | <b>10.6</b>       | <b>8.2</b>       | <b>1.3</b>       |
|                             | Вескалагин | <b>29.0</b>                             | <b>6.3</b>        | <b>3.1</b>        | <b>1.5</b>        | <b>15.0</b>       | <b>11.3</b>       | <b>4.6</b>       | <b>1.5</b>       |
|                             | Грандинин  | <b>30.5</b>                             | <b>18.3</b>       | <b>9.6</b>        | <b>1.4</b>        | <b>26.1</b>       | <b>17.0</b>       | <b>8.2</b>       | <b>1.2</b>       |
|                             | ACV        | <b>1154.7</b>                           | <b>872.4</b>      | <b>755.0</b>      | <b>727.0</b>      | <b>981.5</b>      | <b>701.1</b>      | <b>613.4</b>     | <b>508.5</b>     |

\*МИ – множественост на инфекцията

На 15 минута ефектът е слаб,  $\Delta\log$  0.67, и става значим на 30 минута -  $\Delta\log$  1.6. С увеличаване на времето на въздействие влиянието върху извънклетъчния вирус се увеличава на 60 минута  $\Delta\log$  1.8, на 90 минута  $\Delta\log$  2, като най-силен ефект се наблюдава на 120 минута  $\Delta\log$  2.2.

При използване на различни концентрации касталагин (10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$  и 0.01  $\mu\text{M}$ ) ефект върху извънклетъчните вириони при 37°C се наблюдава на 30 минута с концентрации 10  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , и на 60 минута с концентрации 0.1  $\mu\text{M}$  и 0.01  $\mu\text{M}$ . Ефектът се увеличава с увеличаване на времето на въздействие и е температурно-зависим, като при 37°C е отчетливо по-висок.

### **3.1.3.2. Влияние на касталагина върху адсорбцията на HSV-1 (щам Victoria).**

Проследено беше влиянието на касталагина в концентрация 10  $\mu\text{M}$  (МПК) върху адсорбцията на HSV-1 върху чувствителни клетки MDBK.

Адсорбцията на опитните и контролните проби се извършваше на 4°C в продължение на 15, 30, 45 и 60 минута, на които беше определен инфекциозният вирусен титър и  $\Delta\log$  за всеки интервал от време. Използвана бе доза на вируса 1000 CCID<sub>50</sub>/ямка (МИ = 0.0025).

На 15 минута ефект върху адсорбцията на HSV-1 не се наблюдава ( $\Delta\log$  = 0.25). Инхибиращ ефект се отчита на 30 минута с  $\Delta\log$  1.7, и с увеличаване времето на въздействие намалява броят на адсорбиралите вириони на HSV-1 върху клетката, като стойностите на  $\Delta\log$  на 45 и 60 минута са съответно 2.2 и 3.2. В следващи експерименти проучихме влиянието на различни концентрации касталагин върху вирусната адсорбция с продължителност 60 минути. Освен изпитваната досега концентрация 10  $\mu\text{M}$  бяха използвани и концентрациите 1  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$  и 0.01  $\mu\text{M}$ . Освен при 10  $\mu\text{M}$  ефект върху адсорбцията се наблюдава и при 1  $\mu\text{M}$  -  $\Delta\log$  = 2. При концентрация 0.1  $\mu\text{M}$  ефектът е отчетливо по-слаб ( $\Delta\log$  = 1), а при концентрация 0.01  $\mu\text{M}$  ефект не се наблюдава ( $\Delta\log$  = 0.25). След като бе установено, че наблюдаваният ефект върху адсорбцията на HSV-1 зависи от концентрацията на касталагин, изследвахме влиянието му върху адсорбцията на вируса при по-висока вирусна инокулационна доза (10 000 CCID<sub>50</sub>/ml, МИ = 0.025). На 15 минута ефект не се наблюдава ( $\Delta\log$  = 0.2), на 30 минута има известен ефект -  $\Delta\log$  = 1.5. Отчетлив е ефектът на 45<sup>-та</sup> минута -  $\Delta\log$  = 1.8 и най-силен ефект има на 60 минута  $\Delta\log$  = 2.3. От тези резултати се вижда, че при използване на по-висока вирусна доза (МИ = 0.025) ефектът на касталагин върху адсорбцията на HSV-1 е по-слаб отколкото при МИ = 0.0025, от което може да се заключи, че влиянието върху адсорбцията е в зависимост, както от концентрацията на касталагина, така и то дозата на вируса.

### **3.1.3.3. Определяне кинетиката на ефекта на касталагин върху репликацията на HSV-1 щам Victoria**

Проучен беше ефекта на касталагин върху продукцията на инфекциозни вириони при проследяване на растежната крива на ACV чувствителния HSV-1 щам Victoria. Използвана бе експериментална постановка във варианта timing of addition study (множественост на инфекцията = 0.025) Съединението бе приложено в концентрация 10  $\mu\text{M}$  (МНК). Най-силен ефект се отчита когато касталагина е прибавен на 0-вия и 3-тия час. При прибавяне на 6-тия и 12-тия час също се наблюдава ефект, но по-слаб. Когато съединението се добави по-късно (18-24 час) не се наблюдава статистически достоверен инхибиращ ефект. От получените при този експеримент резултати може да се заключи, че касталагин засяга ранен етап във вирусния репликативен цикъл.

### **3.2. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV.**

Определянето на комбинирания ефект на елагитанините с ACV беше извършено спрямо ACV-чувствителни щамове на HSV-1 - Victoria и на HSV-2 - Вја, и ACV-резистентните на HSV-1 – щам R-100 и на HSV-2 – щам PU. За целта бяха използвани два метода: 1 ) микроплако-редуциращ тест, 2 ) тест с инхибиране на цитопатичния ефект. При ЦПЕ -инхибиращия тест бе използвано а) оцветяване с NR и б) оцветяване с МТТ. Характерът на комбинирания ефект бе определян чрез три-дименсионалния модел на Prichard и Shipman с прилагане на компютърна програма MacSynergy<sup>TM</sup>. Съгласно изискванията на метода работено бе със следните концентрации на всяко от съединенията:  $2IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}/2$ ,  $IC_{50}/4$  и  $IC_{50}/8$ , като всяка концентрация елагитанин се комбинираше с всяка концентрация на ACV („шахматна схема”).

