

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по микробиология “Стефан Ангелов”

---

Иванка Николова Николова

**Резистентни и зависими мутанти на вирус  
Коксаки В1 към пикорнавирусния инхибитор  
дизоксарил**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

София, 2003

Дисертацията съдържа 118 страници, 8 таблици, 7 схеми и 12 фигури. В библиофската справка са включени 127 заглавия, от които 2 на кирилица и 125 на латиница.

Експерименталната работа е извършена в секция “Вирусология” на Институт по микробиология “Стефан Ангелов” – БАН.

Бих искала да изразя голямата си благодарност на Стоян Чакъров, главен асистент в катедра Биохимия на Биологическия факултет, СУ за оказаното съдействие при изпълнението на молекулярно-генетичните опити от дисертацията.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от 14 часа в залата на Националния център по заразни и паразитни болести, бул. “Янко Сакъзов” No 26, София, на заседание на СНС по микробиология, вирусология и имунология при ВАК.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Националния център по заразни и паразитни болести, бул. “Янко Сакъзов” No 26, София.

---

**СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО  
МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И  
ИМУНОЛОГИЯ ПРИ ВАК**

---

Иванка Николова Николова

**Резистентни и зависими мутанти на вирус  
Коксаки В1 към пикорнавирусния инхибитор  
дизоксарил**

(Научна специалност 01.06.13. Вирусология)

**Автореферат**

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

Научен ръководител:  
Ст.н.с. I ст. д-р Ангел С. Гълъбов, д.м.н.

Официални рецензенти:

Ст.н.с. I ст. Соня Панчева, д.м.н.

Ст.н.с. I ст. инж. Лиляна В. Каваклова, д.м.н.

София, 2003

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Семинара по обща вирусология към Института по микробиология “Стефан Ангелов” – БАН. Дисертантът работи в Секция “Вирусология”, Институт по микробиология – БАН.

### Използвани съкращения

CVB1	-вирус Коксаки В1
Dis	-дизоксарил
П.О.Е.	-плако-образуваща единица
IC <sub>50</sub>	-концентрация, намаляваща с 50% броя на ПОЕ в сравнение с броя на ПОЕ в контролата, без инхибитор в поддържащата среда (inhibitory concentration 50%)
CCIC <sub>50</sub>	- концентрация, намаляваща с 50% клетъчния брой (cell culture inhibitory concentration 50%)
ET <sub>50</sub>	-ефективно време 50% (effective time 50% )
MIC <sub>50</sub>	-минимална инхибираща концентрация 50% (minimal inhibitory concentration 50%)
MST	-средно време на преживяване (mean survival time)
HEV	- човешки ентеровирус (human enterovirus)
LD <sub>50</sub>	- летална доза 50% (lethal dose 50%)
RT	- обратна транскриптаза (reverse transcriptase)
PCR	- верижна полимеразна реакция (polymerase chain reaction)
DEPC	- диетил пирокарбонат (diethyl pyrocarbonate)
M-MLV-RT	-обратна транскриптаза на мишия левкозен вирус Moloney (mouse Moloney leukemia virus reverse transcriptase)
dNTP	-дезоксирибонуклеозид трифосфат (deoxyribonucleoside triphosphate)
CoxB1 (dis-s/FL)	- дизоксарил-чувствителен мутант на вирус Коксаки В1 (еталонен див щам)
CoxB1 (dis-s/m)	- дизоксарил-чувствителен мутант на вирус Коксаки В1, адаптиран на миши мозък
CoxB1 (dis-r30μM/FL)	- дизоксарил-резистентен мутант на вирус Коксаки В1, получен в клетъчни култури FL

СохВ1 (dis-r25mg/kg/m) - дизоксарил-резистентен мутант на вирус Коксаки В1,  
изолиран от новородени мишки  
СохВ1 (dis-d30μM/FL) - дизоксарил-зависим мутант на вирус Коксаки В1, получен  
в клетъчни култури FL

## УВОД

Човешките ентеровируси и по специално Коксаки вирусите са причинители на широк спектър от заболявания при деца и възрастни. Те поразяват главно централната нервна система и сърцето. Един от основните и засега непреодолим проблем за създаването и прилагането на ефикасна химиотерапия при заболяванията предизвикани от тези вируси е бързата поява на резистентност към съответните химиотерапевтици. Безспорно, разработването на ефективни антивирусни химиотерапевтици, отговарящи на принципите на Paul Ehrlich, е важно биомедицинско научно постижение в последната четвърт на 20ти век. През последните 5-10 години списъкът на тези лекарства е продължен с първи химиотерапевтици срещу вируса на хепатит В и папиломавируси. Открити бяха и перспективни инхибитори на репликацията на риновируси и ентеровируси. Вирусно закодирана лекарствена резистентност е установена към почти всички съединения с антивирусна активност и генетичната основа на резистентността е вече позната. При РНК-съдържащите вируси и най-вече при пикорнавирусите, както е вирус Коксаки В1, случайните генетични мутации се срещат с висока честота, тъй като генетичният контрол е слаб и РНК-полимеразата допуска грешки около един милион пъти по-често в сравнение с ДНК-полимеразата. Поради това в естествени условия пикорнавирусната популация е доста хетерогенна. Този голям брой от мутанти са в резултат на точкови мутации, случващи се по време на вирусната репликация.

През последните години обект на интензивни изследвания сред пикорнавирусните инхибитори са веществата, които взаимодействат с вирусни капсидни белтъци. Въпросът за развитието на резистентност към този тип съединения стои открит.

Резултатите от нашите изследвания са в подкрепа на становището, че определянето на генетичните маркери на мутантите би следвало да бъде задължително условие при тяхното изследване. Съчетаването на маркерите – фенотипни характеристики с молекулярно-генетичния анализ дава още по-пълна представа за характера на появилите се мутации и локализирането им във вирусния геном. Геномът на повечето ентеровируси е вече секвениран и това ни дава информация за функционалните генетични структури, които трябва да са в основата на антивирусните стратегии (Hellen и Wimmer, 1995). Важно е да се изследва молекулната основа на антивирусния ефект – мишените атакувани от инхибиторите, чрез сравняване на геномните секвенции на дивия тип вирус с получените мутанти. Това е съществена стъпка в разработването на антивирусни химиотерапевтици.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Ние си поставихме за цел: изясняване феномена резистентност по отношение на капсидния инхибитор – дизоксарил на модел вирус Коксаки В1, включително фенотипните характеристики и молекулярно генетичната основа на резистентността. За осъществяване на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Изолиране на дизоксарил-резистентни мутанти на вирус Коксаки В1 от тялото на третиран с дизоксарил новородени мишки в хода на експериментална инфекция с вирус Коксаки В1.
2. Изолиране на дизоксарил-резистентни мутанти на вирус Коксаки В1 в клетъчни култури FL.
3. Изолиране на дизоксарил-зависим мутант на вирус Коксаки В1 в клетъчни култури FL.
4. Фенотипна характеристика (определяне на генетичните маркери) на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1: размер и форма на плаките под агар; термостабилност и патогенност за новородени мишки.
5. Определяне кинетиката на ефекта на дизоксарила върху репликацията на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1.
6. Секвенционен анализ на гена кодиращ VP1 на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

**Вещество:**Дизоксарил.5-[7-[4(4,5-дихидро-2-оксазолил)фенокси]хептил]-3-метилизоксазол (WIN 51 711), предоставен от Sanofi Wintrop, Inc. (Malverne, Pennsylvania, USA).

