

**С.Д. Загородняя, О.Ю. Повница, Г.В. Баранова, А.В. Головань,
А.О. Курова, Л.А. Белявская, Н.В. Нестерова**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина;*

МОДЕЛИРОВАНИЕ АДЕНО-ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ В ЛИМФОБЛАСТОИДНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Вирусные инфекции занимают ключевое место в медицинской практике. Среди них большая группа заболеваний обусловлена аденовирусной и герпетической инфекцией. В работах научных лабораторий, как правило, исследования направлены на изучение тех или иных аспектов взаимодействия вируса с клеткой на модели одного агента. При этом на уровне макроорганизма разные вирусные инфекции постоянно взаимодействуют друг с другом. В работе представлены исследования по отбору оптимальных моделей линий лимфобластоидных клеток для анализа особенностей смешанной адено-герпетической инфекции. Изучена репродукция аденовируса человека типа 5 и вируса Эпштейна-Барр в условиях моно- и смешанной инфекции в культурах лимфобластоидных клеток В-фенотипа B95-8, Raji, Namalwa. Выявлено как интерферирующее, так и ингибирующее действие вирусов. Так, ВЭБ, который имеет короткий 48 часовой цикл репродукции, ингибирует аденовирус именно на данный отрезок времени. Полученные клеточные модели адено-герпетической инфекции позволяют провести исследования особенностей действия этиотропных противовирусных препаратов в условиях ко-инфицирования.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, аденовирус, культура клеток, ко-инфицирование.

Объекты наших исследований, а именно, аденовирус и вирус Эпштейна-Барр, известны своим разнообразием форм взаимодействия с клеткой, от максимально возможного угнетения клеточных процессов при продуктивном цикле вирусной инфекции до перестройки ее функционирования при латентной форме [1, 2]. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) является этиологическим агентом развития лимфом (Беркитта, Ходжкина, Т-лимфоцитов) и рака носоглотки, а также выявлена его роль в этиопатогенезе желудка и рака молочной железы. Аденовирусы (Ад) – это большое семейство вирусов (*Adenoviridae*), которое включает в себя вирусы человека, животных и птиц. Известно более 50 серотипов аденовирусов, которые вызывают у человека различные по клиническим симптомам заболевания, в частности тонзиллиты, гаймориты, астматические бронхиты, пневмонии, фарингоконъюнктивальную лихорадку и другие заболевания. По своей распространенности аденовирусы занимают третье место в группе острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) после гриппа и респираторно-синцитиального вируса. В отличие от гриппа, который характеризуется четкой сезонностью, аденовирусная инфекция регистрируется в течение всего года. Важным социально-экономическим аспектом аденовирусной инфекции является ее способность к поликлиническим проявлениям: от поражений дыхательных путей, глаз, желудочно-кишечного тракта до летальности у людей при иммуносупрессивной терапии после трансплантации органов [2, 3, 4, 5].

В организме человека вирусы взаимодействуют с клетками-мишенями, используя их потенциал при воспроизведении собственного потомства. Для аденовирусной инфекции хорошо известны клетки-мишени. Недавно (Garnett et al [6]) разработали ПЦР в реальном времени (RT-PCR) для количественного определения аденовирусной ДНК для вирусов группы С в человеческих тканях, удаленных из миндалин и аденоидов. В 79 % образцов аденовирусная ДНК была обнаружена в лимфоцитах, и в частности в Т-лимфоцитах слизистой оболочки, соответственно они могут быть резервуаром аденовирусов. Как правило, на уровне макроорганизма одновременно сосуществует целый спектр вирусных и микробных патогенов, которые находятся в одних и тех же тканях и могут вступать во взаимодействия. В обзоре, представленном Т. Da Palma* с соавторами [7], известные типы вирус-вирусного взаимодействия разделили на три категории: (1) прямое взаимодействие вирусных генов или генных продуктов, (2) косвенное взаимодействие, происходит в результате изменений в окружающей среде, и (3) опосредованные взаимодействия, обусловленные иммунологическими взаимодействиями для организмов с адаптивной иммунной системой. Как первичное звено исследований взаимодействий используется культура клеток.

Целью данной работы было изучение способности к репродукции аденовируса 5 серотипа в лимфобластоидных Эпштейн-Барр вирусассоциированных клетках В-фенотипа и его влияние на пролиферацию этих клеток.

© С.Д. Загородняя, О.Ю. Повница, Г.В. Баранова, А.В. Головань, А.О. Курова, Л.А. Белявская, Н.В. Нестерова, 2012

Материалы и методы. *Культуры клеток и вирусы.* Нер-2 – клетки карциномы гортани человека; Raji – недифференцированные лимфобластоидные клетки человека В-типа из лимфомы Беркитта, которые содержат геном вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ); Namalwa – клетки из лимфомы Беркитта, содержащие интегрированные 2-5 копий генома ВЭБ, но не продуцирующие вирус; В95-8 – лейкоциты обезьян мармазеток, трансформированные ВЭБ и хронически продуцирующие его.