#### **3.2.1. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу HSV-1 щам Victoria.**

При изследване на комбинираният ефект на елагитанините с ACV върху репликацията на HSV-1 щам Victoria, най-силен синергичен ефект дава комбинацията на касталагина с ACV отчетена чрез микроплако редуциращ тест. По-ниски стойности на синергичният ефект се получават при комбинацията на вескалагина с ACV, и най-нисък синергичен ефект се отчита с грандинина  $106 \mu M^2\%$ . При отчитане с NR се получават по-ниски стойности на синергизма, но отново най-силен ефект се отчита при комбинацията с касталагин. МТТ теста, както при индивидуалните ефекти, така и тук дава най-ниски стойности от трите използвани метода, но отново отчита най-силен синергичен ефект при комбинацията с касталагина. И от трите използвани метода може да се обобщи, че комбинацията на касталагин, вескалагин и грандинин с ACV върху щам Victoria са със силен или умерен синергизъм.

#### **3.2.2. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу HSV-2 щам Вја.**

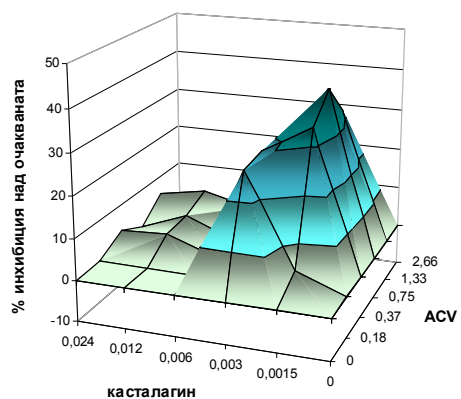
От комбинациите тествани срещу репликацията на HSV-2 щам Вја, най-силен синергичен ефект има комбинацията с грандинин, като и трите използвани метода дават силен синергизъм с близки стойности. Следваща по активност е комбинацията с касталагин, при която при оцветяване с NR и МТТ се получава силен синергизъм с близки стойности, а отчитането с микроплако редуциращ тест дава умерен синергизъм. Комбинацията с вескалагина и при трите метода са с умерен синергизъм с близки стойности. От резултатите получени при комбинираният ефект на касталагин, вескалагин и грандинин с ACV върху щам Вја се установява силен или умерен синергизъм.

#### **3.2.3. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу резистентния на ACV HSV-1 щам R-100.**

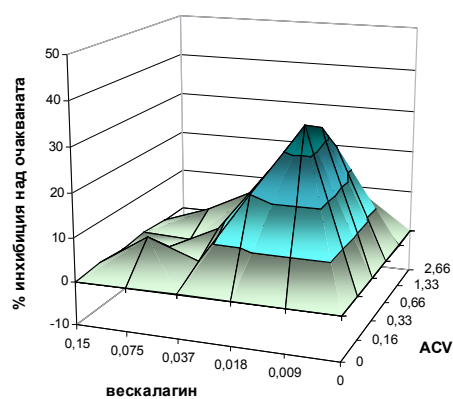
Комбинацията на касталагина с ACV върху репликацията на резистентния на ACV щам R-100 на HSV-1 отчита силно изразени синергичен ефект, който е даже по-силен от ефекта на същата комбинация, изследван върху чувствителния към ACV щам Victoria на HSV-1. Комбинираният ефект на вескалагин с ACV върху резистентния към ACV щам R-100 на HSV-1 подобно на комбинацията на касталагина с ACV се наблюдава изключително силен синергичен ефект с обширни синергични зони. С помощта на микроплако-редуциращия тест се отчита най-силният комбиниран синергичен ефект от всички изследвани комбинации по всички методи .

При комбинираният ефект на грандинина с ACV върху щам R-100 на HSV-1 се установява ясно изразен синергичен ефект, наблюдаващ се при ниските концентрации на грандинина, както и известна зона с адитивен ефект.

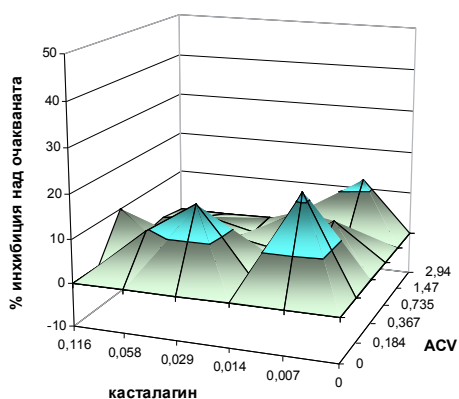
a)



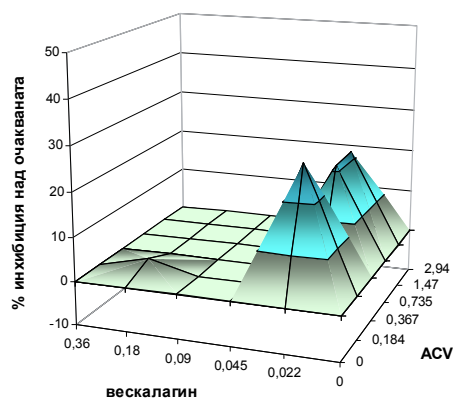
a)



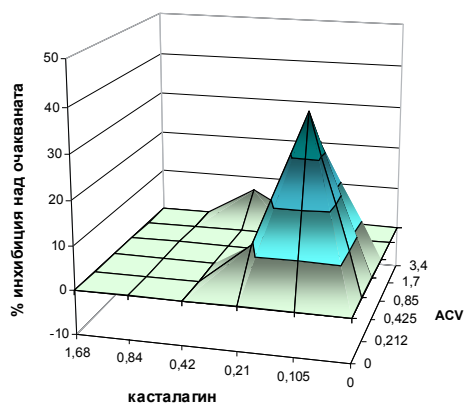
b)