**Вирус:** В опитите бе използван вирус Коксаки В1 (CVB1) (Connecticut 5).

**Клетъчна култура:** За опитите бе използвана клетъчна линия FL.

**Опитни животни:** В опитите *in vivo* бяха използвани новородени бели мишки от рендомбрена линия ICR.

**Клониране на вирусите:** Всички вирусни мутанти, които бяха използвани в опитите *in vivo* и *in vitro* бяха трикратно плаково пречистени в клетки FL.

**Титриране на вирусите**

**Определяне на инфекциозния титър в клетъчни култури:** Вирусите бяха титрирани по плаковия метод на Dulbecco.

**Титриране *in vivo*:** Изолираният от мозъка на заразените новородени мишлета Коксаки вирус В1 беше титриран чрез подкожно инокулиране в едnodневни бели мишлета по метода на крайното разреждане на Kaerber.

**Експериментална инфекция с вирус Коксаки В1 в новородени мишки:** За целите на експериментите *in vivo* бяха използвани новородени бели мишки. От мозъка на парализираните в резултат на инфекцията животни се приготвяше 10% суспензия във физиологичен разтвор.

**Определяне на антивирусната активност *in vitro*:** Определянето на антивирусната активност на съединението се извършваше чрез плако-инхибиращия тест на Herrmann (1961) и Siminoff (1961).

**Получаване на резистентни мутанти *in vitro*:** Извършваха се последователни пасажи на вирус Коксаки В1 (предварително клониран чрез плаков метод) в монослойни култури на клетки FL, като към поддържащата среда се добавяше съответно 30  $\mu$ M дизоксарил. Изпитването за чувствителност се провеждаше чрез

плако-инхибиращия тест по Herrmann (1961) и Siminoff (1961) с включване на инхибитора в агаровото покритие и бе определена  $MIC_{50}$  в постановка доза-отговор. **Получаване на зависими мутанти *in vitro*:** Провеждаха се последователни пасажи на вече изолирания резистентен към дизоксарил на вирус Коксаки В1 СохВ1 (dis-r30 $\mu$ M/FL) в монослойни култури на клетки FL с дизоксарил в поддържащата среда (30  $\mu$ M). Проверката за зависимост се правеше в многоциклов тест в присъствие и отсъствие на дизоксарил.

**Определяне на антивирусния ефект на дизоксарил при експериментална инфекция с вирус Коксаки В1 у новородени мишки:** Еднодневни бели мишлета (40-50) се заразяваха чрез подкожно инокулиране на 5-10  $LD_{50}$  вирус в обем 0.02 мл. и тестираното съединение дизоксарил в доза 25мг/кг. Ефектът на дизоксарила се определяше въз основа на показателите: кумулативна смъртност и средно време на преживяване.

**Получаване на вирусни изолати от мозъка на мишки в хода на експериментална Коксаки В1 вирусна инфекция:** Вирусните проби (смес от мозъци на мишлета от групата третирани с дизоксарил и от групата плацебо, съответно) бяха взимани всеки ден, започвайки от 4-ия ден след вирусната инокулация.

**Определяне на чувствителността на вирусните изолати към дизоксарил:** За целта бе използван плако-инхибиращ тест. На базата на получените данни се построяваше кривата доза-отговор и определяше минималната инхибираща концентрация 50% ( $MIC_{50}$ ).

**Тест за термочувствителност на мутантите:** Равни количества (по 1 мл) от вирусните мутанти ( $10^{7.3}$   $CCID_{50}$ ) бяха поставяни на водна баня на 46°C, 50°C и 54°C за различни периоди от време. Инфекциозният титър на пробите се определяше чрез метода на крайното разреждане.

**Определяне на патогенността на мутантите за мишки:** Кумулативната смъртност и средното време на преживяване на новородените мишки бяха определяни до 12-ия ден след вирусната инокулация.

**Тест *in vitro* за реверсия на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1:** Бяха проведени по 10 пасажа на всеки вирусен мутант. Вирусният добив от всеки пасаж се титрираше по плако-инхибиращия метод.

**Едностъпен вирусен репликативен цикъл** бе проведен с дизоксарилите мутанти СохВ1 (dis-s/FL), СохВ (dis-r30 $\mu$ M/FL) и СохВ1 (dis-d30 $\mu$ M/FL) при множественост на инфекцията 50  $CCID_{50}$ /клетка.

**Определяне кинетиката на ефекта на дизоксарил върху репликацията на дизоксарил-зависим Коксаки В1 мутант в клетъчни култури:** Дизоксарил се добавяше в съответните сцинтилационни флакони на 0-ия, 1-ия, 2-ия, 3-ия, 4-ия, 5-ия и 6-ия час след вирусната адсорбция. Флаконите, които бяха с дизоксарил добавен на 0-ия, 1-ия и 2-ия час се замразяваха на 3-ия, 4-ия, 6-ия и 9-ия час след вирусната



адсорбция. Събираха се вирусни проби на 3-ия, 4-ия, 6-ия и 9-ия час и се определяше инфекциозния титър на вирусите по метода на крайното разреждане.

**Изолиране на РНК от дизоксарил-резистентните и зависими мутантите на вирус Коксаки В1:** За изолирането на РНК беше използван RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega).

**RT-PCR:** Работеше се с четири праймерни двойки, компютърно избрани въз основа на секвенцията на участъка от генома на Коксаки В1 вируса, кодираща вирус-специфичния белтък VP1.

**Секвениране:** Секвенирането бе извършено по дидезокси метода на Sanger (1977) с помощта на Autoread Sequencing Kit (Pharmacia) и автоматичен секвенатор ALF DNA Sequencer unit (Pharmacia, New Brunswick) в Institut Pasteur, Париж, Франция.