Лимфобластоидные культуры клеток выращивали на ростовой среде, которая состояла из 90% среды RPMI 1640 (“Sigma”, США), 10 % сыворотки эмбриона коровы (ЭТС) (“Sigma”, США) и антибиотиков – пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл). Для эпителиальных культур клеток в качестве ростовой среды использовали 90% ДМЕМ (БиоТестМед, Киев) с 10 % ЭТС (“Sigma”, США). Культивирование проводили при 37 °С в термостате с добавлением 5 % CO₂.

Эталонный штамм аденовируса серотипа 5 (Ad h5) получен в 1967 г. из коллекции Института микробиологии Будапештского медицинского университета. Использовали методы очистки и хранения, которые описаны ранее [8].

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) выделяли из суспензии лимфобластоидных клеток В95-8 с использованием индуктора ТФА (12-О-tetradecanoylphorbol-13-acetate) («Sigma», США), добавление которого проводили согласно инструкции производителя и в соответствии с рекомендациями [9].

Схема инфицирования лимфобластоидных клеток. Клетки выращивали до плотности 1,5–2 × 10⁶ кл/мл, отмывали от сыворотки, осаждали центрифугированием при 1 тис. об/мин 10 мин, ресуспендировали в минимальном объеме среды RPMI 1640 (до плотности клеток 2 × 10⁶) без сыворотки и вносили культуральный аденовирус из расчета 10, 30 ВОЕ/кл (включенные образующие единицы на клетку). Адсорбция вируса происходила в течении 1,5 часов при комнатной температуре, далее клетки отмывали от не адсорбированного вируса, центрифугировали в предыдущем режиме и пипетировали в среде RPMI 1640 с 5 % сыворотки эмбриона коровы до конечной плотности 5 × 10⁵ кл/мл. Клетки инкубировали в термостате при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Отбор материала для анализа проводили через 0, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после заражения клеток.

Метод определения пролиферации и жизнеспособности клеток с использованием трипанового синего. Жизнеспособность и степень роста лимфобластоидных клеток при разных множественностях инфицирования аденовирусом определяли с использованием красителя трипанового синего (“Sigma”, США). Клетки окрашивали 0,4 % раствором красителя в соотношении 1:1 и просчитывали количество живых и мертвых в камере Горяева в световом микроскопе при увеличении 70.

Определение инфекционного титра аденовируса. Инфекционный титр аденовируса синтезированного *de novo* определяли в чувствительных (пермиссивных) клетках Нер-2 цитоморфологическим методом при окраске клеток акридиновым оранжевым (АО). Для этого суспензию инфицированных лимфобластоидных клеток (отобранных в динамике исследования через 0–120 часов) трижды замораживали в жидком азоте, готовили серию 10-ти кратных разведений и этим материалом заражали клетки Нер-2. Пермиссивные для аденовируса клетки Нер-2 выращивали на полосках покровных стекол в пробирках. Через 24 часа роста на сформированный монослой вносили 0,2 мл подготовленного материала. Адсорбцию вируса проводили при комнатной температуре на протяжении 1,5 часов. Без отмывания клеток после адсорбции вносили по 0,8 мл поддерживающей ростовой среды (ДМЕМ без сыворотки). Клетки инкубировали 48 часов в термостате при 37 °С, после чего отмывали раствором Хенкса, фиксировали 96° этиловым спиртом. Для каждого разведения вируса использовали не менее 3-х пробирок. Перед окраской препаратов АО клетки отмывали от спирта раствором Хенкса, окрашивали 0,01 % раствором АО и исследовали в люминесцентном микроскопе (МЛ-2, ЛОМО) на наличие вирусоспецифических внутриядерных аденовирусных включений [12]. Титр вируса определяли по формуле:

$$\text{Титр вируса ВОЕ/мл} = (A \times B) / C,$$

где А – общее количество клеток с включениями в пробирке,

В – исследуемое разведение вируса (обратная величина)

С – объем инокулята.

Определение репродукции ВЭБ с использованием полимеразной цепной реакции. ДНК из клеток выделяли с использованием «DNA-sorb-B DNA kit» («AmpliSens», Россия). Концентрация ДНК была измерена, с использованием Biophotometer («Eppendorf», Германия). Выявления ДНК ВЭБ проводили методом ПЦР, с использованием набора «AmpliSens® EBV-EPh» («AmpliSens», Россия) согласно рекомендациям изготовителя. Каждая анализируемая в ПЦР проба содержала 50 нанограмм ДНК.