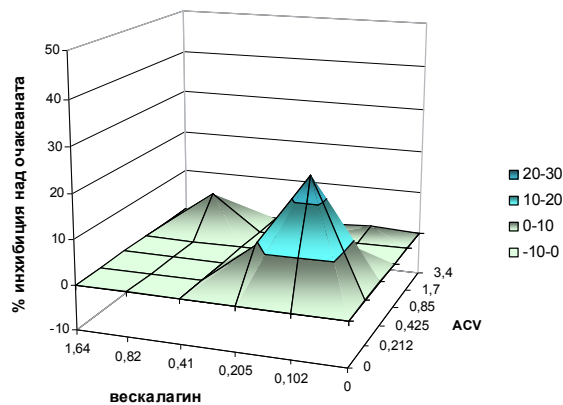
b)



c)



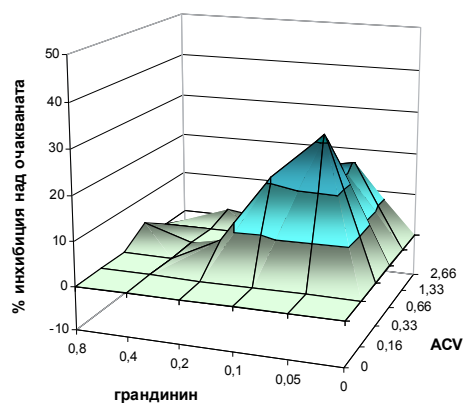
c)



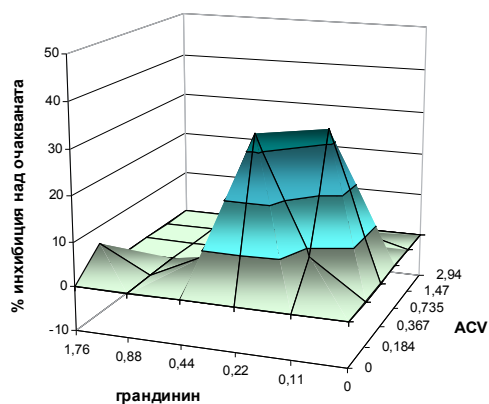
**Фиг. 1.** Комбиниран антивирусен ефект на касталагин и ACV върху репликацията на HSV-1 (щам Victoria), отчетен чрез: а) микроплако-редуциращ тест; б) NR; в) MTT

**Фиг. 2.** Комбиниран антивирусен ефект на вескалагин и ACV върху репликацията на HSV-1 (щам Victoria), отчетен чрез: а) микроплако-редуциращ тест; б) NR; в) MTT

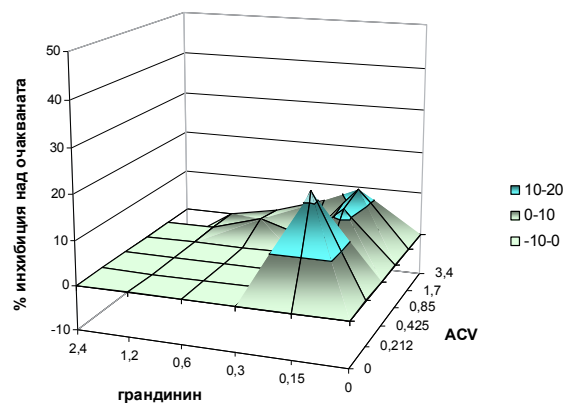
a)



b)

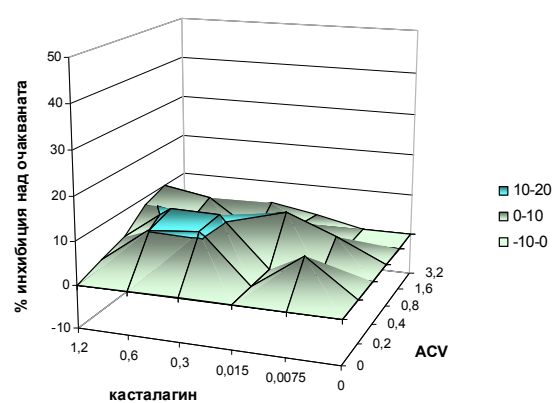


c)

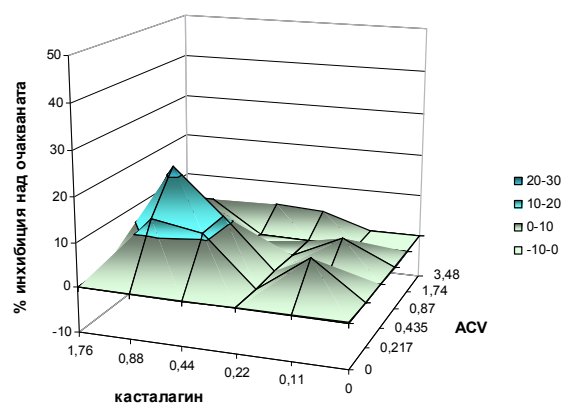


**Фиг. 3.** Комбиниран антивирусен ефект на гандинин и ACV върху репликацията на HSV-1 (щам Victoria), отчетен чрез:  
a) микроплако-редуциращ тест; b) NR;  
c) MTT

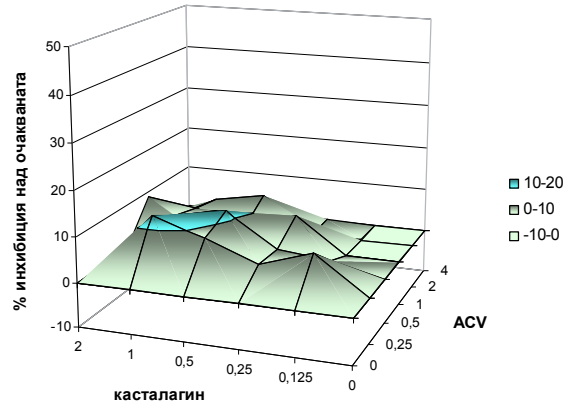
a)



b)



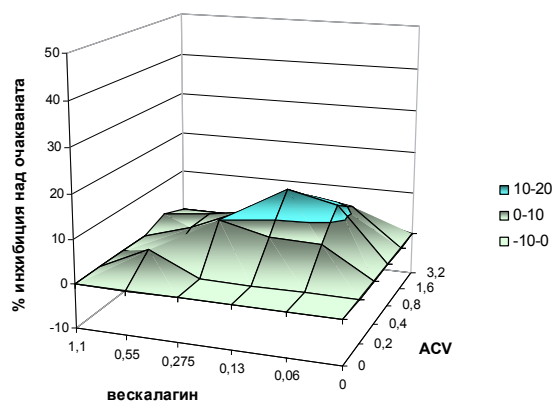
c)



