B 5041

AVIAN ADENOVIRUSOK GAL TYPUSA INTERFERONT INDUKÁLÓ KÉPESSÉGÉNEK TANULMÁNYOZÁSA

egyetemi doktori disszertáció

Bakay Márta

Szegedi Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézete

1969.

B 5041
SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
14.
ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÖNYVTÁRA
Szeged
E 1.116

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

A z i n t e r f e r o n

A virusbetegségek gyógyitásának problémája napjainkban is az orvostudomány megoldatlan kérdései közé tartozik. A virusok sejt-parazita voltából adódnak azok a nehézségek, amelyek korlátozzák a viruschemotherápiás szerek alkalmazásának lehetőségeit, mivel csak olyan anyag alkalmas therápiás célokra, amely specifikusan a virusszaporodásra hat, a gazdasejt biokémiai történéseit pedig nem befolyásolja. Bár már néhány évtizede széles körben folynak ilyen irányu kutatások, mégis kevés chemotherápiás szerről mondhatjuk, hogy a gyakorlatban is bevált. A himlő ellen prophylacticumként sikeresen alkalmazták a Marborant, amely tiosemicarbazon származék /Bauer és munkatársai 1963/, valamint kedvező hatást ér-

tek el jód-desoxyuridinnel herpes keratitis helyi kezelésében /Gilkes 1963/. Ezen példák kivételével a szervezet virusfertőzésekkel szembeni védelme még ma is a természetes uton, vagy vaccinálások hatására képződő specifikus ellenanyagokon alapszik.

Ezért váltott ki nagy érdeklődést az interferon 1957-ben történő felfedezése. Az interferon olyan antivirális protein, amelyet a gerincesek sejtjei termelnek virusfertőzés hatására. Felfedezése és elnevezése Isaacs és Lindenmann nevéhez füződik /Isaacs és Lindenmann 1957/, akik megfigyelték, hogy inaktivált influenza virussal oltott csirke-chorioallantois hártya sejtjei egy olyan anyagot termelnek, amely a csirkesejteket virusfertőzéssel szemben ellenállóvá teszi.

Az interferon jelentős mértékben különbözik az ellenanyagtól, amely szintén állati sejtek által termelt antivirális fehérje. Az ellenanyag a szervezet speciális sejtjeiben képződik, interferont pedig ugyszólván bármely sejt termelhet megfelelő stimulus hatására /Isaacs 1963/. Az ellenanyag antivirális hatása kizárólagosan olyan antigén-szerkezetü virus ellen

irányul, amely kiváltotta az ellenanyag képzést, ugyanakkor az interferon nem virusspecifikus, valamely virussal indukált interferon gyakorlatilag minden virus szaporodását gátolja /Isaacs 1963/. Különböző virusok szaporodásának gátlásához azonban különböző mennyiségü interferon szükséges, tehát a virusok nem egyformán érzékenyek az interferonnal szemben. Az ellenanyaggal ellentétben, az interferon antivirális hatása specieshez kötött, azaz egyik species sejtjeiben termelt interferon csak ugyanannak, vagy közeli rokonságban lévő speciesnek sejtjeiben hatásos /Tyrrel 1959, Merigan 1964, Baron és munkatársai 1964/. Egyazon állati speciesben különböző virusok által indukált interferonok nem különböztethetők meg egymástól. Másrészt különböző speciesek sejtjei által termelt interferonok között nemcsak species specificitásuk, hanem antigénszerkezetük /Paucker 1965/ és hőstabilitásuk alapján /Isaacs 1963/ is különbség tehető. Az interferon egyéb jellemző tulajdonsága az 1-10 pH értékek közötti stabilitás /Isaacs 1963/, valamint a gyenge antigén sajátság /Paucker 1965/. A csirkesejtekben képződött interferon molekulasulya 20-34 000 /Lampson és munkatársai 1963/, 1-2 órán át 100 000 g-vel történő centrifugálással nem szedimentálható. A

tisztitott interferon sem in vitro kisérletekben /Baron és munkatársai 1966a, Levy és Merigan 1966/, sem in vivo alkalmazva /Falcoff és munkatársai 1966/ nem bizonyult toxikusnak.

Az a megfigyelés, hogy az actinomycin D, amely gátolja a DNS-től függő RNS-szintézist, megakadályozza az interferon képződését is /Heller 1963/, arra enged következtetni, hogy az interferon termelését irányitó genetikai információt a sejtek represszált állapotban hordozzák /Isaacs 1963/. Virusfertőzés hatására derepresszió következtében megindul a gazdasejt DNS-éről másolt interferon messenger-RNS képződése, amely azután az interferon fehérje molekula szintézisét irányitja. Az interferon a virustól és a sejt typusától függően az indukció után 1-30 óra mulva jelenik meg és gyorsan kiszabadul a sejtből /Isaacs és Lindenmann 1957/. A sejtek az indukciót követően 1-3 napig termelnek interferont /Isaacs és Lindenmann 1957, Burke és Buchan 1965, Wagner 1960/, majd napokig képtelenek lehetnek ujabb interferon produkcióra/Lockart 1963, Cantell és Paucker 1963/. A képződött interferon mennyisége virus - sejt rendszerenként igen változó. In vivo rendszerint magasabb titerü interferon indukálható, mint sejtkultúrákban.

A virussal történő fertőzés a legáltalánosabb mód a sejtek interferon termelésének kiváltására. Mind RNS, mind DNS virusok alkalmasak lehetnek erre. Gyakorlatilag minden viruscsoportban találhatók interferon-képződést stimuláló virusok. Legjobb inducereknek a myxovirus és arbovirus csoport tagjai bizonyultak. A legtöbb interferonra vonatkozó adat ezekkel a virusokkal kapcsolatos /Burke és Skehel 1967/. Enterovirusok közül főleg attenuált törzsekkel sikerült interferont indukálni /Ho és Enders 1959a,b/. A DNS-tartalmu vaccinia virussal, valamint herpes simplex virussal indukált interferonokkal kapcsolatban is jelentek meg közlemények /Glasgow és Habel 1962, Fruitstone és munkatársai 1964/. Tumor virusok a nem onkogénekhez hasonlóan szintén kiváltanak interferon-termelést /Allison 1961, Diderholm 1963/. Az adenovirusokról, amelyeket hosszu ideig interferon-indukcióra alkalmatlannak tartottak /Larke 1966/, szintén bebizonyosodott, hogy megfelelő körülmények között jó inducerek: human adenovirusok különböző typusai csirkeembryo fibroblast sejtekben és in vivo, csirkékben jelentős titerü interferont indukálnak /Béládi és Pusztai 1967, Pusztai és munkatársai 1969/. Nemcsak a fertőzőképes, hanem a különböző módon, hővel, vagy ultraibolya fénnyel inaktivált virusok is in-

dukálnak interferon-képződést /Isaacs 1963/.

A virusokon kivül más ágensek speciális feltételek mellett szintén kiválthatnak interferon termelést. A baktériumokkal történő fertőzés in vivo, vagy rickettsiás fertőzés szövetkulturában interferon indukciót eredményezhet /Youngner és Stinebring 1964, Michaels és munkatársai 1965, Hopps és munkatársai 1964/. Baktérium endotoxinnal oltott állatok vérében már az oltást követő 2. órában interferon jelenik meg /Stinebring és Youngner 1964/. A folyamat actinomycinnel nem gátolható, tehát nem igényel DNS-től függő RNS szintézist. Ez arra utal, hogy ebben az esetben az interferon nem szintetizálódik, hanem a sejtekben már meglévő "preformált" interferon szabadul ki az endotoxin hatására /Ho és Kono 1965/. Nemcsak mikroorganizmusok, hanem a gombák polysaccharida természetü fermentációs terméke, a statolon /Kleinschmidt és munkatársai 1964/, és a helenine /Rytel és munkatársai 1966/, továbbá a phytohemagglutinin /Wheelock 1965/ és a sejt számára fajidegen nukleinsavak szintén inducerként szerepelhetnek /Rotem és munkatársai 1963, Jensen és munkatársai 1963/. Polyriboinosyl- és polyribocytidylsav komplexével /Field és munkatársai 1968/, valamint pyran - copolymerekkel is indukálnak interferont

/Merigan és Regelson 1967/. Ujabban Lampson és munkatársai /1967/ megállapitották, hogy a helenine aktiv komponense kettős fonalu RNS molekulával azonos. A statolonról pedig elektronmikroszkopos vizsgálatokkal kimutatták, hogy az interferon indukcióért felelős frakciója 30 mμ átmérőjü, virusszerü hexagonalis partikulákat tartalmaz. Hasonló részecskéket a statolont fermentáló gomba mycéliumában is találtak /Ellis és Kleinschmidt 1967/. Ezek alapján feltételezik, hogy mindkét gombából származó anyag esetében a látensen hordozott gomba-virus felelős az interferont indukáló képességért.

Az interferon hatásmechanizmusának tanulmányozásában nagy jelentőségü volt annak felismerése, hogy az interferon antivirális hatásának létrejöttéhez a gazdasejt RNS és protein szintézise szükséges /Taylor 1964, Lockart 1964, Friedman és Sonnabend 1964, Levine 1964/. Feltételezik, hogy az interferon - sejt egymásrahatása egy uj antivirális fehérje képződését eredményezi, amelyre vonatkozó információ a sejt DNS-ében gátolt formában van jelen. Az interferon de-repressziót idéz elő és ezzel indul meg a m-RNS képződés, amely az uj antivirális fehérjének a szintézisét irányitja /Sonnabend és Friedman 1966/. Az inter-

feronnal kezelt sejtekben a virusszaporodás gátlásának pontos mechanizmusa nem ismert. Annyi bizonyos, hogy az interferon kezelés nem gátolja sem a virusadszorpciót, penetrációt és "uncoating"-ot /a virus-nukleinsav kiszabadulását/, sem pedig a partikulák nukleinsav és fehérje egységekből történő összeépülését. Mivel az interferon mind RNS-, mind DNS- virusok replikációját gátolja, ezért az interferon-hatásnak minden virus szaporodási folyamatában közös eseményen kell alapulnia. Marcus és Salb sejtmentes rendszerben vizsgálták az interferon hatásmechanizmusát. Kisérleteik alapján feltételezték, hogy az interferon hatására termelődött antivirális fehérje a ribosomákhoz kapcsolódva szelektive a virus m-RNS virus-fehérjévé történő átirását gátolja /Marcus és Salb 1966/.

Az interferon feltehetően fontos szerepet játszik a szervezet virusfertőzésekkel szembeni nem specifikus védekezési mechanizmusában. Kimutatták, hogy a különböző virusok i.v. oltását követően már egy óra mulva interferon jelenik meg az egerek vérében /Baron és Buckler 1963/. Később más állati speciesek savójában is találtak interferont i.v. fertőzés után kialakult viraemia folyamán /Baron és munkatársai 1966b/. Wheelocknak és Sibleynek /1964/ virus-etiológiáju léguti betegségben szenvedő

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

paciensek akut szakban vett savójából sikerült interferont kimutatnia. Petralli és munkatársai /1965/ élő kanyaróvirus vaccinával s.c. oltott gyermekek savójában az oltás után 7-11 nap mulva interferont találtak. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az állati szervezetek interferon-termelése általános jelenségnek tartható, amely a szervezet virusfertőzésre adott egyik válaszaként jön létre. Igen valószinü, hogy a keringésben lévő interferon a további virusszaporodásnak gátat vet és ezzel a specifikus ellenanyagok megjelenése előtt védelmet nyujt a szervezetnek.