**Статистическа обработка:** За отчитане на разликите в леталитета и диаметъра на плаките между отделните групи животни бяха използвани *t* –тестът на Student или  $\chi^2$  тестът.

## РЕЗУЛТАТИ

**Ефект на дизоксарил при експериментална инфекция с вирус Коксаки В1 в новородени мишки:** Ефектът на дизоксарил, прилаган в 12 дневен курс, стартиран от деня на вирусната инокулация в дневна доза 25 мг/кг, се изразяваше в удължаване на средното време за преживяване на заразените с вирус Коксаки В1 мишки с 3.6 дни (9.6 и 6.0 дни, съответно в групата третирани и групата плацебо заразени с LD50 = 6) и 4.6 дни (8.4 и 3.8 дни, съответно в групата третирани и групата плацебо заразени с LD50 = 15) (Таблица 1).

Таблица 1. Ефект на дизоксарил (въвеждан подкожно 25 мг/кг/ден в 12 дневен курс) при инфекция с вирус Коксаки В1 (подкожно 6 и 15 LD<sub>50</sub>/0.02 мл) в новородени мишки

LD <sub>50</sub>	Тес-тира на за група	N*	Кумулативна смъртност (%)											MST дни
			Дни след вирусната инокулация											
мишка			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
6	Пл.	43	0	9.3	14.0	23.3	44.2	53.5	70.0	76.7	83.7	88.4	93.0	6.0
	Диз.	60	1.7	5.0	6.7	15.0	25.0	31.7	36.7	40.0	43.3	46.7	50.0***	9.6
15	Пл.	11	0	0	81.8	100								3.8
	Диз.	11	0	0	18.2	27.3	36.4	45.5	45.5	63.6	63.6**			8.4

N - брой животни в тестирана група  
 Пл. – група плацебо  
 Диз. – групи, третирани с дизоксарил  
 \*\*, p< 0.01; \*\*\*, p< 0.001,  $\chi^2$  тест

**Ефект на курс с дизоксарил върху вирусното съдържание в мозъка на мишки:**  
 От таблица 2 може да се види, че съдържанието на инфекциозен вирус в мозъчните изолати, взети от третираните животни през първите 5 дена след вирусната инокулация бе по-ниско с 2.0-2.7 log<sub>10</sub> LD<sub>50</sub> в сравнение с групата плацебо. По-късно, на 6-7 ден, тази разлика значително намаляваше (до 0.8-1.0 log<sub>10</sub> LD<sub>50</sub>), като от 8-ия ден бе отчетено значително повишаване на вирусното съдържание в мозъка на третираните с дизоксарил животни.

Таблица 2. Ефект на дизоксарила върху вирусното съдържание в миши мозък.

Експеримент No.	Експериментална група	Инфекц.титър (log CCIC <sub>50</sub> /мл) на мозъчните проби						
		Дни след вирусната инокулация						
		4	5	6	7	8	9	10
1.	Плацебо	3.7	4.7	4.3	4.7	3.0	<2.0	<2.0
	Дизоксарил	<2.0	<2.0	3.3	4.0	4.8	>4.8	3.7
2.	Плацебо	3.8	4.0	3.8	4.7	4.7	2.7	2.8
	Дизоксарил	<2.0	2.0	3.0	4.3	>4.8	2.0	2.0

**Чувствителност на мозъчните вирусни изолати от дизоксарил третирани мишки към дизоксарил:** Както се вижда на Таблица 3, мозъчните изолати от 7-ия и 8-ия ден след вирусната инокулация показваха значително намаляване на чувствителността към дизоксарил в сравнение с изолатите от групата плацебо. IC<sub>50</sub> на дизоксарила достигна >40  $\mu$ M при пробите от третираната група, докато при групата плацебо стойностите бяха в границите 0.59 – 1.37  $\mu$ M. Тези данни ясно говорят за появата на резистентна към дизоксарил популация на вирус Коксаки В1 в третирани с дизоксарил новородени мишки.

Таблица 3. Чувствителност към дизоксарил в плако-инхибиращ тест (FL клетки) на мозъчните вирусни изолати от третирани с дизоксарил новородени мишки при инфекция с вирус Коксаки В1.

Експеримент No	Експериментална група	MIC <sub>50</sub> на дизоксарил (µM) на вирусните мозъчни изолати, вземани на следните дни след вирусната инокулация							
		4	5	6	7	8	9	10	
1.	Плацебо	0.64	0.65	0.74	0.64	1.2	0.64	0.59	
	Дизоксарил	НТ	НТ	3.3	35.0	>40.0	29.0	32.0	
2.	Плацебо	0.92	0.93	0.8	1.37	1.0	0.8	0.82	
	Дизоксарил	0.65	0.56	0.72	11.82	>40.0	НТ	НТ	

НТ – не е тестирано

**Получаване на дизоксарил-резистентни мутанти на вирус Коксаки В1 в клетки FL:** Три пасажа в клетки FL в присъствие на 30 µM дизоксарил в поддържащата среда на изходния лабораторен щам на вирус Коксаки В1 бяха достатъчни за получаването на дизоксарил-резистентен мутант *in vitro*. Определена бе IC<sub>50</sub> на пробите в постановка доза-отговор на плако-инхибиращия тест.

**Получаване на дизоксарил-зависими мутанти на вирус Коксаки В1 в клетки FL:** Девет последователни пасажа на дизоксарил-резистентния Коксаки В1 мутант СохВ1 (dis-r30µM/FL) в присъствие на 30 µM дизоксарил бяха достатъчни за получаването на дизоксарил-зависим мутант СохВ1 (dis-d30µM/FL).