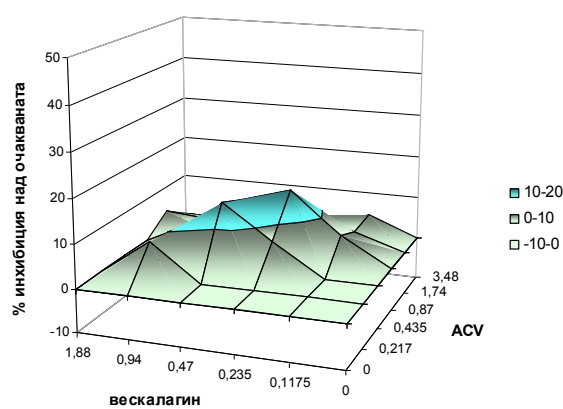
**Фиг. 4.** Комбиниран антивирусен ефект на касталагин и ACV върху репликацията на HSV-2 (щам Bja), отчетен чрез:  
a) микроплако-редуциращ тест; b) NR;  
c) MTT



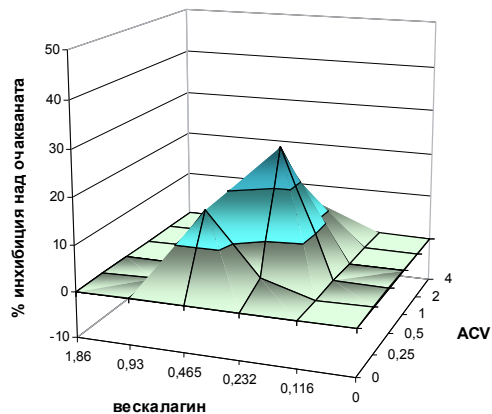
a)



b)

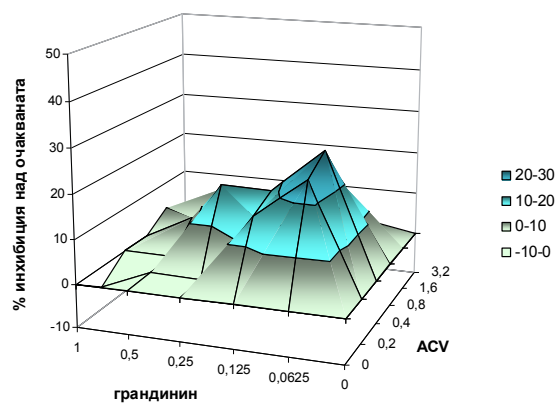


c)

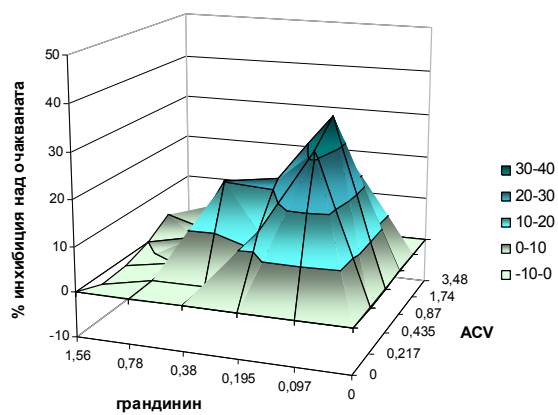


**Фиг. 5.** Комбиниран антивирусен ефект на вескалагин и ACV върху репликацията на HSV-2 (щам Bja), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

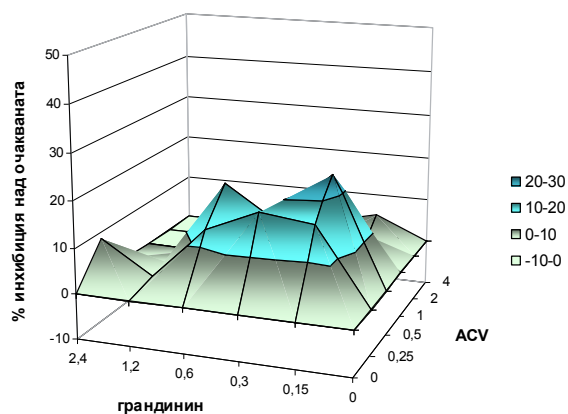
a)



b)

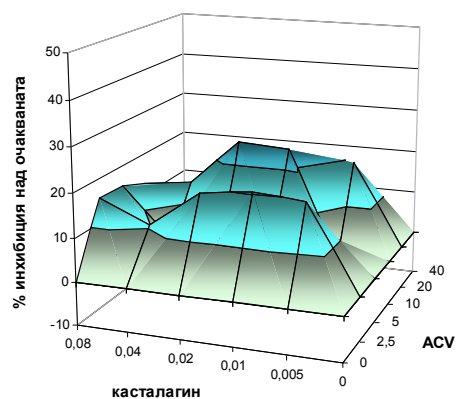


c)

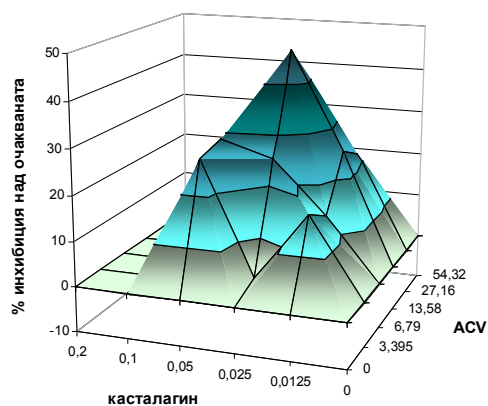


**Фиг. 6.** Комбиниран антивирусен ефект на грандинин и ACV върху репликацията на HSV-2 (щам Bja), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