Az interferon széles antivirális spectrumát és nem toxikus voltát tekintve ideális antivirális anyagnak látszik. Ennek ellenére széleskörü therápiás alkalmazása még nem valósult meg, mivel az ember-kisérletek nem jártak a várt eredménnyel. Ezideig főleg a virusfertőzés helyén történő alkalmazásával értek el sikert. Vaccinia virussal intradermálisan oltott önkéntesekben helyileg adott interferon prophylactikus hatását figyelték meg /Scientific Committee of Interferon 1962/. A vaccinia keratitis lefolyását szintén enyhitette néhány beteg esetében /Jones és munkatársai 1962/. Állatkisérletek tanulsága szerint nagy mennyiségü interferon többszöri adása szükséges megfelelő hatás

eléréséhez, mivel a kivülről bevitt interferon mennyisége rövid idő alatt kis hányadára csökken a szervezetben /Baron és munkatársai 1966a/. Amig megfelelően tisztitott és nagy mennyiségben elérhető human interferon nem áll rendelkezésre, addig alkalmasabbnak látszik az a megoldás, hogy a szervezetet nem virus természetü inducerek segitségével endogén interferon termelésére késztessék /Merigan 1967/.

A d e n o v i r u s o k

Az adenovirusok a legjobban tanulmányozott virusok közé tartoznak. Széleskörü elterjedtségük, különböző betegségekben betöltött etiológiai szerepük, valamint különleges morfológiai és antigénszerkezeti sajátságaik miatt számos kutató érdeklődésének középpontjában állnak. Jelentőségüket fokozta az a megfigyelés, hogy a human adenovirusok több typusa kisérleti állatban rosszindulatu daganat képződését idézi elő. Felfedezésük óta /Rowe és munkatársai 1953/ a human adenovirusok 31 typusát mutatták ki. Ezen kivül számos állatfajról is bebizonyosodott, hogy saját adenovirusai vannak. Igy ismerünk simian, bovin, canin, porcin, murin és avian adenovirusokat.

Az adenovirusok DNS tartalmu virusok. A nukleinsavat magábazáró fehérjeburok, a capsid az adenovirusok esetében 252 morfológiai egységből,

capsomerből áll, amelyek öt vagy hat szerkezeti egységből /fehérje molekula/ épülnek fel. A capsomerek icosaeder alaku testet alkotnak oly módon, hogy az icosaeder 12 csucsán található capsomereket öt capsomer veszi körül, s az összes többi, amely az éleken és a lapokon helyezkedik el, hat szomszéddal rendelkezik. Valentine és Pereira /1965/ vizsgálataiból ismert, hogy a csucsokon elhelyezkedő capsomerek /B antigének/ morfológiájuk és antigénszerkezetük tekintetében különböznek a többitől. Ugyanis három komponensből épülnek fel: egy kb. 80 Å átmérőjü feji részből /penton antigén/, amelyhez egy 200 Å hosszu, a végén 40 Å átmérőjü gömbben végződő farki rész /C, vagy fiber antigén/ kapcsolódik. A nem csucsokon elhelyezkedő többi capsomer az A antigénnek /hexon antigén/ felel meg, amelynek morfológiája és nagysága azonos a penton antigénnel. Az egész virion átmérője kb. 700 Å /Tousimis és Hilleman 1957/.

Az adenovirusok egyes typusai neutralizációs próbával különithetők el egymástól. Érdekes jellemzője az adenovirus csoportnak, hogy tagjai közös csoportspecifikus komplementkötő antigénnel rendelkeznek, amely alól csak az avian adenovirusok képeznek kivételt. Ugyszólván minden typus agglutinálja egy vagy több állatfaj vörösvértestjeit. A

hemagglutináció gátlás a legtöbb typus esetében a neutralizációs próbával egyenértékü szerológiai reakció.

Az adenovirusok jellegzetes cytopathias /CP/ hatást okoznak, amely az érintett sejtek lekerekedésében és összecsapódásában, végső stádiumban a sejteknek az üveg faláról való leválásában nyilvánul meg. Először az u.n. "korai" CP hatás jelentkezik, amelyért a toxikus tulajdonságu penton antigén felelős /Pereira 1958/. A "késői" CP hatás a virusszaporodás következménye.

Az adenovirusok a fogékony sejtek magjában szaporodnak, ahol jellegzetes zárványokat hoznak létre. Általánosságban az epithel sejtek sokkal érzékenyebbek irántuk, mint a fibroblastok /Rowe és Hartley 1962/. Szaporodási ciklusuk időtartama viszonylag hosszu, az 1-4 typus esetében 23-26 óra. A képződött virionok nehezen szabadulnak ki a sejtből, teljes CP hatás esetén is több virus található a sejteken belül, mint az extracelluláris folyadékban /Ginsberg 1958/.

Fizikai és kémiai behatásokkal szemben viszonylag ellenállóak. Évekig titercsökkenés nélkül eltarthatók -20 - -70°C-on és +4°C- valamint 37°C-on is aránylag stabilak, azonban 56°C-on percek alatt elveszitik fertőzőképességüket. Ultra-

ibolya sugárzás hatására infectivitásuk gyorsan csökken, toxikus hatásuk azonban változatlan marad. Az adenovirusok éterrel és chloroformmal szemben rezisztensek /Ginsberg 1962, Feldman és Wang 1961/ és 6-9 közötti pH tartományban stabilak /Ginsberg 1956/. Nem csökkenti infectivitásukat a trypsinnel történő kezelés sem /Pereira 1958/. Trypsin hatására a penton antigén tönkremegy, a hexon és fiber antigének nem károsodnak /Valentine és Pereira 1965/.

Az a v i a n a d e n o v i r u s o k két legismertebb képviselője a CELO /chicken embryo lethal orphan/ és a GAL /gallus adeno-like/ virus.

A CELO-virust Yates és Fry csirkeembryoból izolálta /Yates és Fry 1957/. Később csirke szövetekből és különböző csirke-virusok /laryngotracheitis, avian encephalomyelitis/ kontaminánsaként más laboratóriumokban is kimutatták /Chomiak és munkatársai 1961, Hwang és munkatársai 1960/. Nemrégen Angliában is látszólag egészséges tyukok tojásából izoláltak CELO-virus törzseket /Cook 1968/. Az USA-ban és Japánban végzett szerológiai vizsgálatok alapján ismert, hogy csirkék között igen gyakori a CELO-virus fertőzés /Yates és Fry 1957, Kawa-

mura és munkatársai 1963/.

A GAL-virus izolálása egy RPL_{12} jelü, csirkék lymphomatozisát okozó virustörzs anyagából történt /Burmester és munkatársai 1960/. A csirkékben látens módon jelenlévő GAL-virus valószinüleg a sorozatos csirke-passzázsok során jutott a lymphomatozis virusanyagba. A CELO-virushoz hasonlóan több országban kimutatták jelenlétét látszólag egészséges csirkékben. Nagy számban izoláltak adenovirust a csirkék béltraktusából, tracheájából és egyéb szerveiből /Sharpless 1962/. Az eddig izolált avian adenovirusok nemzetközileg elfogadott typizálása még nem történt meg, csak egyes laboratóriumok próbálkozásai ismertek, amelyek saját izolátumaik szerológiai csoportositására vonatkoznak. Igy Japánban Kawamura és munkatársai /1964/ csirkékből izolált több mint száz, tulajdonságai alapján adenovirusnak mutatkozó ágenst neutralizációs próba segitségével 8 csoportba osztottak. Ezek közül egyik csoport a GAL-, másik pedig a CELO-virussal volt azonos. Hazánkban is történt hasonló vizsgálat Khanna részéről /1965/, aki 6 serotypust különitett el. Az általa izolált avian adenovirusok fele CELO-virusnak bizonyult.

A CELO és GAL-virus közötti szerológiai rokonságot vizsgálva Kawamura és Tsubahara /1963/

azt találta, hogy a két virus komplementkötési és agar gél precipitációs próbában keresztreakciót ad egymással. Neutralizációs próbában azonban egyoldalu a kapcsolat, mivel csak a csirkében termelt CELO immunsavó neutralizálja -kis mértékben- a GAL-virust.

Az avian adenovirusok morfológiájukban és legtöbb tulajdonságukban megegyeznek a többi adenovirussal. IDU gátolja szaporodásukat, ami DNS tartalmukra utal. Virionjaik 252 capsomerből épülnek fel icosahedralis szimmetria szerint. Rezisztensek éterrel, trypsinnel szemben. Laboratóriumi állatokra nem patogének. A CELO-virusról kimutatták, hogy az onkogén human typusokhoz hasonlóan ujszülött hörcsögben tumor-képződést indukál /Sarma és munkatársai 1965/. Egyes CELO törzsek hemagglutinációs tulajdonsággal rendelkeznek.

Hővel szembeni ellenállásuk azonban nagyobb, mint a többi adenovirusé. Ezenkivül az adenovirus csoportra jellemző közös csoportspecifikus komplementkötő antigén hiánya jelent különbséget.

K I S É R L E T I R É S Z

A n y a g o k é s m ó d s z e r e k

Virusok A GAL-virust dr. Szent Iványi Tamás /Állatorvostudományi Egyetem Járványtani Tanszéke, Budapest/ bocsátotta rendelkezésünkre. Szaporitása csirkevese szövetkulturában történt. Amikor a cytopathias /CP/ elváltozás a kulturák minden sejtjét érintette, háromszori olvasztással, fagyasztással feltártuk a sejteket, majd percenként 2500 fordulattal 15 percig centrifugáltuk azokat. A felüluszót -20°C-on tároltuk.

Az interferon értékmérésére használt Sindbis virust dr. I. Gressertől /Boston/ kaptuk, a vesicular stomatitis virus /VSV/ a Csehszlovák Akadémia Viruskutató Intézetéből /Bratislava/, a vaccinia virust az Országos Közegészségügyi Intézetből /Budapest/ származik. Mindhárom virust csir-

keembryo fibroblast sejtekben szaporitottuk. A teljes CP hatás jelentkezésekor a tenyészetek tápfolyadékát összeöntöttük, majd centrifugáltuk és felhasználásig -20°C-on tartottuk.

A virusok infectiv titerének meghatározása

A GAl-virus titrálását csirkevese kémcsőtenyészetekben végeztük. A virus 10-es léptékü higitásainak 0,1 ml-ével 3-3 kulturát fertőztünk, s a 7-8. napon állapitottuk meg az infectiv titert, amelyet a Reed-Muench formula segitségével TCD_{50}-ben /50 %-os szövetkultura infectiv dózis/ fejeztük ki /Reed és Muench 1938/.