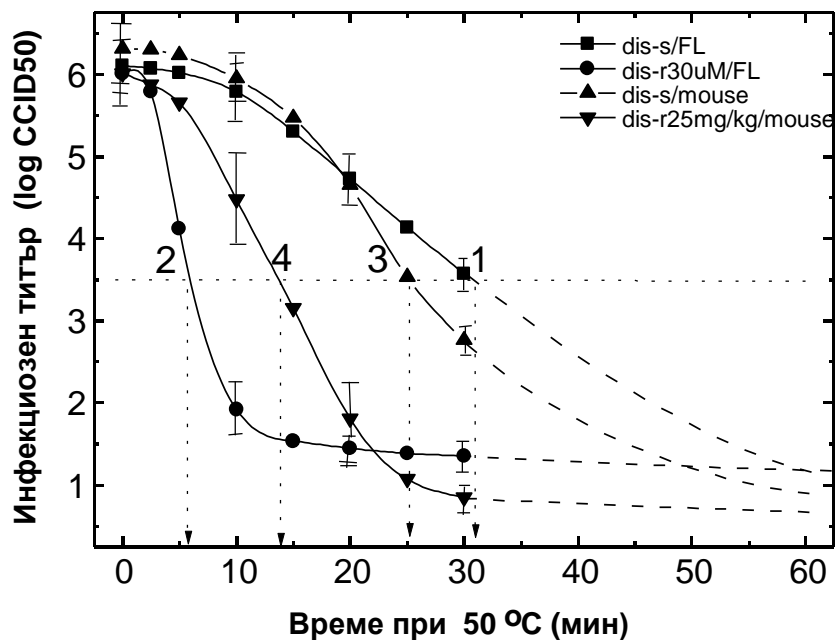
**Тест за реверсия на дизоксарил-резистентните и дизоксарил-зависим мутанти:** При резистентния мутант, получен *in vitro* СохВ1 (dis-d30µM/FL) на 4-ия пасаж MIC<sub>50</sub> бе 32 µM, на 6-ия пасаж вече бе между 1 µM и 3.2 µM, а на 7-ия бе 0.32 µM (при 1, 2 и 3 пасажа MIC<sub>50</sub> беше > 32µM). При резистентния мутант изолиран *in vivo* СохВ1 (dis-r25mg/kg/m), на 8-ия пасаж MIC<sub>50</sub> бе около 10 µM, на 9-ия пасаж – 3.2 µM и едва на 10-ия пасаж достигаше изходна стойност 1 µM. При дизоксарил-зависимия мутант СохВ1 (dis-d30µM/FL) бе наблюдавана загуба на зависимостта и възвръщане на резистентността чак след 10-ия пасаж в отсъствие на инхибитора.

## Фенотипни характеристики (класически генетични маркери) на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1

Определени бяха следните генетични маркери на изходния лабораторен Коксаки В1 щам, дизоксарил-резистентните мутанти и дизоксарил-зависимия мутант: размер и форма на плаките под агар; стабилност при 46°C, 50°C и 54°C; патогенност за новородени мишки.

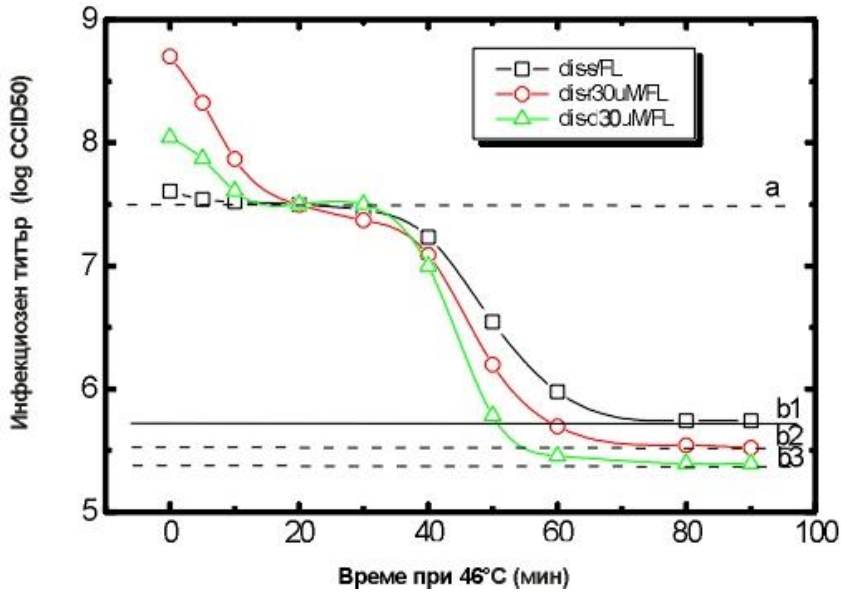
**Размер и форма на плаките:** Размерът на плаките на резистентните и зависимия мутанти беше  $1.9 \pm 0.1$  мм, а  $0.9 \pm 0.3$  мм съответно за дизоксарил-чувствителните мутанти. Плаките на дизоксарил-резистентните CoxB1 (dis-r30μM/FL) и CoxB1 (dis-r25mg/kg/m) и зависимия CoxB1 (dis-d30μM/FL) мутанти имаха по-неправилна форма в сравнение с дизоксарил-чувствителните мутанти CoxB1 (dis-s/FL) и CoxB1 (dis-s/m).

**Термостабилност:** На фигура 1 се вижда, стойността ET50 на дизоксарил-резистентния мутант, изолиран ин витро бе почти 5 пъти по-кратка в сравнение с изходния лабораторен щам: 6'40'' и 31'45'', съответно. Дизоксарил-резистентният мутант, изолиран ин виво, бе значително по-термочувствителен в сравнение с дизоксарил-чувствителния мутант, изолиран от групата плацебо новородени мишки: 13'56'' и 26'06'', съответно.

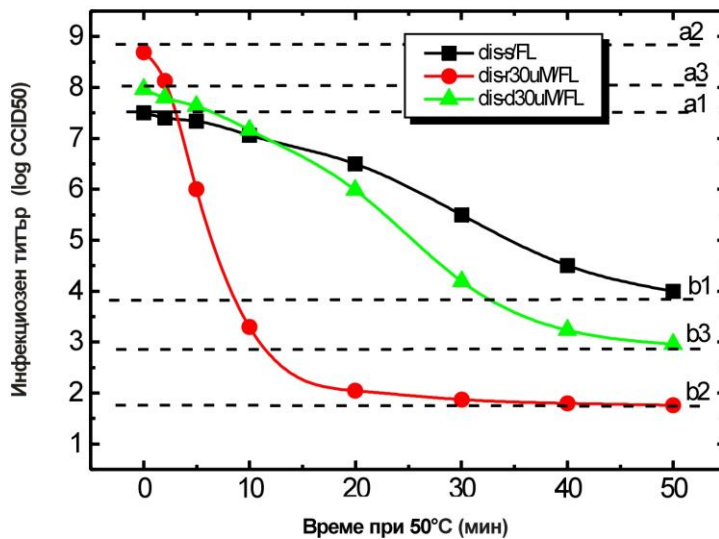


Фигура 1. Криви на термоинактивация при 50°C на дизоксарилови мутанти на вирус Коксаки В1.