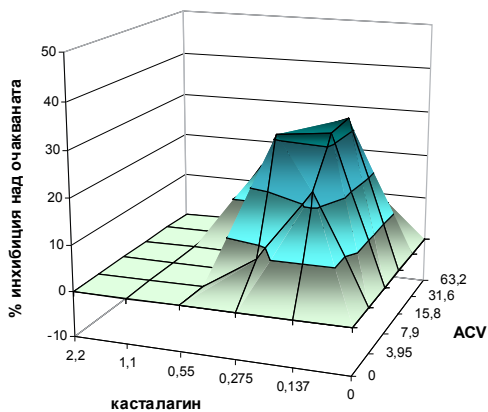
a)



b)

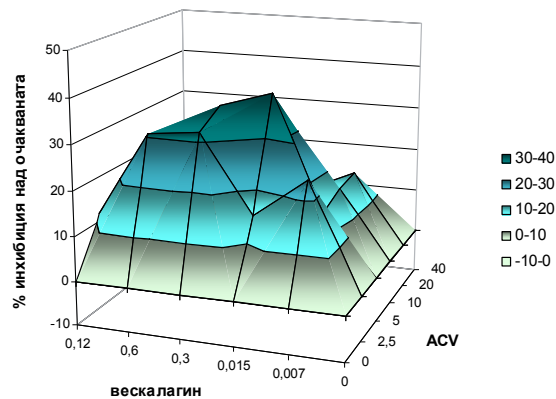


c)

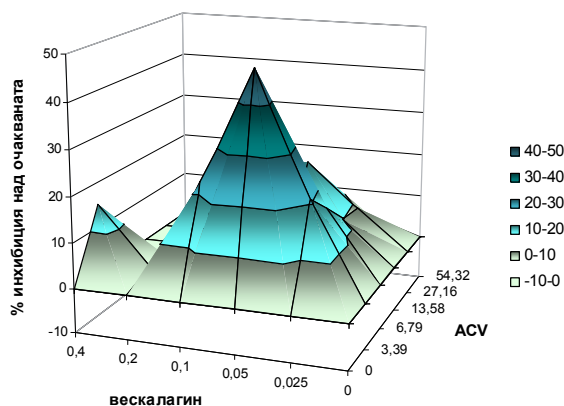


**Фиг. 7.** Комбиниран антивирусен ефект на касталагин и ACV върху репликацията на HSV-1 (щам R-100), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

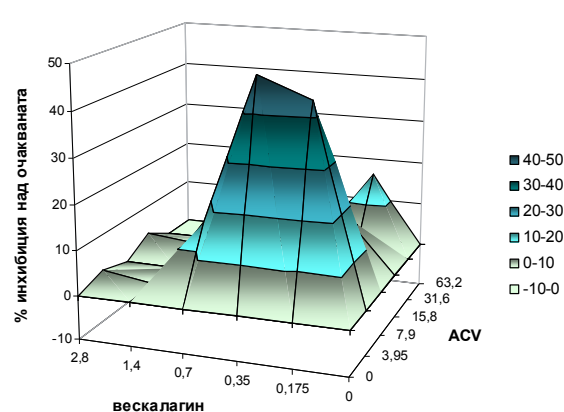
a)



b)

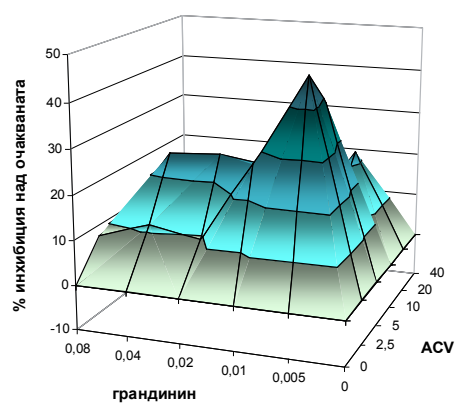


c)

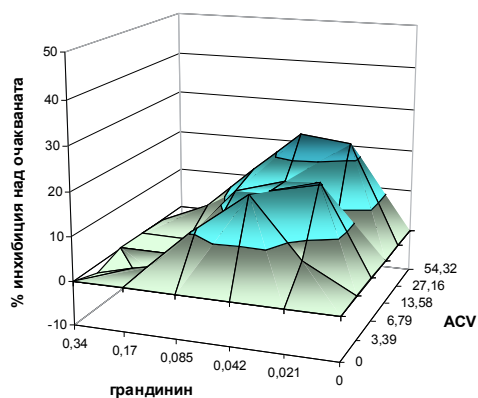


**Фиг. 8.** Комбиниран антивирусен ефект на вескалагин и ACV върху репликацията на HSV-1 (щам R-100), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

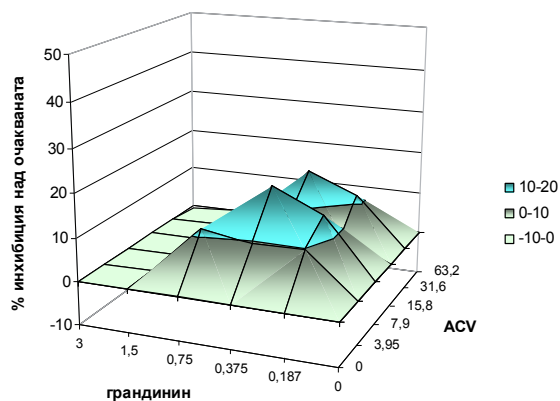
a)



b)

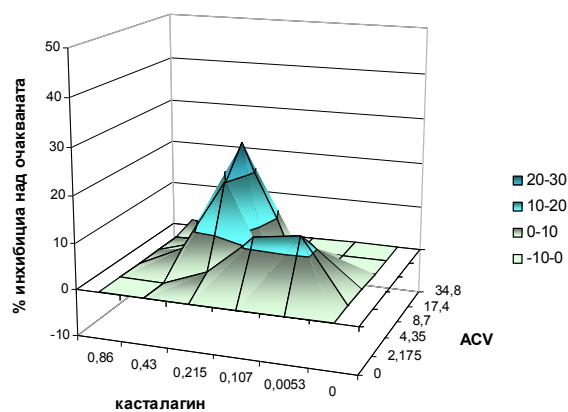


c)