A Sindbis, VSV és vaccinia virus értékmérésére plaque módszert alkalmaztunk. A virusok 10-es léptékü higitásainak 0,1 ml-ével csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturákat fertőztünk, majd az adszorpció után agar-tartalmu tápfolyadékkal fedtük és 48 óra mulva plaque számlálás alapján PFE-ben /plaque formáló egység/ adtuk meg a virus titert.

Szövetkulturák és tápfolyadékok

Az emberi gégerákból származó H.Ep-2 sejtvonalat a Debreceni Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézetéből kaptuk 1962-ben. Te-

nyésztése 10 % inaktivált borjusavót tartalmazó Eagle-féle tápfolyadékban történt. A plaque módszerhez trypsines emésztéssel nyert 3 millió sejttel inditottuk a tenyészeteket 60 mm Ø Petri csészékben 5 % CO_2 tensioban. A kialakult egysejtrétegü kulturák fedéséhez a következő tápfolyadékot használtuk:

2x-es koncentrációju Hanks-féle oldat	41,5 ml
borjusavó	10,0 ml
5 %-os lactalbumin hydrolysatum	2,0 ml
25 %-os élesztőkivonat	0,5 ml
2,2 %-os vizes agar-agar	41,5 ml
5 %-os $NaHCO_3$	4,0 ml

A tápfolyadék 1:10 000 higitásban neutrálvöröst tartalmazott.

A csirkevese kulturákat 3-7 napos csirkék veséjéből készitettük Buthala és Mathews módszerének Khanna szerinti módositásával /Khanna 1965/. A veséket 2-3 mm-es darabkákra vágtuk, Hanks-féle oldattal mostuk, majd 0,2 %-os trypsin oldattal mágneses keverő segitségével 35°C-on 15 percig trypsineztük. Ekkor a szuszpenzióban lévő sejteket leöntöttük és a szövetdarabokat további 5 percig Hanks-féle oldatban forgattuk a fellazult sejtek leválasztása céljából. Az igy nyert sejteket az előbbi sejt-szuszpenzióval együtt jeges vizfür-

dőben tároltuk. A trypsinezést háromszor megismételtük friss trypsin alkalmazásával majd az összegyüjtött szuszpenziót 10 percig 1500 percenkénti fordulattal centrifugáltuk. Az üledéket Hanks-féle oldattal mostuk, majd tenyésztő tápfolyadékban szuszpendáltuk és 1 ml-enként kémcsövekbe osztottuk. Egy pár csirkevese sejtjeiből 30-35 tenyészetet készitettünk. Rendszerint már 72 óra mulva összefüggő sejtréteget nyertünk. Virusfertőzéskor fenntartó tápfolyadékot mértünk a tenyészetekre.

Csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturákat használtunk az interferon termeléséhez és értékeléséhez. A tenyészeteket 11 napos embryok trypsinezésével nyert sejtekből 60 mm Ø Petri csészékben Béládi /1962/ leirása alapján készitettük. Tenyészetenként 2,5 x 10^7 sejtet alkalmaztunk.

A hörcsög /sziriai aranyhörcsög/ és emberi embryo fibroblast kulturák készitése a csirkeveséhez hasonlóan történt, azzal a különbséggel, hogy Buerker kamrában meghatároztuk a sejtszámot és a kémcsőtenyészeteket 5 x 10^5 sejttel csirkeembryo sejtekhez használatos tápfolyadékban inditottuk.

A csirkevese sejtek tenyésztő tápfolyadéka 84,5 % Hanks-féle oldatból, 0,5 % lactalbumin hydrolysatumból és 15 % inaktivált borjusavóból

állt. A fenntartó tápfolyadék Gey-féle oldat volt amely csupán 0,25 % lactalbumin hydrolysatumot tartalmazott.

A csirke-, hörcsög- és emberi embryo fibroblast sejtekhez 0,25 % lactalbumin hydrolysatumot, 4 % pH 7,6-os trisz puffert és 5 % borjusavót tartalmazó Gey-féle oldatot használtunk.

A plaque módszer esetében a tápfolyadék kétszeres koncentrációju Gey-féle oldatból, 0,5 % lactalbumin hydrolysatumból, valamint 10-10 % pH 7,6-os trisz pufferből és borjusavóból állt, amelyet használat előtt egyenlő arányban kevertünk 2,7 %-os agarral. Az agar oldása 20 % pH 7,6-os trisszel pufferolt desztillált vizben történt. Az agar tápfolyadék 1:10000 higitásban neutrálvörőst tartalmazott. Amikor Sindbis virus értékelésére használtuk a plaque módszert, ml-enként 100 µg protaminszulfátot is adtunk a tápfolyadékhoz.

Minden tápfolyadék 100 E penicillint, 100 µg streptomycint, valamint 25 E mycostatint tartalmazott ml-enként.

Immunsavó készités Két nyulat oltottunk intravénásan csirkevese sejtekben termelt GAL-virussal. Az inoculum 10^7 TCD_{50} virust tartalmazott. Az oltást 5 naponként megismételtük. A hatodik

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14

oltást követően 3 hét mulva elvéreztettük az állatokat. A savókat 56°C-on 30 percig inaktiváltuk. Mindkét savó neutralizációs titere 100 TCD_{50} GAL-virussal szemben 1:256-nak bizonyult.

Interferon-termelés Két napos primer csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturákat fertőztünk 10^3-10^5 TCD_{50} GAL-virust tartalmazó 0,2 ml inoculummal. Három órán át 36°C-on tartottuk, majd a nem adszorbeálódott virionokat mosással eltávolitottuk, és 5 ml tápfolyadékot mértünk a tenyészetekre. Ezután 35°C-on inkubáltuk és különböző idő mulva összegyüjtöttük a tápfolyadékokat. Percenként 2500 fordulattal történő centrifugálás után a szupernatánsok kis mennyiségeit infectivitási vizsgálat céljára félretettük, a többit 2 órán át 56°C-os vizfürdőben tartottuk az infectiv virus inaktiválása céljából. Az igy nyert anyagokat értékelésig +4°C-on tároltuk.

Az interferonok aktivitásának vizsgálata Az interferon tartalmu anyagokból a csirke fibroblast sejtek tenyésztésére használt tápfolyadékban 1:2 léptékü higitási sorozatot készitettünk. A higitások 1,5-1,5 ml-ét 48 órás csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturákra mértük. Hi-

gitásonként két tenyészetet használtunk. A kontroll tenyészetekre tápfolyadékot adtunk. A sejteket 4 órán át 35°C-on inkubáltuk, majd a tápfolyadék leszivása után 100-150 PFE virussal /challenge virus/ fertőztük. Két óra adszorpció után a tenyészeteket agar tartalmu tápfolyadékkal fedtük és légmentesen záró dobozban megfelelő páratartalom biztositása mellett 35°C-os termosztátban tartottuk. A plaque-ok számlálása 48 óra mulva történt. Az interferon titereket a két parallel tenyészet plaque számának átlagából számitottuk. Interferon titernek az interferon azon higitását vettük, amely 50 %-os redukciót okozott a virus plaque számában a kontrollhoz viszonyitva.

Trypsin-kezelés A virus, vagy interferon trypsinkezelése 1-2 mg illetve 500 µg/ml kristályos trypsinnel történt. 37°C-os vizfürdőben 1 órán át tartó kezelés után trypsininhibitorral hatástalanitottuk az enzymet.

Ultraibolya besugárzás 60 mm átmérőjü Petri csészében 1 ml virusanyagot állandó mozgatás közben 17 erg/sec/mm^2 energiáju ultraibolya fénnyel különböző ideig kezeltünk.

Hőinaktiválás A higitatlan virust ml-enként 5

ml-es ampullákba mértük, majd a leforrasztott ampullákat vizszintes helyzetben perforált fémlapra rögzitve 56°C-os vizfürdőbe meritettük és az inaktiválási idő befejeztével azonnal jeges vizben hütöttük.

Ultracentrifugálás Az interferon centrifugálása PHYWE 131 typusu ultracentrifugában 2 órán át 105 000 g-vel történt.

E r e d m é n y e k

Miután laboratóriumunkban végzett vizsgálatok során ismertté vált, hogy a human adenovirusok csirkeembryo fibroblast sejtekben interferont indukálnak /Béládi és Pusztai 1967/, felvetődött a kérdés, hogy az avian adenovirusok képesek-e emberi eredetü sejtekben interferon-termelés kiváltására. A kérdés eldöntése céljából H.Ep-2 egysejtrétegü tenyészeteket fertőztünk GAL-virussal, majd megfelelő inkubáció után a tenyészetek tápfolyadékát összegyüjtöttük, és esetleges interferon aktivitásukat H.Ep-2 sejteken plaque módszerrel challenge virusként VSV-t alkalmazva értékeltük. Az előbbi kisérlettel párhuzamosan csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturákat is oltottunk GAL-virussal, és a tápfolyadékok antivirális aktivitását szintén plaque módszerrel, azonban csirke fibroblast sejteken Sindbis virussal szemben

határoztuk meg. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja. Látható, hogy a H.Ep-2 sejtek tápfolyadéka egyik vizsgált időpontban sem mutatott antivirális aktivitást, ugyanakkor a csirkesejtek már 24 óra mulva jelentős mennyiségü antivirális anyagot termeltek. Ezután nem rákos eredetü emberi sejtekben, primer human embryo fibroblast tenyészetben vizsgáltuk, hogy indukál-e a GAL-virus interferont. Azonban ez a kisérlet is negativ eredménnyel zárult.

A továbbiakban vizsgáltuk a csirkesejtekben termelt antiviralis anyag egyes biológiai és fiziko-kémiai tulajdonságait.

Egy ml higitatlan anyagot 500 µg kristályos trypsinnel 1 órán át 37°C-os vizfürdőben inkubáltunk, majd 500 µg trypsininhibitort adtunk hozzá. A 2. táblázat mutatja, hogy a trypsinezés kb. 98,5 %-os redukciót okozott az antivirális anyag aktivitásában.

Vizsgáltuk 105 000 g-vel 2 órán át történő centrifugálás hatását készitményünkre. Az ülepités PHYWE 131 typusu ultracentrifugában történt. A szupernatáns antivirális titere közel azonos volt a nem centrifugált anyagéval, ami az aktiv komponens alacsony molekulasulyára utal.

Fontos jellemzője az interferonnak az

1. táblázat.

GAL-vírussal fertőzött csirke és H.Ep-2 sejtek interferon termelése.

Sejt	A vizsgálat időpontja a fertőzés után (óra)	Interferontiter
Csirkeembryo fibroblast	24	128
	48	256
	72	256
H. Ep-2	24	<2
	48	<2
	72	<2

2. táblázat.

A GAL-vírussal indukált interferon trypsin érzékenysége.

kezelés módja	interferon-titer
500 µg/ml trypsin 1h 37 °C	4
1h 37 °C	256

alacsony pH-val és hővel szembeni ellenállása. Ez a GAL-virussal indukált antivirális anyagunk esetében a következőképpen alakult /3. táblázat/. Amint a táblázatból kitünik, a 80°C-on történő 5 perces hőkezelés részben hatástalanitotta az anyagot, 60°C-on, valamint 2-es pH-nál stabilnak mutatkozott. Ezek a vizsgálatok igazolták, hogy a GAL-virussal fertőzött csirkesejtekben általunk kimutatott antivirális anyag azonos az interferonnal.