Продукты амплификации и GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва) были фракционированы в 1.7 % (w/v) агарозном геле, который содержал 0,01 % (v/v) этидиум бромид. Результаты визуализировали в трансиллюминаторе и обрабатывали в программе Gel Imager («DNA-technology», Россия).

Статистическая обработка данных была выполнена согласно стандартным подходам к вычислению статистических ошибок (стандартное отклонение), используя компьютерную программу Microsoft Excel 2007 [10].

Результаты и их обсуждение. Для реализации поставленной цели, а именно создания адено-герпетической модели в лимфобластоидных клеточных линиях, были использованы культуры В-лимфоцитов, трансформированные ВЭБ с разным состоянием вирусного генома и, соответственно, продукцией разных ВЭБ специфических онкопротеинов. Культура клеток В95-8 поддерживает хроническую продукцию инфекционных вирусных частиц, Raji – содержит около 60 копий вирусного генома на клетку, но экспрессирует только ранний вирусный антиген (ЕА), нуклеарные антигены (ЕВНА). В данных клеточных культурах вирусная ДНК находится в эписомальной форме, в отличие от культуры клеток Namalwa, где геном ВЭБ находится в интегрированной форме в количестве 2 копий на клетку. Оптимальными условиями для связывания аденовируса с клеткой является наличие специфических рецепторов, в частности, САР (соxsackie and adenovirus reserptor). Несмотря на всестороннее исследование аденовируса, вопросы его связывания с не эпителиальными клетками остается открытым. В то же время показана способность аденовируса 2 серотипа репродуцироваться как в лимфоцитах периферической крови, так и в В- и Т-лимфобластоидных клетках.

Исследование к-инфицирования Ад-ВЭБ в культуре клеток В95-8. Заражение клеток аденовирусом 5 серотипа проводили в двух множественностях инфицирования 10 и 30 ВОЕ/кл, пробы для анализа отбирали через 0, 24, 48, 72, 96 и 120 часов. На рис. 1 представлены показатели пролиферативной активности клеток В95-8 суперинфицированных аденовирусом.

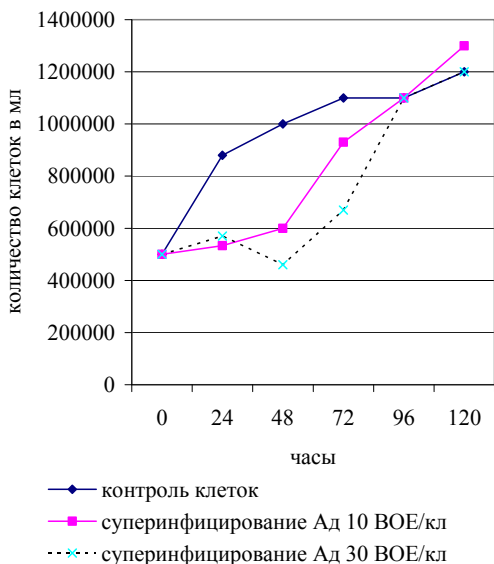


Рис. 1. Динамика прироста количества клеток В95-8 суперинфицированных Ад 5. ($p \leq 0.05$)

Как видно из представленного рисунка, инфицирование аденовирусом приводит к торможению пролиферативной активности клеток на 24-48 часов с постепенным ростом количества клеток к 72 часам. При определении жизнеспособности клеток с использованием трипанового синего, процент мертвых клеток не превышал 13 % (120 часов).

На рис. 2 показаны аденовируспецифические включения при окрашивании акридиновым оранжевым.

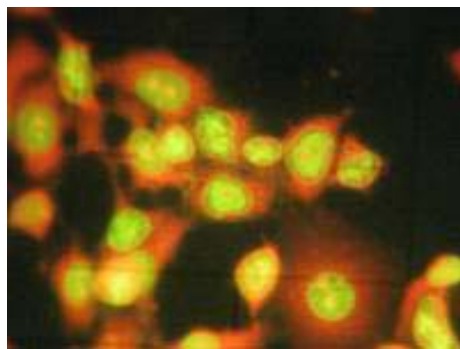


Рис. 2. Выявление вирусоспецифических включений в культуре клеток Нер-2 (люминесцентная микроскопия, окрашивание АО, увеличение x 200)

В табл. 1 представлены результаты определения репродукции Ад 5 и ВЭБ. Следует отметить, что в контроле неинфицированных клеток аденовирус отсутствовал, а уровень ВЭБ инфекции был около 4,2 lg.