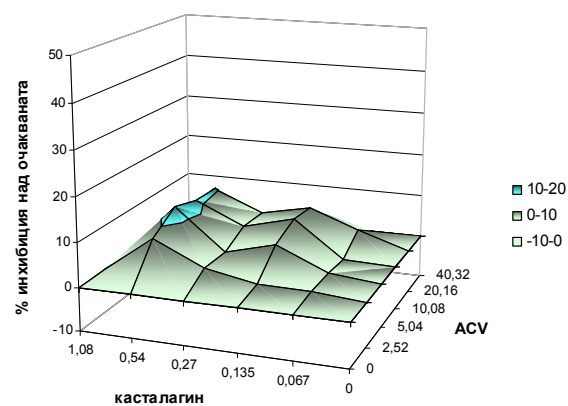


**Фиг. 9.** Комбиниран антивирусен ефект на грандинин и ACV върху репликацията на HSV-1 (щам R-100), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

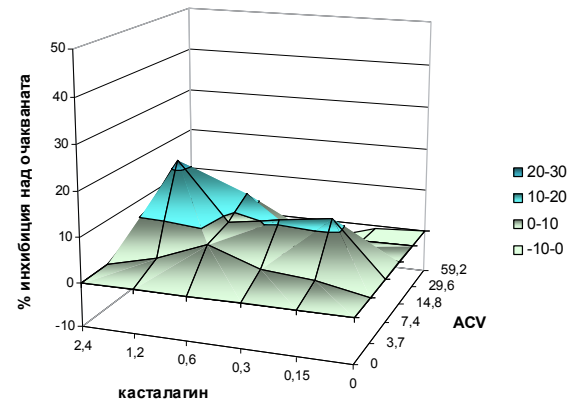
a)



b)

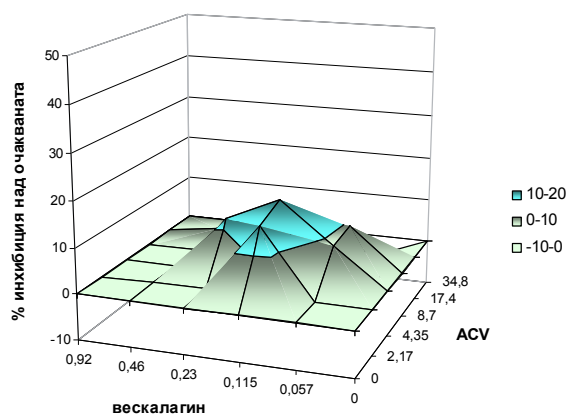


c)

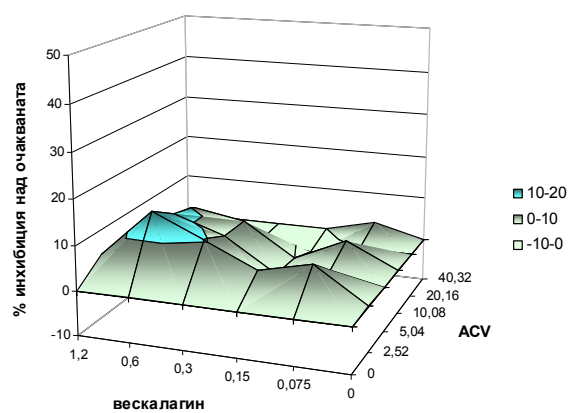


**Фиг. 10.** Комбиниран антивирусен ефект на касталагин и ACV върху репликацията на HSV-2 (щам PU), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

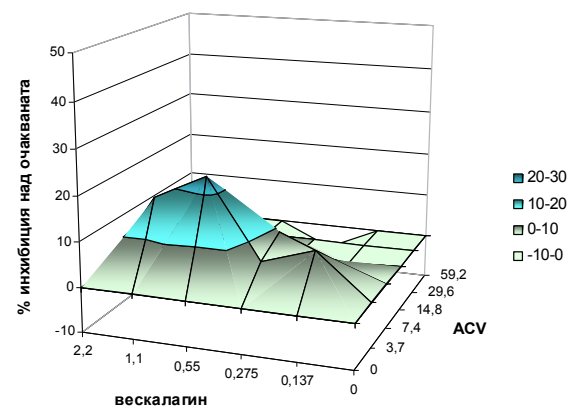
a)



b)

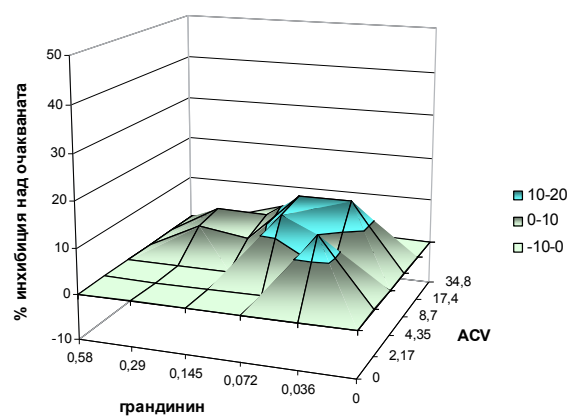


c)

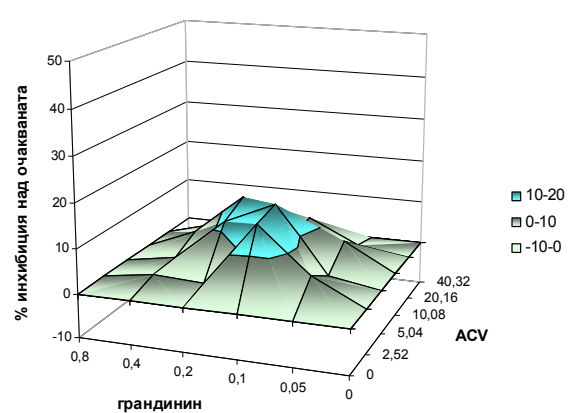


**Фиг. 11.** Комбиниран антивирусен ефект на вескалагин и ACV върху репликацията на HSV-2 (щам PU), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