A továbbiakban részletesen tanulmányoztuk a GAL-virussal fertőzött csirke fibroblast sejtek interferon termelését. Először azt vizsgáltuk, hogy a csirke fibroblast sejtek interferon termelését befolyásolja-e az inoculum eltávolitása az adszorpciós idő után. $10^{3,5}$ TCD_{50} GAL-virussal fertőzött egysejtrétegü kulturákat 3 órán át 35°C-on tartottunk, majd egy részükre tápfolyadékot mértünk, a többi lemezről a tápfolyadék adása előtt leszivtuk az inoculumot és a sejteket Hanks-féle oldattal kétszer mostuk. A tápfolyadékok interferon aktivitását 48 óra mulva vizsgáltuk. Két különböző alkalommal végzett kisérlet eredményét a 4. táblázatban összegeztük.

Látható, hogy az inoculum eltávolitása nem csökkentette az interferon hozamot. Az ezt követően végzett kisérletekben mindig az utóbbi

SZTE Bibliotheca Könyvtár SZEGED

3. táblázat.

pH és hő hatása a GAL-vírussal indukált csirke interferonra.

kezelés módja	interferon-titer
—	256
60 °C 1^h	>128<256
80 °C 5'	64
pH 2 24^h 4 °C-on	256

4. táblázat.

A fertőzés után különböző módon kezelt csirkesejtek interferon termelése.

A kisérlet száma	Interferontiter	
	mosott sejtekben	nem mosott sejtekben
1.	512	512
2.	256	256

eljárást alkalmaztuk az interferon indukciónál.

Meghatároztuk, hogy milyen multiplicitásu fertőzés szükséges mérhető mennyiségü interferon indukciójához. A GAL-virus különböző TCD_{50}-évei oltottunk csirkesejteket, majd a 48 óra mulva összegyüjtött tápfolyadékok interferon aktivitását vizsgáltuk. Az eredményt az 5. táblázat mutatja.

Látható, hogy 3 x 10^3 TCD_{50} virussal történő fertőzés -amely 0,0002-s multiplicitásnak felel meg- csak igen kis mennyiségü interferont eredményez. A képződő interferon-mennyiség a multiplicitástól függ, nagyobb multiplicitásu fertőzés több interferon termeléséhez vezet.

Annak igazolására, hogy az interferon indukcióért valóban a GAL-virus felelős, a következő kisérletet végeztük. A GAL-virus $10^{4,5}$ TCD_{50}-ét homológ immunsavóval kezeltük /2 óra 35°C/, majd a virus-savó keverékkel csirkefibroblast tenyészeteket oltottunk. Kontrollként nyulsavóval hasonló módon kezelt virust alkalmaztunk. Egyidejüleg csirkevese kulturákban megállapitottuk a virus-savó keverékek infectivitását. Az eredményeket a 6. táblázatban tüntettük fel. Látható, hogy a homológ immunsavóval neutralizált virus nem képes arra, hogy interferont indukáljon.

5. táblázat.

Csirke fibroblast sejtek interferon termelése különböző multiplicitású fertőzés hatására.

Vírusmennyiség (TCD_{50})	a fertőzés multiplicitása x	interferon-titer
$3 \cdot 10^5$	0,02	256
$3 \cdot 10^4$	0,002	64
$3 \cdot 10^3$	0,0002	4
$3 \cdot 10^2$	0,00002	<4

x fertőzéskor a tenyészetek kb. $1,5 \cdot 10^7$ sejtet tartalmaztak.

6. táblázat.

Interferon indukció homolog immunsavóval kezelt GAL-vírussal.

inoculum	interferon-titer	az inoculum infectiv titere (TCD_{50})
GAL-vírus + homolog immunsavó	< 4	10^{0}
GAL-vírus + kontroll savó	128	$10^{4,5}$

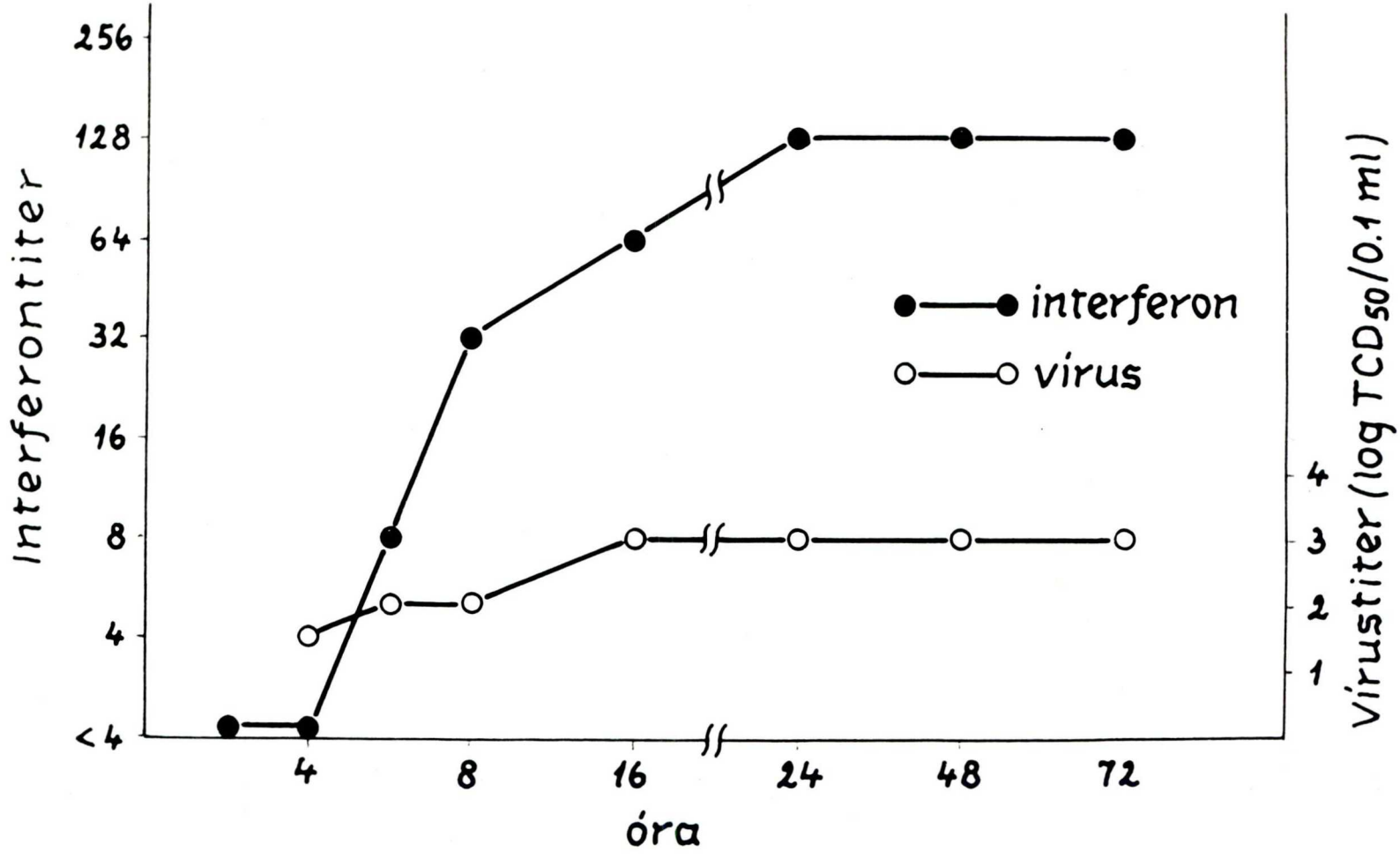
A továbbiakban vizsgáltuk az interferon termelődésének kinetikáját. A csirke fibroblast sejteket 2 x $10^{5,5}$ TCD_{50} GAL-virussal fertőztük, majd különböző időpontokban 2-2 lemezről összegyűjtöttük a tápfolyadékot és meghatároztuk interferon-aktivitását, valamint infectivitását. Ugyanakkor mikroszkoposan vizsgáltuk a tenyészetek sejtjeit. A vizsgálat 90-szeres nagyitással, nativ állapotban történt. A virussal oltott tenyészetekben cytopathiás elváltozás egyik vizsgált időpontban sem volt látható, a sejtek a kontroll sejtekével azonos morfológiát mutattak. Ennek ellenére, amint az 1. ábrából kitünik, kis mértékü virusszaporodás is bekövetkezett az interferon képződése mellett. Az interferon a fertőzés utáni 6. órában jelenik meg, mennyisége fokozatosan növekszik, és 24 óra mulva éri el a maximumát.

Ismert, hogy a jód-desoxyuridin /IDU/ gátolja a DNS virusok szaporodását /Herrmann 1961/. Vizsgáltuk, hogy a GAL-virus - csirke fibroblast rendszerben hogyan alakul az interferon termelés, ha IDU-t tartalmazó tápfolyadékot alkalmazunk az indukciónál. A virusadszorpciót követően a sejteket Hanks-féle oldattal mostuk, majd ml-enként 1000, 100,,illetve 10 µg IDU-t tartalmazó tápfolyadékot adtunk azokhoz. Kontroll tenyészetekre

SZTE Bölcsészkari Könyvtár SZEGED

1. ábra.

GAL-vírussal oltott csirke fibroblast sejtek interferon- és vírushozama a fertőzés után különböző időpontokban.



IDU-mentes tápfolyadékot mértünk. A tápfolyadékok interferon-tartalmát, valamint infectivitását 48 óra inkubáció után vizsgáltuk. A 7. táblázat mutatja az eredményeket.

Látható, hogy 1000 µg/ml IDU alkalmazása esetén infectiv virust nem sikerült kimutatnunk, ugyanakkor a tápfolyadék interferon-titere érdekes módon a kontrollénál magasabb volt. Hasonló eredményhez jutottunk két más alkalommal végzett kisérletben is. Ez a jelenség nem magyarázható az IDU-nak a challengeként használt Sindbis virusra gyakorolt hatásával, mivel a virussal nem fertőzött, 1000 µg/ml IDU jelenlétében tenyésztett csirkesejtek tápfolyadéka még 1:4 higitásban sem mutatott antivirális aktivitást.

Ezután GAL immunsavó hatását vizsgáltuk az interferonra. Az interferon 1 ml-ét egyenlő arányban kevertük 1 ml 1:2 higitásu GAL immunsavóval, illetve normál nyulsavóval és 1 órán át 35°C-on tartottuk, majd meghatároztuk a keverékek interferon aktivitását. A 8. táblázatban látható, hogy az immunsavóval történő kezelés nem csökkentette az interferon antivirális hatását.

Ismert, hogy az interferon közvetlenül nem inaktiválja a virusokat /Ho és Enders 1959a, Wagner 1961/. Saját interferon készitményünknek

7. táblázat.

Csirke fibroblast sejtek interferon- és vírushozama IDU jelenlétében.