Таблица 1

Динамика репродукции адено- и Эпштейн-Барр вируса при суперинфицировании клеток В95-8 аденовирусом человека серотипа 5

Множественность инфицирования клеток Ад 5 (ВОЕ/кл)	Время исследования (часы)	Инфекционный титр Ад 5 lg ВОЕ/мл	Относительные единицы количества ДНК ВЭБ (lg)
0 (контроль клеток)		0	4,2 ± 0,1
10	0	4	4,3 ± 0,2
30		4,93	0
10	24	4,83	4,1 ± 0,1
30		5,08	0
10	48	5,23	0
30		5,19	0
10	72	6,19	4,3 ± 0,2
30		6,26	4,4 ± 0,4
10	96	6,11	4,1 ± 0,1
30		6,26	3,7 ± 0,1
10	120	6,15	4,2 ± 0,3
30		6,23	0

Было показано, что инфекционный титр аденовируса увеличивается на 1 lg к 48 часу репродукции и на 2 lg через 72 часа и оставался на этом уровне до конца исследования (120 часов). Выявлено угнетение репродукции вируса Эпштейна-Барр: через 48 часов ДНК ВЭБ не выявлялась при суперинфицировании клеток аденовирусом независимо от множественности инфицирования, а через 24 и 120 часов при инфицировании в дозе 30 ВОЕ/кл. Полученные результаты свидетельствуют об ингибирующем действии Ад 5 на репродукцию ВЭБ в культуре клеток В95-8.

Исследование ко-инфицирования Ад-ВЭБ в культуре клеток Raji и Namalwa. Данные клеточные линии, инфицированные аденовирусом и вирусом Эпштейна-Барр, в условиях инфицирования одним вирусом и при одномоментном инфицировании Ад и ВЭБ по-разному реагировали на присутствие вирусов (рис. 3). Так, в клетках Raji, вирус Эпштейна-Барр стимулирует пролиферативный процесс, что обусловлено тем, что данная клеточная линия, которая в своем составе имеет вирусную ДНК в эписомальной форме, получает стимул к продукции вирусного потомства. Этот процесс осуществляется путем усиленного клеточного деления и, соответственно, передаче новым клеточным поколениям генетического материала вируса. Суперинфицирование клеток аденовирусом с разной множественностью, а также ко-инфицирование клеток Raji смесью вирусов ингибирует рост клеток в среднем на 30-40 %, достигая максимума

через 120 часов, что обусловлено пиком продукции аденовируса именно к этому часу в этой клеточной культуре.

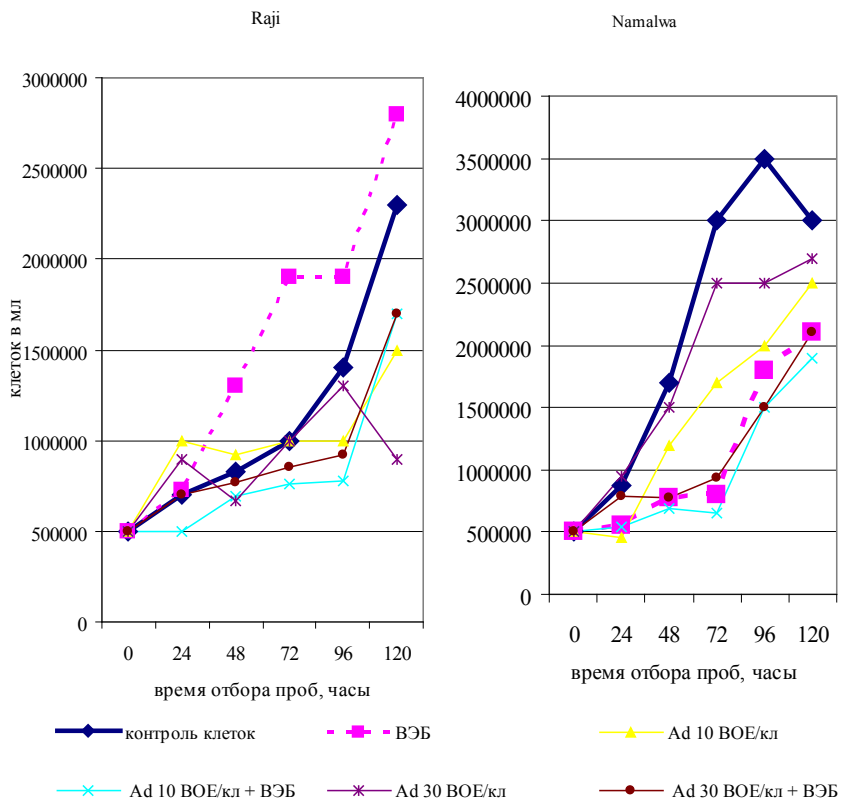


Рис. 3. Динамика прироста клеточной популяции Raji и Namalwa при суперинфицировании их Ад и ВЭБ и ко-инфекции обоими вирусами ($p \leq 0.05$)

В культуре Namalwa к-инфицирование Ад и ВЭБ, а также моноинфекция ВЭБ угнетает прирост этой клеточной популяции, при этом аденовирусная инфекция, независимо от дозы инфицирования, угнетает прирост клеточной популяции в меньшей степени. Анализируя соотношение живых и мертвых клеток в данных модельных системах выявлено, что их показатель не превышает 15 %, соответственно, аденовирусная инфекция в условиях моноинфицирования и при смешанном инфицировании с вирусом Эпштейна-Барр существенно не влияет на жизнеспособность культуры клеток Raji и Namalwa, при этом угнетает их размножение.