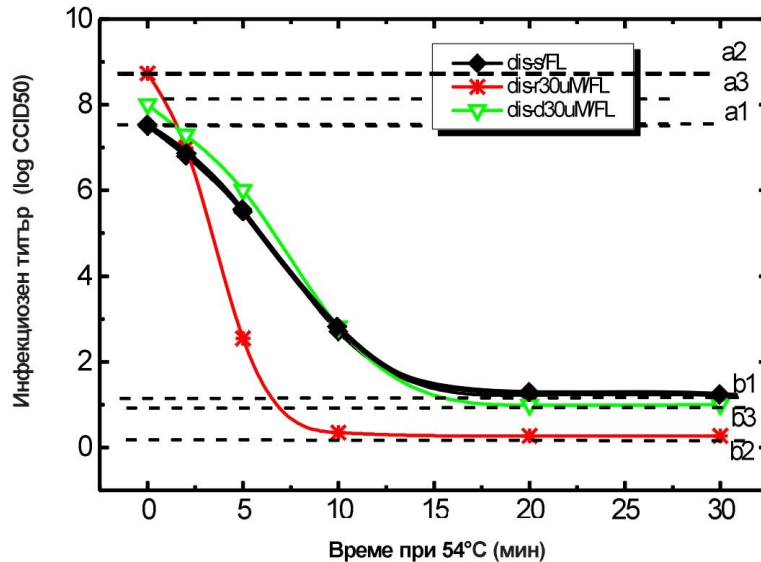
Опитите бяха проведени освен на 50°C и на 46°C и 54°C, като интервалът за инкубиране беше удължен при съответните температури (фигури 2, 3 и 4).



Фигура 2. Криви на термоинактивация при 46°C на дизоксарил-чувствителния, дизоксарил-резистентния, изолиран в клетъчни култури и дизоксарил-зависимия мутант на вирус Коксаки В1.



Фигура 3. Криви на термоинактивация при 50°C на дизоксарил-чувствителния, дизоксарил-резистентния, изолиран в клетъчни култури и дизоксарил-зависимия мутанти на вирус Коксаки В1.



Фигура 4. Криви на термоинактивация при 54°C на дизоксарил-чувствителния, дизоксарил-резистентния, изолиран в клетъчни култури и дизоксарил-зависимия мутанти на вирус Коксаки В1.

Термостабилността на дизоксарил-зависимия мутант е по-близка до трмостабилността на изходния Коксаки В1 вирус при 50°C и 54°C , за разлика от дизоксарил-резистентния мутант, който показва повишена термолабилност.

**Патогенност за новородени мишки:** При проведените опити бе установено, че дизоксарил-резистентните мутанти на вирус Коксаки В1 са с леко повишена патогенност в сравнение с дизоксарил-чувствителните мутанти: при CoxB1 (dis-r30μM/FL) с 0.45 log<sub>10</sub> LD<sub>50</sub> и CoxB1 (dis-r25mg/kg/m) с 0.4 log<sub>10</sub> LD<sub>50</sub>. Този феномен бе особено отчетлив при по-малките вирусни инокулационни дози – 0.1 или 0.01 LD<sub>50</sub> на мишка (Таблица 4).

Таблица 4. Патогенност на дизоксарил-резистентните и дизоксарил-чувствителни мутанти на вирус Коксаки В1 за новородени мишки.

Cox B1 дизоксарил- мутанти	Вирусна инокулационна доза (LD <sub>50</sub> /мишка)					
	0.1			0.01		
	N	Смъртност (%)	MST (дни)	N	Смъртност (%)	MST (дни)
CoxB1(dis-s/FL)	20	30.0	8.5	16	12.5	9.4
CoxB1(dis-r30μM/FL)	22	45.4	7.8	16	25.0	8.8
CoxB1(dis-s/m)	18	11.1	9.6	20	0	10.0
CoxB1(dis-r25mg/kg/m)	22	45.5***	7.8	22	22.2***	8.7

N- броя на животните в тестираната група

MST- средно време за преживяване

\*\*\*, p< 0.001 за CoxB1 (dis-r25mg/kg/m) спрямо CoxB1 (dis-s/m),  $\chi^2$  тест

Следващ етап в нашата работа бе проучване патогенността за новородени мишки на дизоксарил-чувствителния див щам и дизоксарил-зависимия мутант на вирус Коксаки В1 в присъствие и отсъствие на дизоксарил. Както се вижда на Таблицы 5 и 6, при дизоксарил-чувствителния щам приложението на дизоксарил в хода на експерименталната инфекция води до 11-кратно снижение на патогенността му за бели В контраст с тези данни, при приложението на дизоксарил в хода на експерименталната инфекция с дизоксарил-зависимия мутант води до 43-кратно повишаване на патогенността за новородени мишки ( $\Delta\log = 1.63LD_{50}$ /мишка) в присъствие на веществото.

Таблица 5. Патогенност на дизоксарил-чувствителния мутант на вирус Коксаки В1 за новородени мишки в присъствие и отсъствие на дизоксарил.

dis-s/FL -dis	LD <sub>50</sub> / мишка	N	% леталитет	MST (дни)
10 <sup>-3</sup>	70.1	9	100	4.4
10 <sup>-4</sup>	7.1	8	75.5	7.8
10 <sup>-5</sup>	0.7	10	40.0	10.4
10 <sup>-6</sup>	0.07	10	20.0	12.0
10 <sup>-7</sup>	0.007	11	0	14.0
dis-s/FL +dis				
10 <sup>-1</sup>	820.0	10	100	5.3
10 <sup>-2</sup>	82.0	8	100	6.0
10 <sup>-3</sup>	8.2	9	66.7	8.4
10 <sup>-4</sup>	0.82	9	44.4	10.0
10 <sup>-5</sup>	0.082	9	11.1	12.9
10 <sup>-6</sup>	0.0082	11	0	14.0



Таблица 6. Патогенност на дизоксарил-зависимия мутант на вирус Коксаки В1 за новородени мишки в присъствие и отсъствие на дизоксарил.

dis-d/FL -dis	LD <sub>50</sub> / мишка	N	% леталитет	MST (дни)
10 <sup>-1</sup>	333.3	10	100	6.7
10 <sup>-2</sup>	33.3	9	66.7	7.5
10 <sup>-3</sup>	3.3	9	55.5	10.2
10 <sup>-4</sup>	0.33	10	40.0	10.7
10 <sup>-5</sup>	0.033	11	18.2	12.5
10 <sup>-6</sup>	0.003	11	0	14.0
dis-d/FL +dis				
10 <sup>-3</sup>	94.0	10	100	4.3
10 <sup>-4</sup>	9.4	11	81.8	6.8
10 <sup>-5</sup>	0.94	9	33.3	10.9
10 <sup>-6</sup>	0.094	9	22.2	12.3
10 <sup>-7</sup>	0.009	10	0	14.0

В Таблица 7, са обобщени фенотипите характеристики (класическите генетични маркери) на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1.