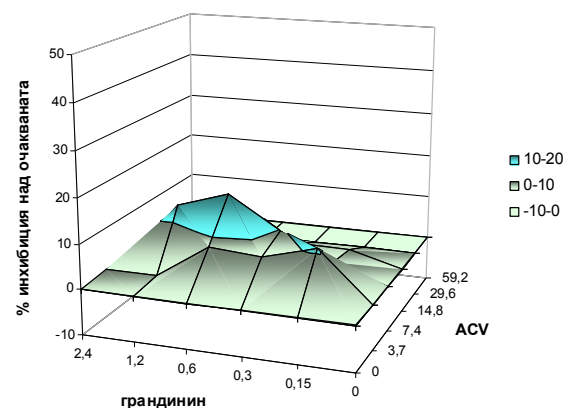
a)



b)



c)



**Фиг. 12.** Комбиниран антивирусен ефект на грандинин и ACV върху репликацията на HSV-2 (щам PU), отчетен чрез:  
а) микроплако-редуциращ тест; б) NR;  
с) MTT

#### **3.2.4. Комбиниран антивирусен ефект на елагитанините с ACV срещу резистентния на ACV HSV-2 щам PU.**

Комбинациите тествани върху резистентния на ACV щам PU на HSV-2 имат същия характер, както при тестването им върху щам Вја. Най-силен синергичен ефект се получава при комбинацията с грандинина, с малко по-ниски стойности е комбинацията с касталагина, следвана от комбинацията с вескалагина. И трите използвани метода дават близки стойности на синергизъм.

При комбинираният ефект на касталагина с ACV се установява отчетлив синергичен ефект, както и адитивен ефект при високите концентрации на веществата.

За комбинацията на вескалагин с ACV върху резистентния на ACV HSV-2 щам PU и по трите теста на отчитане се получава умерен синергизъм, с адитивна зона при високите концентрации и слаб антагонистичен ефект.

Ефектът на комбинацията на грандинин плюс ACV при прилагане на микроплако-редуциращия тест и чрез теста за инхибиране на цитопатичния ефект и оцветяване с NR отчита силен синергизъм, докато чрез оцветяване с МТТ се установява умерен синергизъм.

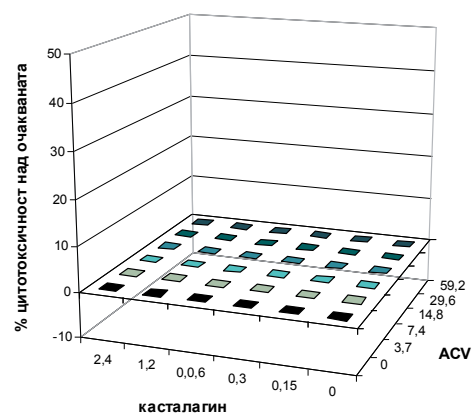
#### **3.2.5. Определяне на комбинираната цитотоксичност.**

За да бъде една комбинация ефективна и значима е желателно тя да не показва синергичен цитотоксичен ефект. Затова ние определихме ефекта от комбинираната цитотоксичност на изследваните комбинации, като отчитането се правеше на 48<sup>-ия</sup> и 72<sup>-ия</sup> час както при съответните комбинации. Тествани бяха само по една комбинация на всяко вещество с ACV за всеки от горе посочените часове, в която веществата са използвани в най-високи концентрации, като сме предположили, че при другите комбинации токсичността ще е по ниска. Получените данни за комбинирания цитотоксичен ефект се обработваха по тридименсионалния модел на Prichard и Shipman. Резултатите показват, че при никоя от тестваните комбинации не се наблюдава синергичен цитотоксичен ефект, а само адитивен ефект и при комбинациите с вескалагина и грандинина на 48<sup>-ия</sup> час има слаб антагонистичен ефект, който е по-скоро адитивен. От тези резултати може да се направи заключение, че тестваните от нас комбинации са значими, и биха били перспективни при опити *in vivo*.

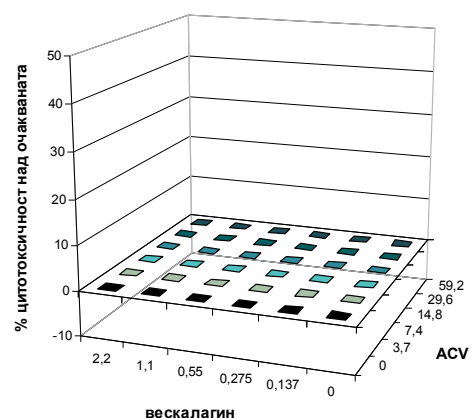
Тези резултати показват, че елагитанините касталагин, вескалагин и грандинин, и близки по структура до тях вещества могат да представляват значими антихерпесни агенти, способни да нарушават някои от етапите на вирусната репликация.

Нашите резултати, както и резултатите на други автори показват, че комбинирането им с ACV е още едно доказателство, че продукти от семейството на полифенолите, към което принадлежат елагитанините заслужават внимание като бъдещи химиотерапевтици, които да се прилагат срещу херпесни инфекции.

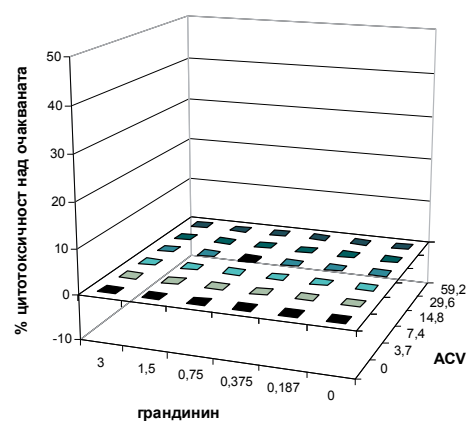
a)



b)

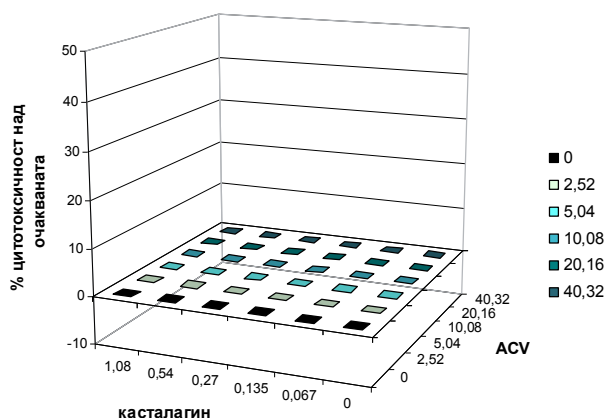


c)