Результаты анализа репродукции аденовируса 5 серотипа в исследуемых клеточных линиях представлены на рис. 4. Показано, что аденовирусная инфекция более интенсивно репродуцируется в условиях ко-инфицирования клеток. При одномоментном инфицировании Ад 5 и ВЭБ исследуемых клеточных линий выявлены более высокие титры аденовируса, но при этом следует отметить, что увеличение титра происходит, начиная с 72 часов. Так в культуре клеток Raji инфекционный титр Ад5 2 – 3×10^6 ВОЕ/кл на 96 и 120 часов против $5,8 - 6,4 \times 10^5$. В клетках Namalwa Ад 5 накапливался в титре $3,6 - 4,2 \times 10^6$ ВОЕ/кл, что в 5 раз выше аналогичных показателей при моноинфекции.

В условиях ко-инфицирования клеток аденовирусом 5 серотипа и вирусом Эпштейна-Барр, уровень репродукции ВЭБ контролировали методом полимеразной цепной реакции. На рис. 5 представлены результаты анализа уровня накопления ДНК ВЭБ в разных множественностях инфицирования клеток аденовирусом. Показано, что репродукция ВЭБ в клетках Raji происходит более интенсивно, чем в Namalwa. Суперинфицирование клеток Ад 5 с множественностью 30 ВОЕ/кл ингибирует репродукцию ВЭБ через 24, 48 и 120 часов. В культуре клеток Namalwa с 24 до 72 часов наблюдается существенное ингибирование репродукции ВЭБ, но к 120 часам она возрастает до уровня моноинфекции ВЭБ.

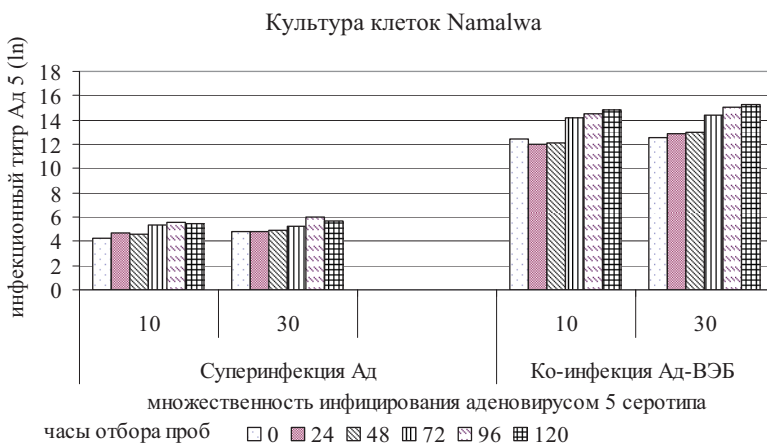
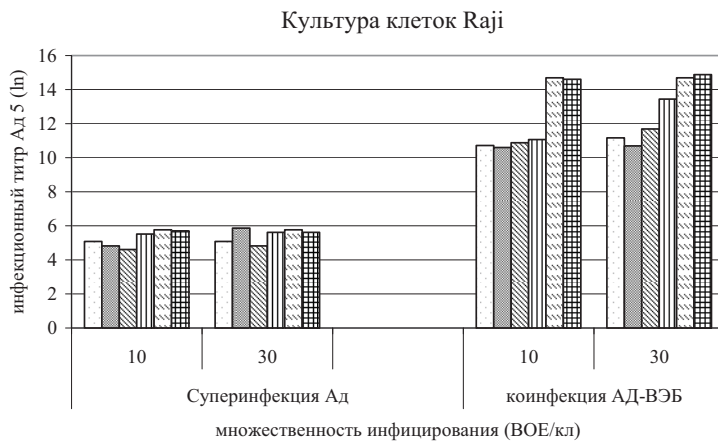


Рис. 4. Инфекционный титр аденовируса серотипа 5 в культурах клеток Raji и Namalwa при моно- и смешанном инфицировании их Ад 5 и ВЭБ.