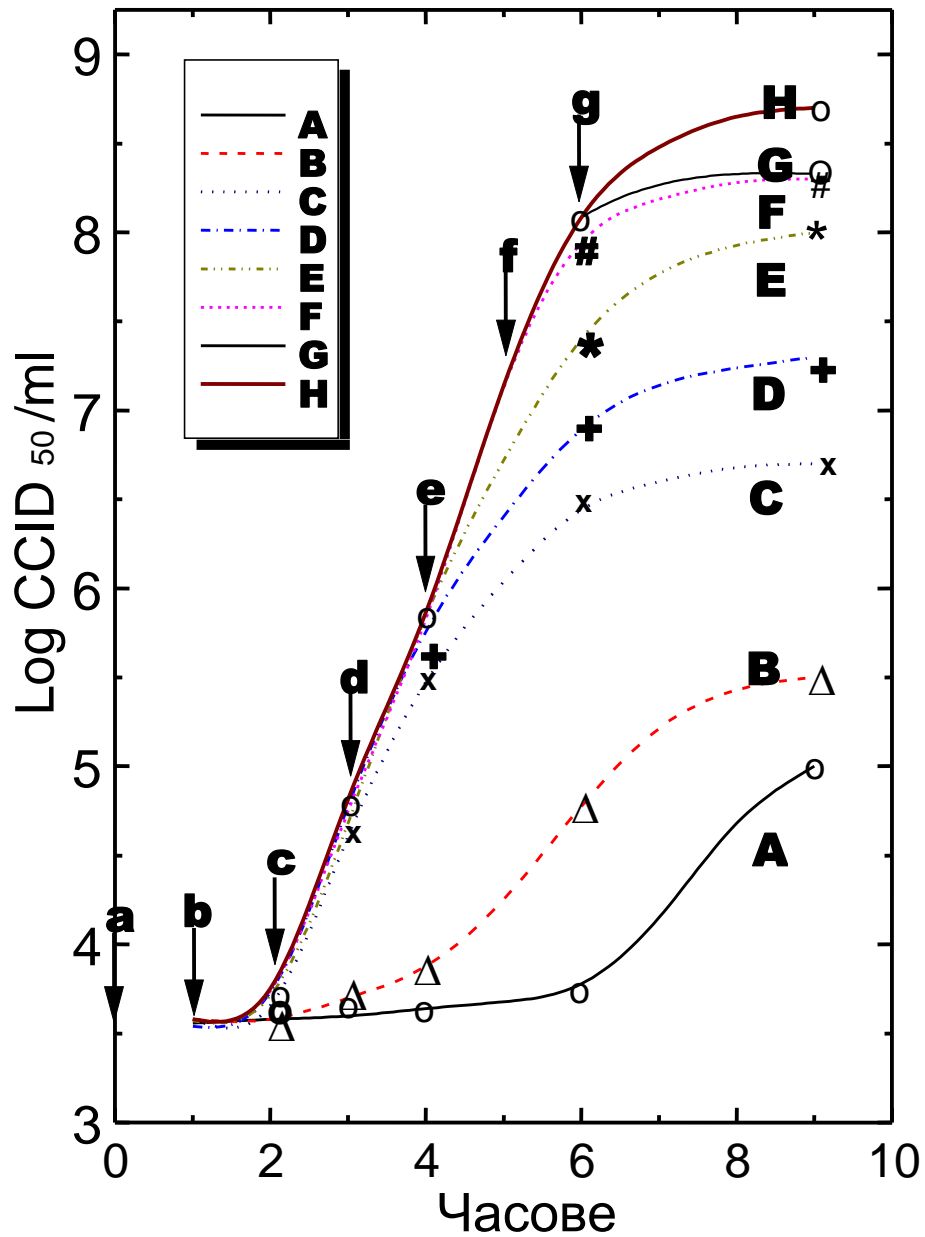
Таблица 7. Фенотипни характеристики (класически генетични маркери) на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1: сравнителни данни.

Дизоксарил. мутанти на вирус Коксаки В1	МІС <sub>50</sub> (μМ)	Диаметър за плаки (мм)	Форма плаки	Стабил- ност на 50° С ЕТ <sub>50</sub> (мин)	Патоген- ност за мишки
dis-s/FL	0.84	0.9 ± 0.3	кръгли	32	нормална
dis-r30μМ/FL	>30.0	1.9 ± 0.1***	неправилни	7	слабо повишена
dis-s/m	0.59-1.37	0.9 ± 0.3	кръгли	26	нормална
dis-r25mg/kg/m	>40.0	1.9 ± 0.1***	неправилни	14	слабо повишена
dis-d30μМ/FL	----	1.9 ± 0.1	неправилни	23	нормална

\*\*\*, p < 0.001 за dis-r спрямо dis-s СохВ1 мутанти, Student's *t*-тест

**Кинетика на ефекта на дизоксарил върху репликацията на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1 в постановка на едностъпен репликативен цикъл:** Както се вижда на фигура 5, ефектът на съединението показва изразено потискане на продукцията на инфекциозни вириони, когато веществото е прибавено по време латентния период (0-3-ти час от вирусната адсорбция). При по-късно