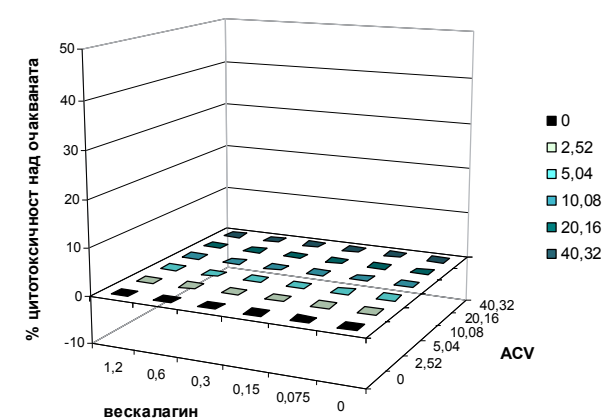


**Фиг. 13.** Комбинирана цитотоксичност на елагитанините и ACV на 72<sup>-ия</sup> час чрез оцветяване с МТТ: а) комбинация с касталагин; б) комбинация с вескалагин; в) комбинация с грандинин

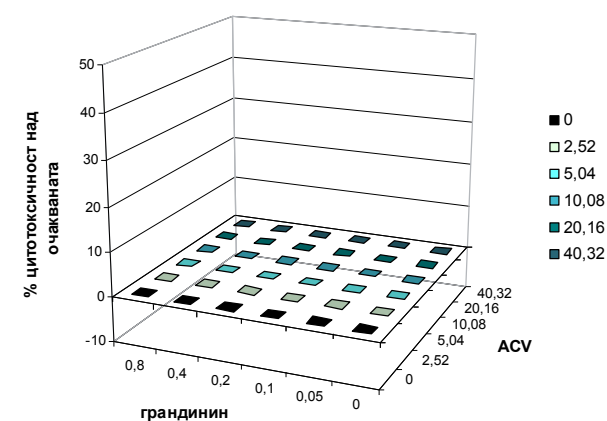
a)



b)



c)



**Фиг. 14.** Комбинирана цитотоксичност на елагитанините и ACV на 72<sup>-ия</sup> час чрез оцветяване с NR: а) комбинация с касталагин; б) комбинация с вескалагин; в) комбинация с грандинин

#### **4. Изводи**

1. Елагитанините касталагин, вескалагин и грандинин показват по-голяма токсичност в сравнение с ACV, както приложени върху стационарни клетки, така и върху растящи.
2. От изследваните елагитанини най-висока анти херпесвирусна активност, близка до тази на ACV притежава касталагина.
3. И трите елагитанина имат отчетливо по-силен ефект върху репликацията на HSV-1 в сравнение с HSV-2.
4. И трите елагитанина притежават антихерпесна активност при сравнително ниски вирусни дози. При увеличаване на вирусната доза активността им значително намалява.
5. Комбинираният антивирусен ефект на касталагин, вескалагин и грандинин с ACV върху репликацията на HSV-1 и HSV-2 е с подчертан синергичен характер.
6. Комбинираният цитотоксичен ефект на изследваните комбинации е с адитивен характер.
7. При определяне кинетиката на ефекта на касталагин върху репликацията на ACV чувствителния HSV-1 щам може да се заключи, че касталагина засяга по-ранните етапи във вирусния репликативен цикъл.
8. Касталагина оказва влияние върху извънклетъчните HSV-1 вириони, както и върху адсорбцията на вируса върху клетката, като инхибиращ ефект се отчита след 30 min.

#### **5. Приноси**

1. Охарактеризиране на нова група съединения с избирателен противохерпесен ефект с нуклеозидна природа, подтискащи репликацията на HSV-1 и HSV-2 и оказващи ефект върху ACV-резистентни щамове на тези вируси [с използване на методическата система, приета от Food-and-Drug Administration (FDA, САЩ) и от Международната организация за антивирусни изследвания (ISAR)].
2. Комбинациите на тези съединения с ACV е с изразен синергичен характер, което открива перспективи за тяхното приложение като противохерпесни средства.

## **6. Публикации свързани с дисертационния труд**

Vilhelmova, N., Jacquet, R., Quideau, S., Stoyanova, A., Galabov, A.S. Three-dimensional analysis of combination effect of ellagitannins and acyclovir on herpes simplex virus types 1 and 2. Antiviral Res. 2011; 89(2): 174-181.

N. Vilhelmova-Ilieva, S. Quideau, A. S. Galabov. Combination effect of ellagitannins and acyclovir on the replication of herpes simplex virus type 1. Second congress of virology with International Participation. Sofia, Bulgaria, 28-31 May, 2008; 121-128.

Vilhelmova-Ilieva, N., Quideau, S., Galabov, A. S. Synergistic effects of ellagitannins with acyclovir on the replication of herpes simplex virus type 2. Twelfth Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation, Yundola, Bulgaria, October 11-14, 2010, (in press).

## **7. Участия в научни конференции свързани с дисертационния труд**

Vilhelmova-Ilieva, N., Quideau, S., Galabov, A. S. Combination effect of ellagitannins and acyclovir on the replication of herpes simplex virus type 1. Second congress of virology with International Participation. Sofia, Bulgaria, 28-31 May, 2008; 121-128.

Vilhelmova-Ilieva, N., Quideau, S., Galabov, A. S. Synergistic effects of ellagitannins with acyclovir on the replication of herpes simplex virus type 2. Twelfth Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation, Yundola, Bulgaria, October 11-14, 2010.

Vilhelmova, N., Jacquet, R., Quideau, S., Stoyanova, A., Galabov, A.S. Ellagitannins as a new highly efficient inhibitors of HSV replication in vitro and synergists of ACV. The 24th International Conference on Antiviral Research, 8-11 May, 2011, Sofia, Bulgaria.

Вилхелмова, Н., Жаке, Р., Кидо, С., Стоянова, А. и Гълъбов, А.С. Нови инхибитори на репликацията на вируси херпес симплекс. Тържествено честване и юбилейна научна сесия – 65 години институт по микробиология “Стефан Ангелов”, 14-15 март, 2012, София.