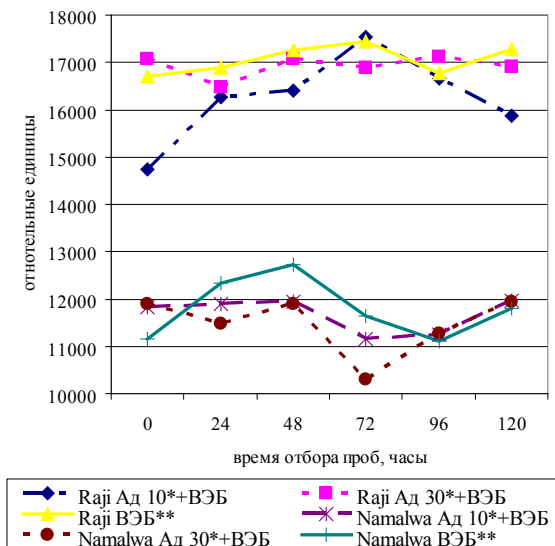


Рис. 5. Уровни накопления ДНК ВЭБ в модельных клеточных системах при разной множественности инфицирования клеток аденовирусом 5 серотипа (метод ПЦР).

Примечание: * ВОЕ/кл

** моноинфицирование вирусом Эпштейна-Барр

Таким образом показано, что как в культуре клеток Raji, так и Namalwa, аденовирусная суперинфекция в разной степени угнетает репродукцию ВЭБ.

Таким образом, исследована репродукция аденовируса человека типа 5 и вируса Эпштейна-Барр в условиях моно- и смешанной инфекции в культурах лимфобластоидных клеток В-фенотипа B95-8, Raji, Namalwa. Выявлено наличие как интерферирующего, так и ингибирующего действия вирусов. Так, ВЭБ, который имеет короткий 48 часовой жизненный цикл, ингибирует репродукцию аденовируса именно на данный отрезок времени. Полученные клеточные модели смешанной адено-герпетической инфекции позволяют провести исследования особенностей действия этиотропных противовирусных препаратов в условиях ко-инфицирования.

В литературе все чаще представлены исследования, которые показывают роль одной вирусной инфекции в развитии патологии обусловленной другим вирусом. Так показана роль белков вируса Эпштейна-Барр в интеграции папилломавирусного генома, что приводит к развитию рака шейки матки. [11]. Серотипы 1, 2, 5, 6 подгруппы С аденовирусов вызывают персистирующую инфекцию в миндалинах и аденоидах, что играет важную роль в формировании хронических заболеваний этих органов. Один серотип аденовируса может вызывать развитие различных клинических форм болезни [2, 12]. Представленные исследования являются продолжением цикла работ, проведенных в отделе молекулярной биологии вирусов под руководством Дяченко Н.С. Так, ранее с использованием ряда методов было показано, что в линиях лимфобластоидных клеток В- и Т-лимфоцитов происходит продуктивный цикл репродукции аденовируса серотипа 2, при этом в культуре клеток B95-8 показана его более низкая репродукция [13]. В культуре клеток Raji накопление генома Ад 2 наблюдалось на уровне перmissive культуры Her-2, а инфекционный вирус появляется уже через 24 часа с максимальными титрами к 120 часам, который на 1-2 lg ВОЕ/кл был ниже, чем в клетках Her-2. Инфицирование Ад 2 В-лимфобластоидных клеток (Raji и B95-8) не изменяло в них состояние онкогена c-sis, но показало, что инфицирование Ад 2 клеток B95-8 приводило к уменьшению профиля рестрикции ДНК и величины фрагмента, который гибридизировали с зондом, содержащим последовательность гена ядерного антигена EBNA-1 ВЭБ. Изменение генома аденовируса при суперинфицировании клеток не наблюдалось [14, 15]. Новый толчок к проведению исследований взаимодействия между данными вирусами дает все более широко развивающееся направление по созданию векторов на основе аденовирусов и вируса Эпштейна-Барр [16]. Нами проведен анализ возможности репродукции аденовируса 5 серотипа в лимфобластоидных клеточных линиях В-фенотипа Raji, Namalwa, а также в B95-8 - лейкоцитах обезьян-мармазеток, которые трансформированы ВЭБ и хронически продуцируют инфекционные вирусные частицы. Показано, что титр аденовируса существенно возрастает в условиях одномоментного инфицирования клеток Ад 5 и вирусом Эпштейна-Барр, поэтому можно предположить, что инфицирование В-лимфоцитов ВЭБ способствует аденовирусу инфицировать данные клетки. Анализ влияния аденовирусной инфекции на пролиферативную активность клеточной культуры и, соответственно, ее жизнеспособность показал, что существенного отличия при разных множественностях инфицирования клеток Ад (10 и 30 ВОЕ/кл) не наблюдается. Большая доза инфицирования не существенно увеличивает выход инфекционного потомства. Это дает нам основания для использования более низкой дозы инфицирования при дальнейших исследованиях. Данные исследования направлены на расширение знаний о возможных процессах вирус-вирусного взаимодействия в условиях перmissive клеточной модели для одной из инфекций, в частности в В-лимфоцитах как резервуаре персистенции вируса Эпштейна-Барр, а также возможной роли данных процессов на развитие резистентности вирусов к противовирусным препаратам.