IDU koncentráció µg/ml	interferon-titer	vírustiter (TCD_{50}/0.1 ml)
0	256	$10^{2.5}$
10	128	$10^{1.5}$
100	128	$10^{0.5}$
1000	512	0

8. táblázat.

GAL immunsavó hatása az interferon aktivitására.

kezelés módja	interferon-titer
interferon + 1:2 higitású GAL immunsavó	128
interferon + 1:2 higitású kontroll savó	128

a Sindbis virusra gyakorolt direkt hatását az alábbi módon vizsgáltuk. A virus 10^{-2} higitásának 0,5 ml-ét egyenlő arányban kevertük 1:64 titerü interferonnal. A kontroll interferon helyett tápfolyadékot tartalmazott. Egy órán át 35°C-os termosztátban történő inkubálás után a keverékek 1:10 léptékü higitásainak 0,1 ml-évei 2-2 csirke fibroblast kulturát oltottunk és virustartalmukat plaque módszerrel meghatároztuk. Az eredményt a 9. táblázat tünteti fel. Látható, hogy az interferon a legkisebb mértékben sem inaktiválta a virust.

Az interferon egyik jellemző tulajdonsága, hogy aktivitása eltávolitását követően is megnyilvánul a már előzetesen kezelt sejtekben. Ebből a szempontból a következőképpen vizsgáltuk a GAL-virussal indukált antivirális anyagunkat. Az interferonnal történő inkubálás után a sejteket kétszer mostuk Hanks-féle oldattal, s csak ezután történt a challenge virus hozzáadása. Kontrollként olyan tenyészeteket használtunk, amelyeket az interferon eltávolitása után mosás nélkül fertőztünk. A vizsgálat azt mutatta, hogy a kétféle módon kezelt sejtekben azonos mértékü volt a gátlás, tehát az interferonnal kezelt sejtek virussal szembeni rezisztenciája mosás hatására sem csökkent.

9. táblázat.

GAL-vírussal indukált csirke interferon közvetlen hatása Sindbis vírusra.

kezelés módja	Vírustiter PFE/ml
Sindbis vírus + interferon 1h 35 °C	$5 \cdot 10^6$
Sindbis vírus + tápfolyadék 1h 35 °C	$4 \cdot 10^6$

Ismert, hogy az actinomycin D, amely gátolja a sejtek DNS-től függő RNS-szintézisét, felfüggeszti az interferon antivirális hatását is /Taylor 1964/. Vizsgáltuk, hogy a GAL-virussal indukált interferon hatása hogyan érvényesül actinomycin D-vel kezelt sejtekben. Csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturák egyik csoportjához 1-1 ml 1 µg actinomycin D-t tartalmazó, egy másik csoporthoz actinomycin mentes tápfolyadékot adtunk. A lemezeket 1 órán át 35°C-on tartottuk, majd Hanks-féle oldattal kétszer mostuk. Ekkor mind a kontroll, mind a kezelt tenyészeteket 2 csoportra osztva, 1,5 ml interferont /1:256 titerü interferon 1:4 higitásából/, illetve tápfolyadékot mértünk azokra és 35°C-on tovább inkubáltuk. Négy óra mulva ismét mostuk a tenyészeteket, majd Sindbis virus $2x10^6$ PFE-nyi mennyiségével fertőztük. Egy óra adszorpció után a nem adszorbeálódott virionokat kétszeri mosással eltávolitottuk, és 5 ml tápfolyadékot adtunk a sejtekhez. Ezután 16 órán át 35°C-os termosztátban tartottuk, majd -20°C-on fagyasztottuk a tenyészeteket. Felolvasztás után 2-2 azonosan kezelt tenyészet tápfolyadékát összeöntöttük és 15 percig 2500 fordulattal centrifugáltuk. A szupernatánsok infectiv titerét 48 órás csirke fibroblast tenyészetekben plaque

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

módszerrel határoztuk meg. A különbözőképpen kezelt tenyészetek virushozamát a plaque számok átlagértékeiből állapitottuk meg. Az eredményeket a 10. táblázat tünteti fel. Megfigyelhető, hogy az interferonnal kezelt tenyészetek virushozama 3 exponenssel alacsonyabb, mint a nem kezelteké. Az actinomycin nem befolyásolja a virusszaporodást, azonban az interferon hatását teljesen felfüggeszti.

A GAL-virussal indukált interferon hatását különböző csoportba tartozó virusokkal szemben is tanulmányoztuk. Az eredményeket a 11. táblázat mutatja. Látható, hogy az interferon mind a poxvirus csoportba sorolt vaccinia, mind az arbovirus csoportba tartozó Sindbis, valamint vesicular stomatitis virus szaporodását gátolja. Kisérleteink szerint ez utóbbi virus mutatkozott legérzékenyebbnek hatásával szemben.

A csirkesejteken kivül más species sejtjeiben is vizsgáltuk interferonunk aktivitását. E célra hörcsög embryo fibroblast csőkulturákat alkalmaztunk. Csirkesejtekben 1:256 titert adó interferon 1:4 higitásának 1-1 ml-ében 24 órán át inkubáltunk hörcsög embryo fibroblast sejteket, majd friss tápfolyadékot adtunk a kulturákhoz, és

10. táblázat.

Actinomycin D hatása a GAL-vírussal indukált interferon antiviralis aktivitására csirkesejtekben.

a tenyészetek kezelése	Sindbis vírushozam (PFE/ml)
—	$9 \cdot 10^7$
Actinomycin D 1^h	$7 \cdot 10^7$
Interferon 4^h	$5 \cdot 10^4$
Actinomycin D 1^h Interferon 4^h	$6.9 \cdot 10^7$

11. táblázat.

Különböző vírusok érzékenysége a GAL-vírussal indukált interferonnal szemben.

Vírus	Interferontiter
Sindbis	64
Vesicular stomatitis	128
Vaccinia	64

Sindbis virus különböző higitásainak 0,1 ml-ével fertőztük. Kontrollként interferonnal nem kezelt tenyészetek szolgáltak. Ujabb 24 óra mulva az azonos virushigitással oltott tenyészetek tápfolyadékát összegyüjtöttük és 24 órás csirkeembryo fibroblast egysejtrétegü kulturákon plaque módszerrel meghatároztuk a kontroll és kezelt sejtek virushozamát. Az eredményt a 12. táblázatban összegeztük. Látható, hogy az interferonnal történő kezelés nem csökkentette a hörcsögsejtek Sindbis virussal szembeni fogékonyságát, mivel a virushozam a kontroll és kezelt sejtekben közel azonos volt. Ez az adat a GAL-virussal indukált interferon species specificitására utal.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a GAL-virus interferont indukáló képességét mennyiben befolyásolja hővel, ultraibolya fénnyel, illetve trypsinnel történő kezelése.

A hőkezelt GAL-virussal kapott eredményeket mutatja a 2. ábra. A virus inaktiválása 56°C-os vizfürdőben történt. A virus infectiv titere és interferont indukáló képessége párhuzamosan csökkent a hőkezelés időtartamának növelésével. A 10 perces hőkezelés megfosztotta a virust infectivitásától és ekkor már nem volt képes interferon termelés kiváltására sem.

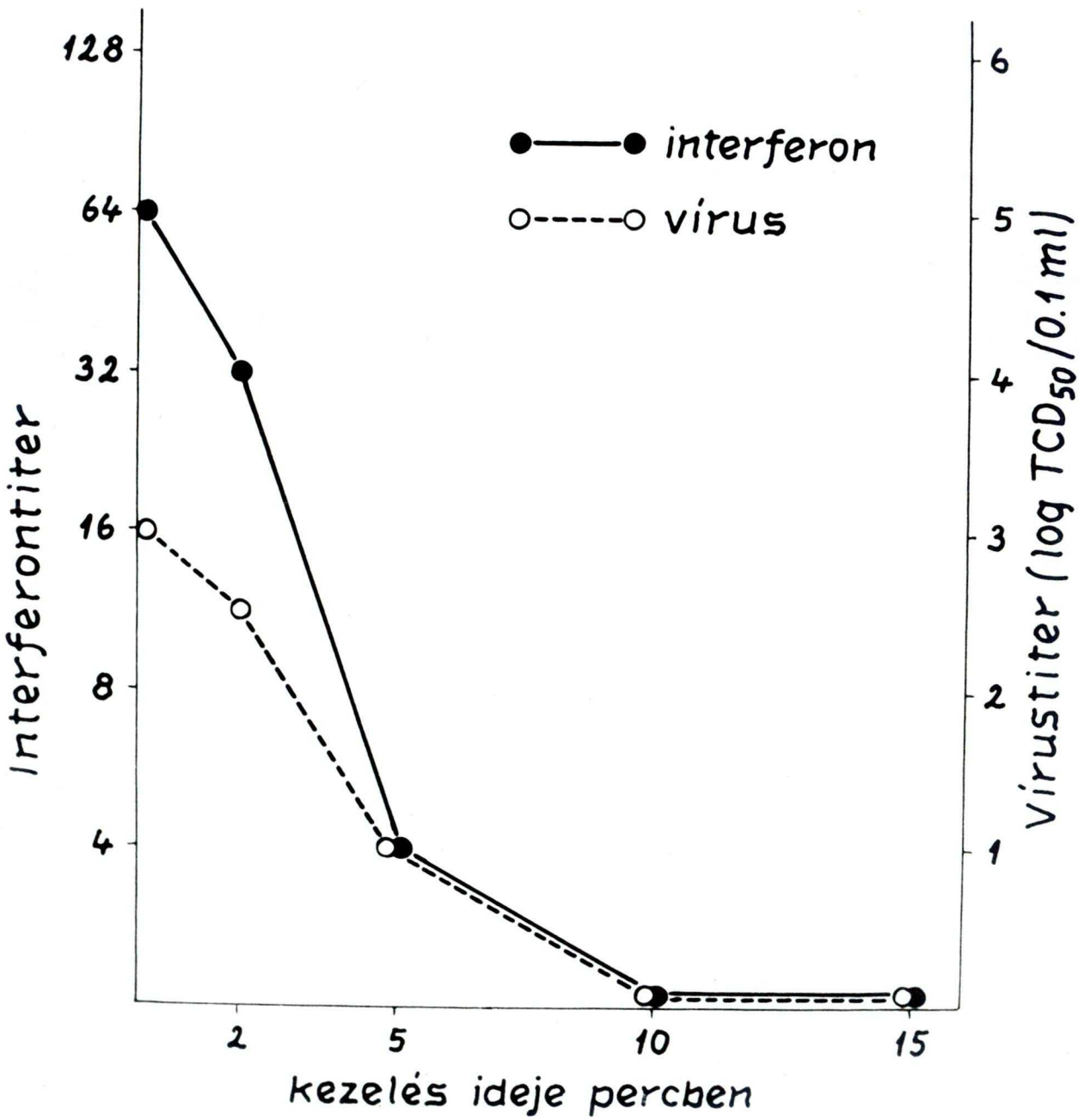
12. táblázat.

GAL-vírussal indukált csirke interferon aktivitása hörcsög-embryo sejtekben.