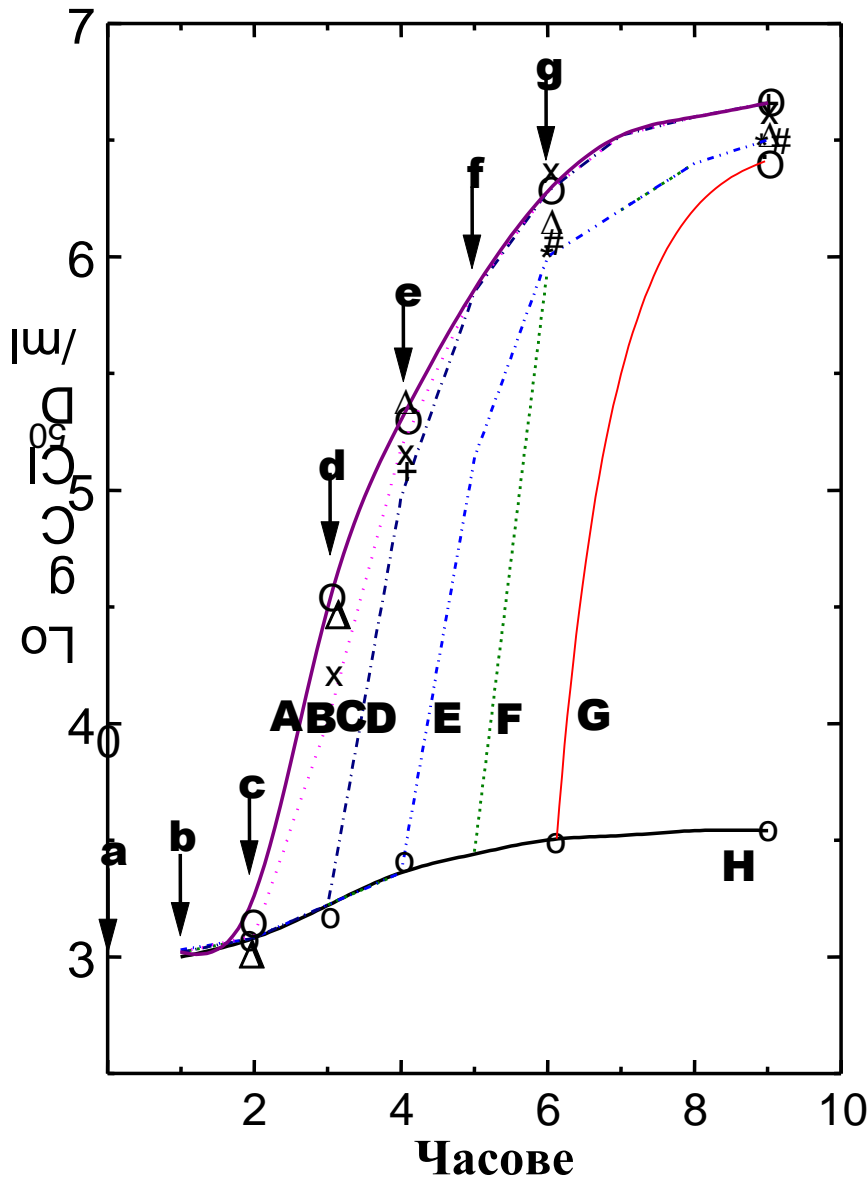
добавяне на съединението (3-ти – 6-ти час) не се наблюдава статистически достоверен инхибиращ ефект. Очевидно, ефектът на съединението засяга ранен етап на вирусната репликация.



Фигура 5. Ефект на дизоксарил върху репликацията на дизоксарил-чувствителния мутант Соx В1 (dis-s/FL) в постановка на едностъпен репликативен цикъл (кинетичен тест) в клетки FL. Дизоксарилът е добавен на: 0-ев час (A) след вирусната

адсорбция; на 1-ви час (B); на 2-ри час (C); на 3-ти час (D); на 4-ти час (E); на 5-ти час (F); на 6-ти час (G); без дизоксарил в поддържащата среда (H);

Както се вижда на фигура 6, експерименталната група при, която съединението не се прилага в поддържащата среда, се наблюдава липса на вирусна репликация. Не се наблюдават никакви различия в титрите на вирусите в края на цикъла между групите при, които съединението е прилагано по време на латентния период (0-ев – 3-ти час). Изненадващо, по-късното прилагане на съединението на 4-ия час или по-късно в хода на експоненциалната фаза, осигурява един висок титър в края на цикъла (9-ти час). Тези данни подсказват, че процесите протичащи в ранния период на вирусната репликация, не влияят съществено върху хода на вирусната репликация в присъствие на дизоксарил.



Фигура 6. Ефект на дизоксарил върху репликацията на дизоксарил-зависимия мутант Сох В1 (dis-d30 $\mu$ M/FL) в постановка на едностъпен репликативен цикъл (кинетичен тест) в клетки FL. Дизоксарилът е добавен на: 0-ев час (А) след вирусната адсорбция; на 1-ви час (В); на 2-ри час (С); на 3-ти час (D); на 4-ти час (E); на 5-ти час (F); на 6-ти час (G); без дизоксарил в поддържащата среда (H);

**Секвенционен анализ на гена кодиращ белтъка VP1 на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1:** При всички ДНК фрагменти от резистентните и зависимия към дизоксарил мутанти бе наблюдавана една постоянна особеност при сравняване с референтната последователност и тази от изходния дизоксарил-чувствителен щам СохВ1 (dis-s/FL), а именно делеция на тройка нуклеотиди (TTG)/инсерция на тройка нуклеотиди (TTT) с едно и също взаимно разположение (ntt 2749-2751 от M16560/ins TTTnt. 2769 от M16560). Проведен бе и паралелен съпоставителен секвенционен анализ между фрагментите от дизоксарилите мутанти, означени съответно като VP1-(dis-s/FL)-809, VP1-(dis-r30 $\mu$ M/FL), VP1-(dis-r25mg/kg/m) и VP1-(dis-d30 $\mu$ M/FL) при използване на консенсусните секвенции. Идентичността между последователностите може да се резюмира в следната фигура:



Фигура 7. Схематично представяне на идентичността между изследваните мутанти на вирус Коксаки В1

## ОБСЪЖДАНЕ

Ефектът на лечебния курс с дизоксарил въведен подкожно в 12 дневен курс, бе много добре проявен при изследване на вирусното съдържание в таргетния орган (мозъка) на инфектираните с вирус Коксаки В1 новородени мишки. В първите пет дена след вирусната инокулация съдържанието на инфекциозен вирус в пробите от групата мишки, третирани с дизоксарил бе 2.0-2.7 lg CCID<sub>50</sub> по-ниско в сравнение с групата плацебо. От 8-ия ден бе установено значително покачване на вирусното съдържание в мозъчните проби от животни, третирани с дизоксарил.

По-нататъшните ни изследвания показаха, че този феномен се дължи на развитието на дизоксарил-резистентна популация в мозъка на мишките в хода на експерименталната инфекция. Вирусната популация в мозъчните изолати от групата мишки, третирани с дизоксарил, взети след 7-ия ден от вирусната инокулация показва значително намаляване на чувствителността си спрямо дизоксарил в сравнение с контролната група. Минималната инхибираща концентрация на дизоксарила (MIC<sub>50</sub>) в плако-инхибиращ тест достигна >40 µM при третираните животни в сравнение с мозъчните изолати от контролната група, където минималната инхибираща концентрация на дизоксарила бе 0.52-1.37 µM, резултат доказващ развитието на дизоксарил-резистентна на вирус Коксаки В1 популация в инфектираните животни в хода на 12 дневен курс на лечение с дизоксарил. В литературата досега няма данни за развитието на резистентност *in vivo* спрямо капсидните инхибитори - WIN съединенията.