**С.Д. Загородня, О.Ю. Повниця, Г.В. Баранова, А.В. Головань,
А.О. Курова, Л.О. Білявська, Н.В. Нестерова**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна*

МОДЕЛЮВАННЯ МОДЕЛІ АДЕНО-ГЕРПЕТИЧНОЇ ІНФЕКЦІЇ В ЛІМФОБЛАСТОЇДНИХ КУЛЬТУРАХ КЛІТИН

Резюме

Вірусні інфекції займають ключове місце в медичній практиці. Серед них велика група захворювань обумовлена аденовірусною та герпетичною інфекцією. У роботах наукових лабораторій, як пра-

вило, дослідження спрямовані на вивчення тих чи інших аспектів взаємодії вірусу з клітиною на моделі одного агента. При цьому на рівні макроорганізму різні вірусні інфекції постійно взаємодіють одна з одною. В роботі представлені дослідження з відбору оптимальних моделей ліній лімфобластоїдних клітин для аналізу особливостей змішаної адено-герпетичної інфекції. Вивчено репродукцію аденовірусу людини типу 5 і вірусу Епштейна-Барр в умовах моно-та змішаної інфекції в культурах лімфобластоїдних клітин В-фенотипу: B95-8, Raji, Namalwa. Виявлена як інтерферуюча, так і інгібуюча дія вірусів. Так, ВЕБ, який має короткий 48 годинний цикл репродукції, інгібує аденовірус саме на даному відрізку часу. Отримані клітинні моделі адено-герпетичної інфекції дозволять провести дослідження особливостей дії етіотропних антивірусних препаратів в умовах ко-інфікування.

**S.D. Zagorodnya, O.Yu. Povnitsa, G.V. Baranova, A.V. Golovan,
A.O. Kurova, L.O. Biliavska, N.V. Nesterova**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

MODELLING OF THE ADENO-HERPETIC INFECTION IN LYMPHOBLASTOID CELL CULTURES

S u m m a r y

Viral infections take the key place in medical practice. A large group of diseases are caused by adenoviral and herpes infection. As a rule, the investigations carried out in scientific laboratories are directed to the study of certain aspects of the interaction between the virus and the cell on the model of single infection. At the same time different viral infections at the level of macroorganism are constantly interacting with each other. The paper presents the studies on the selection of optimal models of lymphoblastoid cell lines for analysis of peculiarities of the mixed adeno-herpetic infection. The reproduction of human adenovirus type 5 and Epstein-Barr virus in the mono- and mixed infection in lymphoblastoid cell cultures of B-phenotype: B95-8, Raji, Namalwa have been studied. Both interfering and inhibiting action of viruses are shown. So EBV, which has a short 48-hour cycle of reproduction, inhibits the adenovirus at the given time. The obtained cell models of adeno-herpes infection will allow to study peculiarities of the antiviral action of etiotropic antiviral preparations in conditions of co-infection.

The paper is presented in Russian.

К е у в о р д с: *Epstein-Barr virus, adenovirus, cell culture, co-infection.*

The a u t h o r ' s a d d r e s s: *Zagorodnya S.D., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny Str., Kyiv, GSP, D 03680, Ukraine.*

1. *Lawrence S. Young, Alan B. Rickinson.* Epstein-Barr virus: 40 years on. // *Nature Reviews Cancer* – 2004. – 4. – P. 757–768.
2. *Russell W. C.* Update on adenovirus and its vectors. // *J. Gen. Virol.* – 2000. – 81. – P. 2573–2604.
3. *Kutok J.L., Wang F.* Spectrum of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2006. – 1. – P. 375–404.
4. *Vo Q.N., Geradts J., Gulley M.L. et al.* Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation // *J Clin Pathol.* – 2002. – 55. – P. 669–675.
5. *Glaser S.L., Hsu J.L., Gulley M.L.* Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2004. – 13. – P. 688–697.
6. *Garnett, C. T., Erdman, D., Xu W., Gooding, L. R.* Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes // *J. Virol.* – 2002. – 76. – P. 10608–10616.
7. *Da Palma T., Doonan B.P., Trager N.N.M., Kasman L.M.* A systematic approach to virus-virus interactions // *Virus Research* – 2010. – 149, N 1. – P. 1–9
8. *Berencsi Gy., Dyachenko N.S., Tarassishin L.A. et al.* Changes of adenovirus hexon associated with different passage history of Ad h1//*Acta microbial. Hung.* – 1986. – 33, N 3. – P.233–243.
9. *Уоллз Э., Крофорд Д.* Культивирование клеток В95-8 // Лимфоциты. Методы – М: Мир, 1990. – С.230–249.
10. *Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: МОРИОН, 2001. – 408 с.
11. *Szostek S., Zawilinska B., Kopec J., Kosz-Vnenchak M.* Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis//*Acta Biochimica Polonica.* – 2009 – 56, N 2 – P. 337–342
12. *Повнища О.Ю., Дяченко Н.С., Черномаз А.А. и др.* Особенности репродукции аденовируса человека типа 2 в культурах лимфобластоидных клеток В- и Т-фенотипа // *Микробиол. журн.* – 1997. – 59, N 6 – С.12–19.