Vírus-hígítás	Vírushozam (PFE/ml) interferonnal hörcsögsejtekben	
	kezelt	nem kezelt
10^{-3}	$1 \cdot 10^{8}$	$9 \cdot 10^{7}$
10^{-4}	$6 \cdot 10^{7}$	$5 \cdot 10^{7}$
10^{-5}	$7 \cdot 10^{6}$	$7 \cdot 10^{6}$

2. ábra.

Hőkezelt GAL-vírussal oltott csirkesejtek interferon termelése.

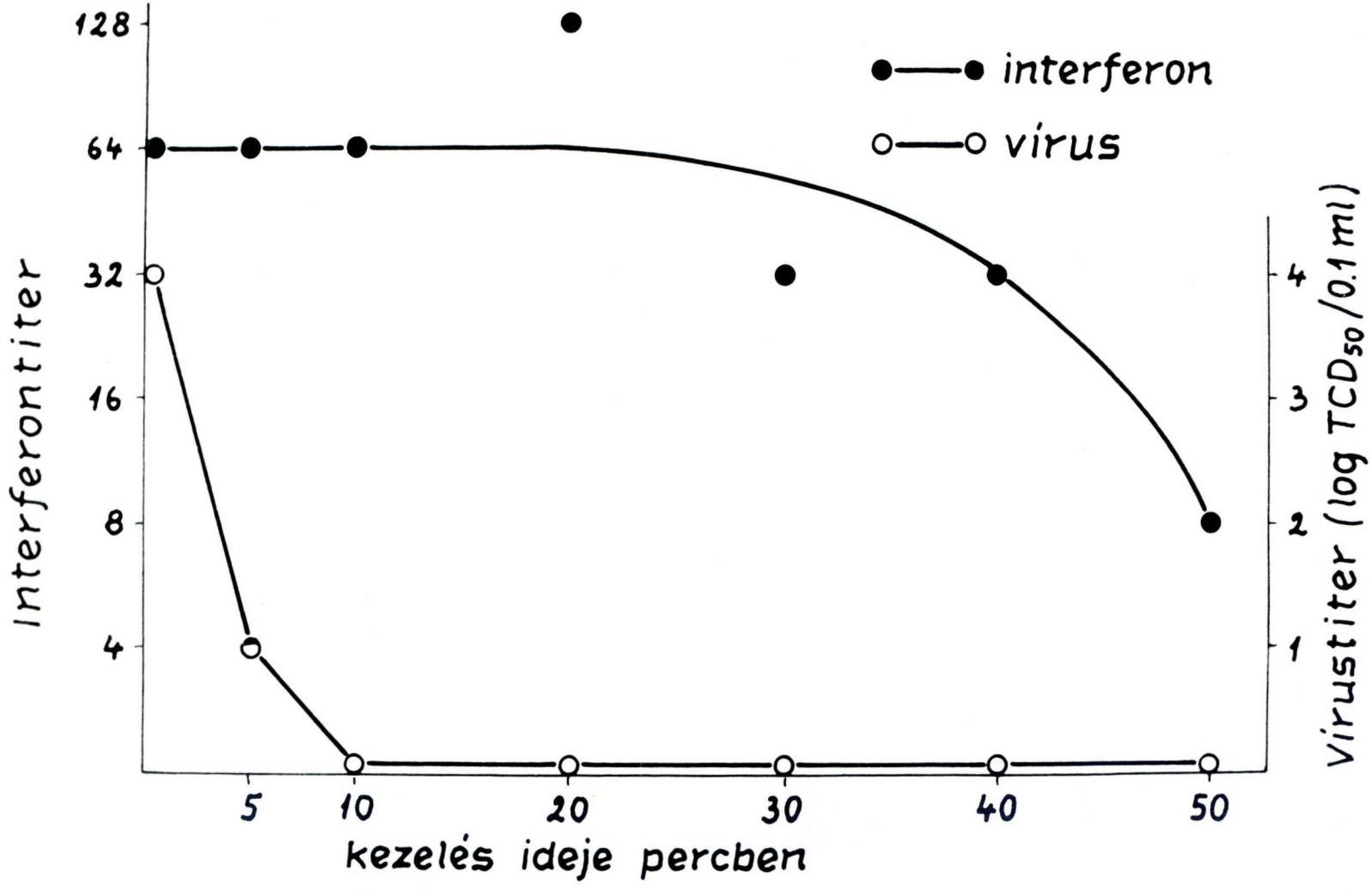


Más módon alakult az interferon indukció a virus ultraibolya fénnyel történő besugárzása esetén. A 3. ábrából kitünik, hogy a virus már 10 perces besugárzás hatására elveszíti infectivitását, de még az 50 percig kezelt virus is mérhető mennyiségü interferont indukál.

Ismert, hogy az adenovirusok nem trypsin-érzékeny virusok, infectivitásuk trypsin-kezelés hatására változatlan marad. A human adenovirusok interferon - indukciójával kapcsolatosan igen érdekes volt Béládi és Pusztai /1967/ azon megfigyelése, hogy a trypsin-kezelt virus -bár infectiv titere nem csökken- elveszíti interferont indukáló képességét csirkesejtekben. Vizsgáltuk, hogy az avian adenovirusok esetében hasonló módon érvényesül-e a trypsin-kezelés hatása. Több, egymástól független kisérlet eredményét mutatja a 13. táblázat. Látható, hogy a trypsin-kezelt virus a nem kezelttel azonos, egy esetben pedig magasabb titerü interferont indukál. Még a 2 mg/ml koncentrációban alkalmazott trypsin sem befolyásolta a virus interferont indukáló képességét.

3. ábra.

Csirkesejtek interferon termelése ultraibolya fénnyel besugárzott GAL-vírus hatására.



13. táblázat.

Trypsinezett GAL-vírussal oltott csirkesejtek interferon termelése.

Kisérlet száma	az inoculum kezelési módja	interferontiter
1.	1 mg/ml trypsin 1h 37 °C	256
	1h 37 °C	256
2.	1 mg/ml trypsin 1h 37 °C	128
	1h 37 °C	64
3.	2 mg/ml trypsin 1h 37 °C	256
	1h 37 °C	256

M e g b e s z é l é s

Ismert, hogy a virusok interferont indukáló képességük tekintetében nagymértékben különböznek egymástól. Az interferon képződés sikere azonban nemcsak a virustól, hanem az alkalmazott sejtféleségtől is függ. Kimutatták ugyanis, hogy a Newcastle-betegség virusa csirkeembryo sejtekben nem vált ki interferon képződést /Ruiz Gomez és Isaacs 1963/, ugyanakkor human thyroid sejtekben /Baron és Isaacs 1962/, egér embryo fibroblastban /Henle és munkatársai 1959/ és L sejtben /Cantell és Paucker 1963/ jó interferon - inducernek mutatkozik. Hasonlóan a 12. typusu human adenovirus csirkeembryo sejtekben magas titerü interferont indukál, mig egyéb sejtféleségekben, igy hörcsög, egér fibroblastban és BHK_{21} sejtekben hatástalan /Béládi és munkatársai 1968/. Jelen kisérleteinkben a GAL-virussal kapcsolatosan

is hasonló megfigyelést tettünk. A human tumorból eredő H.Ep-2 sejtvonal sejtjeiben a GAL-virus nem képes interferon-termelés kiváltására. Ismert, hogy tumorból származó folyamatosan fenntartott sejtvonalak kevésbé alkalmasak interferon-termelésre, mint a nem tumoros eredetü sejtek /Henle és munkatársai 1959, Isaacs és munkatársai 1961/. Ezért tartottuk fontosnak annak a vizsgálatát, hogy a GAL-virussal fertőzött primer emberi embryo fibroblast sejtekben képződik-e interferon. A kapott negativ eredmény arra utal, hogy a GAL-virus a human adenovirusokhoz hasonlóan human eredetü sejtekben nem indukál interferont.

Infectiv virus hatására az interferon képződése mellett a sejtekben rendszerint virusszaporodás is bekövetkezik, amely gyakran csak alacsony szintet ér el. Vizsgálataink szerint a GAL-virussal oltott csirkeembryo sejtek is termelnek infectiv virust az interferon produkcióval párhuzamosan, ennek ellenére a vizsgált időpontokban /1-3 nap/ a sejteken CP hatást nem észleltünk. A főleg fibroblast typusu sejtekből álló csirkeembryo kulturákból származó virus titere egyetlen egy esetben sem haladta meg a 10^3 TCD_{50}-t, ugyanakkor a csirkevese sejtekben szaporitott virus titerét $10^{4,5}$ - $10^{5,5}$ TCD_{50}-nek találtuk. Más

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

szerzők adataiból is ismert, hogy a GAL-virus infectiv titere 2-3 log-gal alacsonyabb csirkeembryo fibroblast sejtekben, mint a májparenchyma sejtekből álló kulturákban /Sharpless és munkatársai 1961/. Egy másik adenovirus, a CELO-virus esetében szintén hasonló jelenséget figyeltek meg. A 0,01-s multiplicitásu fertőzéskor az inkubáció 4. napján csirke fibroblast sejtekben $10^{4,5}$, csirkevese sejtekben pedig $10^{7,5}$ TCD_{50} virust mutattak ki. Ekkor a fibroblast sejtekben semmiféle virushatást nem észleltek, a csirkevese sejtek pedig maximális CP hatást mutattak. Később a fibroblast sejtekben is jelentkezett a CP hatás, azonban a fibroblast és epithelialis sejtekben nyert virushozamok között még a 10. napon is 2 log különbség mutatkozott /Oxford és Potter 1969/. Az influenza virus cytotropizmusát tanulmányozva Stewart és Frickey /1966/ azt találta, hogy csirkeembryo tüdőből származó fibroblast sejtek kevésbé alkalmasak a virus szaporitására, mint az ugyanolyan eredetü epithelialis jellegüek. Ujabb vizsgálataik szerint a fibroblast sejtek kis multiplicitásu influenza virussal történő fertőzéskor több interferont termelnek és érzékenyebbek is az interferon hatásával szemben, mint az epithelialis typusuak /Gandhi és Stewart 1969/. Takahashi

és munkatársai /1966/ az 5. typusu human adenovirussal fertőzött hörcsögvese és hörcsög embryo sejtekben autoradiografiás módszerrel vizsgálták a H^3 thymidin incorporációt. A hörcsögvese sejtek 90 %-ában jellemző magzárványokat találtak, és ezeken a helyeken észlelték a H^3 thymidin incorporációját is. A hörcsög embryoból származó sejtek, amelyek tulnyomórészt fibroblast typusuak, csak 7,7 %-ban mutattak hasonló elváltozást, jelezvén a fibroblast sejtek virussal szembeni kisebbfoku érzékenységét. Saját megfigyelésünk további adatot jelent az adenovirusok epitheliotropizmusára vonatkozóan. Eredményeink alapján összefüggést tételezünk fel a GAL-virus csirke fibroblast sejtekben megfigyelt csökkent virulenciája és az általunk észlelt interferon termelődés között. Ugy gondoljuk, hogy az interferon felelős azért, hogy a fibroblast sejtekben az epithelialis sejtekhez képest kevesebb virus képződik. Véleményünk szerint a GAL-virussal fertőzött csirke fibroblast sejtekben a CP hatás elmaradása szintén az interferon-hatás következménye /Bakay 1969/.