13. Носач Л.Н., Дяченко Н.С., Повница О.Ю. и др. Изучение состояния вирусных геномов в условиях смешанной инфекции лимфобластоидных клеток аденовирусом и вирусом Эпштейна-Барр // Цитология и генетика – 1998. – 32, N 4 – С. 82–88
14. Smirnova I., Kishinskaya E.G., Nosach L., Povnitsa O., Dyachenko N. Structural gene alterations in lymphoblastoid B- and T-cell lines upon mono- and double adenovirus and Epstein-Barr virus infection// Experimental Oncology. – 2001. – 23, N1. – P.57–60.
15. Garnett C. T., Talekar G., Mahr J. A. et al. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues// J. of Virology. – 2009. – 83, N 6. – P. 2417–2428
16. Dorigo O., Gil J.S., Gallaher S.D. et al. Development of a novel helper-dependent adenovirus-Epstein-Barr virus hybrid system for the stable transformation of mammalian cells.// J. Virol. – 2004 – 78, N 12. – P. 6556–66.

Отримано 25.05.2011

UDK 547.759.3+578.245+615.281.8

**G.V. Antonovych¹, N.M. Zholobak¹, S.A. Lyakhov², M.O. Shibinska²,
S.A. Andronati², M.Y.Spivak¹**

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, 03680, Ukraine

²A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine,
86 Lyustdorfskaya doroga, Odessa, 65080, Ukraine

DOSE-DEPENDENT IFN-STIMULATING AND IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF 6H-INDOLO[2,3-B] QUINOXALINE DERIVATIVES

Two 6H-indoloquinoxaline derivatives were studied in different doses and schemes of application for their IFN-inducing potential and ability to effect functional activity of phagocytic cells. Tested compounds were shown to possess comparable or higher activity than reference drug Amixin in analogous doses. One indoloquinoxaline significantly elevated metabolic activity of macrophages and increased their potential for phagocytosis. Application of multiple treatments and higher doses allowed us to reveal differences between studied derivatives that were not obvious in previous in vivo experiment. Capacity of 6H-indoloquinoxalines to induce vast IFN amounts on in vivo level was demonstrated for the first time.

Key words: indoloquinoxaline derivatives, antiviral substances, interferon inducers

Insufficient effectiveness of modern medicine against many socially important viral infections is the reason for continuous efforts to develop new antiviral drugs. Synthetic low-molecular heteroaromatic compounds are a group of chemicals that are paid particular interest to, since they are able to pass through cytoplasmic and nuclear membranes, which is crucial for combating intracellular pathogens. Many low-molecular antivirals are also capable to stimulate interferon (IFN) production. Tilorone hydrochloride is a classical example of such low-molecular agents, which both induces a range of antiviral interleukins and exerts direct antiviral action, not mediated through cytokines [14]. Although several other similar drugs, such as Amizon, Arbidol, Cycloferon, Larifan, etc. [15], are already present in pharmaceutical market, there is still a need to widen their range. In recent years we have demonstrated that two newly synthesized 6-aminoethyl-6H-indolo[2,3-b]quinoxaline derivatives possess antiviral potential against RNA and DNA viruses in vitro [7], and are able to stimulate IFN production in mice. However, initial experiments in vivo [1] involved a rather low dose – 5 mg/kg, and only single administration. At the current stage of investigation it is necessary to prove that the mentioned 6H-indoloquinoxalines possess higher activity or more advantageous set of biological properties than existing drugs. To increase earlier obtained results multiple administration scheme and elevated doses were applied. Besides IFN production, functional activity of phagocytic cells was measured to prove immunomodulating potential of tested compounds.

© G.V. Antonovych, N.M. Zholobak, S.A. Lyakhov 2, M.O. Shibinska2, S.A. Andronati2, M.Y.Spivak, 2012