Az interferon termelődésének kinetikáját vizsgálva azt találtuk, hogy az interferon a GAL-virussal fertőzött csirke fibroblast sejtekben a fertőzés utáni 6. órában jelenik meg, mennyi-

sége fokozatosan növekszik, és 24 óra mulva éri el maximumát, majd a vizsgált periódusban ezen a szinten marad. Tehát a GAL-virus-csirkesejt rendszerben, hasonlóan az eddig vizsgált szisztémákhoz /Isaacs és Lindenmann 1957, Burke és Buchan 1965, Cantell és Paucker 1963/, az interferon három szakaszos: a 6 órás lag periódust a produkciós szakasz követi, majd a stacioner fázisban leáll az interferon termelődése. Ezideig más DNS virussal indukált interferon termelődésének kinetikájáról nem ismeretesek adatok. Eredményeink arra utalnak, hogy DNS virus esetében az interferon-termelés időbeni lefolyása az RNS-virusokéhoz hasonló.

A GAL-virussal csirkesejtekben indukált antivirális anyagról megállapitottuk, hogy alacsony molekulasulyu fehérje, és antigenitás szempontjából a virustól merőben különbözik. Hatását intracellulárisan fejti ki RNS szintézist igénylő folyamat révén. Kifejezett species specificitással rendelkezik, különböző virusokkal szemben aktiv, és 2-es pH-nál stabil. Igy minden vizsgált tulajdonságában megfelel az interferonnal szemben felállitott követelményeknek /Burke és Skehel 1967/. Hőrezisztenciája alapján a csirke interferonnal mutat azonosságot /Lampson és munka-

társai 1965/.

Valentine és Pereira /1965/ elektronmikroszkopos vizsgálataiból ismert, hogy trypsin kezelés hatására az adenovirionnak csak a 12 vertex capsomerje /amely a penton antigénnek felel meg/ károsodik, s az 56°C-os hőkezelés is ezeket a capsomereket teszi tönkre /Russel, Valentine és Pereira 1967/. Az ultraibolya besugárzásra elsődlegesen a virus DNS-e károsodik, a penton antigén ugyanakkor ellenállónak mutatkozik /Rowe és munkatársai 1958/.

A human adenovirusok interferon-indukciójának tanulmányozása során Béládi és Pusztai /1967/ azt találták, hogy a trypsin-kezelt adenovirus infectivitásának megtartása mellett elveszíti interferont indukáló képességét. A hőkezelt adenovirus interferont indukáló képessége infectivitásával párhuzamosan szünik meg, az ultraibolya besugárzás hatására pedig a virus hamarabb veszíti el infectivitását mint interferont indukáló képességét /Pusztai és munkatársai 1969/. Ezek alapján tételezték fel, hogy a human adenovirus - csirkesejt rendszerben a virus penton antigénje váltja ki az interferon-indukciót.

Az ultraibolya fénnyel besugárzott, továbbá a hőkezelt GAL-virus a human typusokhoz

hasonlóan viselkedik. A 10 percig uv.-kezelt virus infectiv partikulák képződését már nem tudja elinditani, azonban még az 50 percig besugárzott virus is elegendő információt tartalmaz az interferon indukcióhoz. A hőkezeléssel inaktivált GAL virus nem indukál interferont. A trypsin-kezelés a human typusokkal ellentétben nem befolyásolja a GAL-virus interferon indukcióját. Ez az adat azonban csak látszólagos ellentmondást jelent a human adenovirusok esetében megfigyeltekhez képest. A GAL-virus ugyanis, ellentétben a human adenovirusokkal, szaporodik a csirke fibroblast sejtekben, ezért valószinünek tartjuk, hogy trypsinezett GAL-virus alkalmazásakor a replikáció folyamán ujonnan szintetizált penton antigének szerepelnek inducerként. A következő táblázat szemlélteti a human és az avian adenovirusok interferont indukáló képességének és infectivitásának alakulását különböző kezelések hatására:

virus	trypsin-kezelt		hőkezelt		uv.-kezelt	
	infectivitás	indukció	infectivitás	indukció	infectivitás	indukció
human	+	-	-	-	+/-	+
avian	+	+	-	-	+/-	+

Specifikusan csak DNS szintézist gátló inhibitorok alkalmazásával kimutatták, hogy az interferon-képződés nem igényel uj DNS szintézist /Burke és Morrison 1966/. A GAL-virussal végzett kisérleteinkben azt találtuk, hogy IDU jelenlétében a virusszaporodás 99 %-os gátlása mellett az interferon titere a kontrolléval közel azonos, teljes gátlás esetében pedig meghaladja azt. Ezek alapján feltételezzük, hogy IDU alkalmazásakor, amikor virusszaporodás nem jön létre, az inoculummal bevitt penton antigének váltják ki az interferon képződését. Lehetségesnek tartjuk, hogy IDU jelenlétében azért termelődik több interferon, mivel ebben az esetben a sejtek csak az interferon termelésével vannak elfoglalva.

Az interferon képződésének mechanizmusával foglalkozó kutatások ezideig nem tudtak választ adni arra a kérdésre, hogy a virusok milyen komponense váltja ki az interferon képződését. Egyes adatok alapján, például, hogy nukleinsavval is sikeres az indukció, az a vélemény alakult ki, hogy valószinüleg a virusok esetében is a nukleinsav felelős az indukcióért. Található olyan adat is, amely a vírus fehérje komponenséről tételezi fel, hogy inducerként

hat /Powell és Setlov 1956/. A trypsinnel, hővel, valamint az ultraibolya fénnyel kezelt mind human, mind avian adenovirusokkal végzett indukció során kapott adatok az utóbbi feltevést látszanak alátámasztani.

Összefoglalás

Eredményeinket összefoglalva, a következőket állapithatjuk meg:

1./ A GAL-virus human sejtekben nem indukál interferont, csirke fibroblast sejtekben azonban a human adenovirusokhoz hasonlóan jó inducernek mutatkozik.

2./ A képződött interferon minden vizsgált tulajdonságában megegyezik a már ismert interferonokkal:

trypsin érzékeny

hővel és 2-es pH-val szemben ellenálló

a virussal szembeni specifikus immunsavó nem inaktiválja

species specificitással rendelkezik

különböző virusokkal szemben hatásos

actinomycin D gátolja antivirális hatását.

3./ Termelődésének kinetikája az RNS vírusokkal indukált interferonéhoz hasonló.

4./ A képződött interferon-mennyiség a fertőzés multiplicitásától függ.

5./ Az interferon-termelés a vírusszaporodásának IDU-val történő gátlása esetén is végbemegy.

6./ A hővel inaktivált GAL-vírus nem indukál interferont.

7./ Az ultraibolya fénnyel besugárzott GAL-vírus hamarabb veszíti el infectivitását, mint interferont indukáló képességét.

8./ A vírus trypsin-kezelése nem befolyásolja annak interferon-termelést kiváltó képességét.

9./ A GAL-vírussal oltott csirke fibroblast sejtekben az interferon termelés mellett kis mértékü vírusszaporodás is bekövetkezik. Az általunk megfigyelt interferon képződéssel magyarázzuk azt, hogy csirke fibroblast sejtekben, szemben a vese sejtekkel, csak kevés vírus termelődik és a vírusra jellemző CP hatás sem alakul ki.

10./ Vizsgálataink szerint tehát nemcsak a human adenovírusok, hanem az avian adenovírusok is indukálnak interferont csirke fibro-

blast sejtekben. Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy az interferont indukáló képesség nemcsak a human adenovirusokra, hanem az egész adenovirus csoportra jellemző tulajdonság.

11./ Ugy gondoljuk, hogy a GAL-virus esetében, hasonlóan a human adenovirusokhoz, szintén a penton antigén felelős az interferon indukcióért. Véleményünk szerint a GAL-virus szaporodásának gátlását okozó IDU jelenlétében az inoculummal bevitt penton antigének okozzák az interferon indukciót, a trypsinezett virus esetében pedig a sejtekben ujonnan képződő penton antigének felelősek az indukcióért.

I R O D A L O M

Allison A.C. /1961/. Interference with, and interferon production by, polyoma virus. Virology 15, 47.

Bakay M. /1969/. Interferon induction by GAL virus in chick embryo cells. Acta virol. /in press/.

Baron S. and Isaacs A. /1962/. Absence of interferon in lungs from fatal cases of influenza. Brit.Med.J. 1, 18.

Baron S. and Buckler C.E. /1963/. Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus. Science 141, 1061.

Baron S., Barban S. and Buckler C.E. /1964/. Host cell species specificity of mouse and chicken interferons. Science 145, 814.

Baron S., Merigan T.C. and McKerlie M.L. /1966a/. Effect of crude and purified interferons on the growth of uninfected cells in culture. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 121, 50.

Baron S., Buckler C.E., McCloskey R.V. and Kirschstein R.L. /1966b/. Role of interferon during viremia. I.Production of circulating interferon. J.Immunol. 96, 12.

Bauer D.J., St.Vincent L., Kempe C.H. and Downie A.W. /1963/. Prophylactic treatment of smallpox contacts with N-methyl-isatin β-thiosemicarbazone. Lancet 2, 494.

Béládi I. /1962/. Study of the plaque formation and some properties of the Aujeszky disease virus on chicken embryo cells. Acta Vet.Acad.Sci.Hung.XII, 417.

Béládi I. and Pusztai R. /1967/. Interferon-like substance produced in chick fibroblast cells inoculated with human adenoviruses. Z.Naturforsch. 22b, 165.

Béládi I., Pusztai R., Mucsi I. and Bakay M. /1968/. Production of interferon in chick embryo fibroblast cells inoculated with oncogenic adenoviruses. Proc.Microbiol.Res.Group Hung.Acad.Sci. II, 61.

Burke D.C. and Buchan A. /1965/. Interferon production in chick embryo cells. I.Production by ultraviolet-inactivated virus. Virology 26, 28.

Burke D.C. and Morrison J.M. /1966/. Interferon production in chick embryo cells. II.The role of DNA. Virology 28, 108.

Burke D.C. and Skehel J.J. /1967/. Interferons and other cell products influencing viral multiplication. Brit.Med.Bull. 23, 109.

Burmester B.R., Sharpless G.R. and Fontes A.K. /1960/. Virus isolated from avian lymphomas unrelated to lymphomatosis virus. J.Nat.Cancer Inst. 24, 1443.

Cantell K. and Paucker K. /1963/. Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. IV.Production and assay of interferon. Virology 21, 11.

Chomiak T.W., Luginbuhl R.E. and Helmboldt C.F. /1961/. Tissue culture propagation and pathology of CELO virus. Avian Dis. 5, 313.

Cook J.K.A. /1968/. Isolation of a CELO virus from fertile chicken eggs. Vet.Rec. 82, 294.

Diderholm H. /1963/. Production of interferon by monkey kidney cells infected with simian virus 40.
Arch.ges.Virusforsch. 14, 39.

Ellis L.F. and Kleinschmidt W.J. /1967/. Virus-like particles of a fraction of statolon, a mould product.
Nature 215, 649.

Falcoff E., Falcoff R., Fournier P. and Chany C. /1966/. Production en masse, purification partielle et caractérisation d'un interferon destiné á des essais thérapeutique humains.
Ann.Inst. Pasteur. 111, 562.

Feldman H.A. and Wang S.S. /1961/. Sensitivity of various viruses to chloroform.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 106, 736.

Field A.K., Tytell A.A., Lampson G.P. and Hillemann M.R. /1968/. Inducers of interferon and host resistance. V.In vitro studies.
Proc.Nat.Acad.Sci. 61, 340.

Friedman R.M. and Sonnabend J.A. /1964/. Inhibition of interferon action by p-fluorophenylalanine.
Nature 203, 366.

Fruitstone M.J., Waddell G.H. and Sigel M.M. /1964/. An interferon produced in response to infection by herpes simplex virus.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 117, 804.

Gandhi S.S. and Stewart R.B. /1969/. The production and effect of interferon on influenza virus growth in chick embryo lung epithelial and fibroblast cell cultures.
Canad.J.Microbiol. 15, 273.

Gilkes M.C. /1963/. 5-iodo-2'-deoxyuridine in herpetic keratitis.
Lancet 1, 227.

Ginsberg H.S. /1956/. Characteristics of the new respiratory viruses /adenoviruses/. II. Stability to temperature and pH alterations.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 93, 48.

Ginsberg H.S. /1958/. Characteristics of the adenoviruses. III.Reproductive cycle of types 1 to 4. J.exp.Med. 107, 133.

Ginsberg H.S. /1962/. Identification and classification of adenoviruses. Virology 18, 312.

Glasgow L.A. and Habel K. /1962/. The role of interferon in vaccinia virus infection of mouse embryo tissue culture. J.exp.Med. 115, 503.

Heller E. /1963/. Enhancement of Chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by Actinomycin D. Virology 21, 652.

Henle W., Henle G., Deinhardt F. and Bergs V.V. /1959/. Studies on persistent infections of tissue cultures. IV.Evidence for the production of an interferon in MCN cells by myxoviruses. J.exp.Med. 110, 525.

Herrmann E.C. /1961/. Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 107, 142.

Ho M. and Enders J.F. /1959a/. An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures. Proc.Nat.Acad.Sci. 45, 385.

Ho M. and Enders J.F. /1959b/. Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures and its role in chronic viral infections. Virology 9, 446.

Ho M. and Kono Y. /1965/. Effect of Actinomycin D on virus and endotoxin-induced interferonlike inhibitors in rabbits. Proc.Nat.Acad.Sci. 53, 220.

Hopps H.E., Kohno S., Kohno M. and Smadel J.E. /1964/. Production of interferon in tissue cultures infected with Rickettsia tsutsugamushi. Bact.Proc. 151.

Hwang J., Luginbuhl R.E. and Helmboldt C.F. /1960/. The in vivo and in vitro isolation of avian encephalomyelitis virus /AEV/. Avian Dis. 4, 545.

Isaacs A. /1963/. Interferon. Adv.Virus Res. 10, 1.

Isaacs A. and Lindenmann J. /1957/. Virus interference. I.The interferon. Proc.Roy.Soc. B147, 258.

Isaacs A., Porterfield J.S. and Baron S. /1961/. The influence of oxygenation on virus growth. II.Effect on the antiviral action of interferon. Virology 14, 450.

Jensen K.E., Neal A.L., Owens R.E. and Warren J. /1963/. Interferon responses of chick embryo fibroblasts to nucleic acids and related compounds. Nature 200, 433.

Jones B.R., Galbraith J.E.K. and Al-Hussaini M.K. /1962/. Vaccinial keratitis treated with interferon. Lancet 1, 875.

Kawamura H. and Tsubahara H. /1963/. Serological relationship between CELO and GAL viruses. Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart. 3, 77.

Kawamura H., Sato T., Tsubahara H. and Isogai S. /1963/. Isolation of CELO virus from chicken trachea. Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart. 3, 1.

Kawamura H., Shimizu F. and Tsubahara H. /1964/. Avian adenovirus: Its properties and serological classification. Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart. 4, 183.

Khanna P.N. /1965/. Studies on avian adenoviruses. /kandidátusi disszertáció, Budapest/.

Kleinschmidt W.J., Cline J.C. and Murphy E.B. /1964/. Interferon production induced /by statolon. Proc.Nat.Acad.Sci. 52, 741.

Lampson G.P., Tytell A.A., Nemes M.M. and Hilleman M.R. /1963/. Purification and characterization of chick embryo interferon. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 112, 468.

Lampson G.P., Tytell A.A., Nemes M.M. and Hilleman M.R. /1965/. Characterization of chick embryo interferon induced by a DNA virus. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 118, 441.

Lampson G.P., Tytell A.A., Field A.K., Nemes M.M. and Hilleman M.R. /1967/. Inducers of interferon and host resistance. I.Double stranded RNA from extracts of Penicillium funiculosum. Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 782.

Larke R.P.B. /1966/. Interferon: a changing picture. Canad. med.Ass.J. 94, 23.

Levine S. /1964/. Effect of Actinomycin D and puromycin dihydrochloride on action of interferon. Virology 24, 586.

Levy H.B. and Merigan T.C. /1966/. Interferon and uninfected cells. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 121, 53.

Lockart R.Z.Jr. /1963/. Production of an interferon by L cells infected with Western Equine Encephalomyelitis Virus. J.Bact. 85, 556.

Lockart R.Z.Jr. /1964/. Necessity for cellular RNA and protein synthesis for viral inhibition resulting from interferon. Biochem.biophys.Res.Commun. 15, 513.

Marcus P.I. and Salb J.M. /1966/. Molecular basis of interferon action: Inhibition of viral RNA translation. Virology 30, 502.

Merigan T.C. /1964/. Purified interferons: Physical properties and species specificity. Science 145, 811.

Merigan T.C. /1967/. Interferons of mice and men. New Engl.J.Med. 276, 913.

Merigan T.C. and Regelson W. /1967/. Interferon induction in man by a synthetic polyanion of defined composition. New Engl.J.Med. 277, 1283.

Michaels R.H., Weinberger M.M. and Ho M. /1965/. Circulating interferon-like viral inhibitor in patients with meningitis due to Haemophilus influenzae. New Engl.J.Med. 272, 1148.

Oxford J.S. and Potter C.W. /1969/. Chick embryo lethal orphan /CELO/ virus as a possible contaminant of egg-grown virus vaccines. J.Hyg./Camb./ 67, 41.

Paucker K. /1965/. The serologic specificity of interferon. J.Immunol. 94, 371.

Pereira H.G. /1958/. A factor responsible for the early cytopathic effect of adenoviruses. Virology 6, 601.

Petralli J.K., Merigan T.C. and Wilbur J.R. /1965/. Circulating interferon after measles vaccination. New Engl.J.Med. 273, 198.

Powell W.F. and Setlov R.B./1956/. The effect of monochromatic ultraviolet radiation on the interfering property of influenza virus. Virology 2, 337.

Pusztai R., Béládi I., Bakay M. and Mucsi I. /1969/. Effect of ultraviolet irradiation and heating on the interferon-inducing capacity of human adenoviruses. J.gen.Virol. 4, 169.

Reed L.J. and Muench H. /1938/. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer.J.Hyg. 27, 493.

Rotem Z., Cox R.A. and Isaacs A. /1963/. Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid. Nature 197, 564.

Rowe W.P., Huebner R.J., Gilmore L.K., Parrott R.H. and Ward T.G. /1953/. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 84, 570.

Rowe W.P., Hartley J.W., Roizman B. and Levy H.B. /1958/. Characterization of a factor formed in the course of adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass.
J.exp.Med. 108, 713.

Rowe W.P. and Hartley J.W. /1962/. A general review of the adenoviruses.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 101, 466.

Ruiz-Gomez J. and Isaacs A. /1963/. Interferon production by different viruses.
Virology 19, 8.

Russell W.C., Valentine R.C. and Pereira H.G. /1967/. The effect of heat on the anatomy of the adenovirus.
J.gen.Virol. 1, 509.

Rytel M.W., Shope R.E. and Kilbourne E.D. /1966/. Antiviral substance from Penicillium funiculosum. V.Induction of interferon by helenine.
J.exp.Med. 123, 577.

Sarma P.S., Huebner R.J. and Lane W.T. /1965/. Induction of tumours in hamsters with an avian adenovirus /CELO/.
Science 149, 1108.

Scientific Committee of Interferon /1962/. Effect of interferon on vaccination in volunteers.
Lancet 1, 873.

Sharpless G.R., Levine S., Davies M.C. and Englert M.E. /1961/. GAL virus: Its growth cycle in tissue culture and some of its properties.
Virology 13, 315.

Sonnabend J.A. and Friedman R.M. /1966/. Interferons. North-Holland Publishing Company, Amsterdam /chapter 7/.

Sharpless G.R. /1962/. GAL virus.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 101, 515.

Stewart R.B. and Frickey P.H. /1966/. Studies on cytotropism in animal viruses. III.Growth of influenza virus in epithelial-like and fibroblastic cells derived from chick embryo lung.
J.Bacteriol. 92, 972.

Stinebring W.R. and Youngner J.S. /1964/. Patterns of interferon appearance in mice injected with bacteria and bacterial endotoxin.
Nature 204, 712.

Takahashi M., Van Hoosier G.L.Jr. and Trentin J.J. /1966/. Stimulation of DNA synthesis in human and hamster cells by human adenovirus types 12 and 5.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 122, 740.

Taylor J. /1964/. Inhibition of interferon action by actinomycin.
Biochem.biophys.Res.Commun. 14, 447.

Tousimis A.J. and Hilleman M.R. /1957/. Electron microscopy of type 4 adenovirus strain RI-67.
Virology 4, 499.

Tyrrel D.A.J. /1959/. Interferon produced by cultures of calf kidney cells.
Nature 184, 452.

Valentine R.C. and Pereira H.G. /1965/. Antigens and structure of the adenovirus.
J.Mol.Biol. 13, 13.

Wagner R.R. /1960/. Viral interference. Some considerations of basic mechanisms and their potential relationship to host resistance.
Bacteriol.rev. 24, 151.

Wagner R.R. /1961/. Biological studies of interferon. I.Supression of cellular infection with Eastern Equine Encephalomyelitis Virus.
Virology 13, 323.

Wheelock E.F. /1965/. Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin.
Science 149, 310.

Wheelock E.F. and Sibley W.A. /1964/. Interferon in human serum during clinical viral infections.
Lancet 2, 382.

Yates V.J. and Fry D.E. /1957/. Observations on a chicken embryo lethal orphan /CELO/ virus.
Amer.J.Vet.Res. 18, 657.

Youngner J.S. and Stinebring W.R. /1964/. Interferon production in chickens injected with Brucella abortus.
Science 144, 1022.

ORSZÁGOS ÉPÍTŐIPARI EGYETEM KÖNYVTÁRA
1047/1971