За първи път ние изолирахме зависим към WIN-съединение мутант на ентеровирусите, а именно вирус Коксаки В1 към дизоксарил. Този мутант беше получен след 9 пассажа на резистентния мутант в клетъчна култура FL в присъствие 30 µM дизоксарил. В постановка на едностъпен репликативен цикъл, титърът на дизоксарил-зависимия мутант беше 8 log<sub>10</sub>CCID<sub>50</sub> по-висок в сравнение с титъра на същия мутант, култивиран в отсъствие на дизоксарил в поддържащата среда.

При опитите за реверсия на резистентността на мутантите на вирус Коксаки В1, изолирани в клетъчни култури и новородени мишки, и на зависимостта към дизоксарил на мутанта, изолиран в клетъчни култури, бе установено, че на 6-ия пасаж в клетъчни култури Cox (dis-r30µM/FL) мутанти губят резистентността спрямо дизоксарил, докато при резистентният мутант Cox (dis-r25mg/kg/m), изолиран от мозъци на мишки, реверсия бе установена на 8-9-ия пасаж в клетъчни култури. При зависимия мутант Cox (dis-d30µM/FL), реверсия към резистентност настъпва едва на 10-ия пасаж

Изходният еталонен щам на вирус Коксаки В1, дизоксарил-резистентен, изолиран в клетъчни култури, дизоксарил-резистентен мутант, изолиран в новородени мишки и дизоксарил-зависим мутант, получен в клетъчни култури бяха изследвани за някои класически генетични маркери, а именно: размер и форма на плаките под агар, термочувствителност и патогенност за новородени мишки.

Анализът на генетичните маркери на мутантите е представен и обобщен в таблица 8. Той показва, че промените в чувствителността към дизоксарил корелират с промени в размера и формата на плаките под агар. Дизоксарил-резистентните и дизоксарил-зависимият мутанти формират плаки с по-голям диаметър и с по-неправилна форма в сравнение с плаките на дивия дизоксарил-чувствителен култивиран в клетъчни култури или адаптиран на новородени мишки. Този маркер при тези мутанти е свързан със значително повишаване на термочувствителността.

Значителен интерес представляват данните за термочувствителност. Термочувствителността при 50° С и 54° С на вирионите на дизоксарил-зависимия мутант бе по-близка до тази на дизоксарил-чувствителния мутант, докато дизоксарил-резистентният мутант показва висока термолабилност.

Нашите данни за слабо повишената патогенност за новородени мишки на дизоксарил-резистентния Коксаки В1 мутант заслужават по-специално внимание. Ние установихме, че дизоксарил-резистентните мутанти са с леко повишена патогенност за новородени мишки. При нашите изследвания върху дизоксарил-зависимия мутант на вирус Коксаки В1 бе наблюдаван стоп във вирусната репликация в клетки FL в отсъствие на инхибитора ( $\Delta$  8 log) и около 43-кратно снижение на патогенността за новородени мишки. За сравнение прилагането на дизоксарил върху дивия изходен вирус има видимо по-слабо въздействие върху вирусната репликация *in vitro* и върху патогенността за новородени мишки - 11-кратно снижение. Получените от нас резултати убедително показват, че определянето на панел от генетични маркери на лекарствено резистентни и лекарствено зависими мутанти е особено важно и би следвало да бъде препоръчано като задължително изследване в експерименталната химиотерапия на ентеровирусните инфекции.

Анализът на резултатите от проведеното от нас изследване на кинетиката на ефекта на дизоксарил върху репликацията на получен дизоксарил-зависим мутант на вирус Коксаки В1 (Cox (dis-d30 $\mu$ M/FL) в постановка на едностъпен цикъл показва, че даже късното добавяне на съединението (в хода на експоненциалната фаза – 5-6 час след вирусната инкулация) гарантира пълноценна продукция на инфекциозните вириони в края на едностъпния цикъл – 9-ти час. Не се наблюдават различия във вирусния добив при добавяне на дизоксарил в интервала 0-3-ти час, съответстващ на латентния период, включващ и стадия на разсъбличане на родителските вириони и последващия синтез на вирусни макромолекули (вирусна РНК и протеини).

Тези данни насочват към заключението, че промените в структурата на капсидния белтък VP1 в зависимия мутант не влияят върху процеса на разсъбличане и последващия синтез на вирусна РНК и протеини. Те засягат видимо единствено етапа на сглобяване на зрелите вириони.

Тези данни са в контраст с наблюдавания ефект на дизоксарила върху репликацията на дивия дизоксарил-чувствителен щам при аналогична постановка. В този случай инхибиращият ефект на съединението е силно зависим от момента на добавянето му в хода на латентния период – 0-3-ти час след вирусната инокулация. Тези данни са в унисон с литературните данни, че дизоксарилът блокира вирусното разсъбличане (Smith и съавт., 1986; Zeichhardt и съавт., 1987; Fox и съавт., 1991; Diana и съавт., 1992).

След като бяха определени фенотипните характеристики (класически генетични маркери), следващ етап в нашите проучвания бе да направим секвенционен анализ на дизоксарилите Кокаски В1. Ние секвенирахме целия VP1 белтък на дизоксарилите мутанти, тъй като именно той е мишена на дизоксарила.

Чрез RT-PCR бяха синтезирани ДНК фрагменти, съдържащи пълната последователност на VP1 на всички дизоксарилите мутанти в нашето изследване. От резултатите от проведените секвенционен анализ се доказва, че локусът кодиращ VP1 белтъка на резистентните и зависим мутанти на вирус Коксаки В1 се наблюдава една постоянна особеност – делеция на тройка нуклеотиди и съответно инсерция на тройка нуклеотиди – ТТТ вместо ТТГ (ntt 2749-2751 от M16560/ins ТТТnt. 2769 от M16560). При анализ на идентичността на локусите на VP1 белтъка се установява, че този на изходния щам (VP1-(dis-s/FL) е с най-нисък процент на идентичност при съпоставка с резистентните и зависим мутанти – 91-92 %. Секвенциите на геномния локус, кодиращ VP1 белтъка на VP1-(dis-r30µM/FL), VP1-(dis-r25mg/kg/m) и VP1-(dis-d30µM/FL) показват значително сходство помежду си (95-97 %), показващо максимални стойности (97%) между дизоксарил-резистентния, получен в клетъчни култури и получения от него дизоксарил-зависим мутант. По-ниска е степента на идентичност между дизоксарил-резистентния, изолиран от новородени мишки и дизоксарил-зависим мутанти (95%).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказано е развитието на дизоксарил-резистентна популация в мозъка на мишки при експериментална инфекция с вирус Коксаки В1 (щам Connecticut 5), подложени на лечебен курс с дизоксарил (25 мг/кг дневно s. c.). Изразена резистентност се отчита в мозъчните проби, взети на 7-и-8-и ден след вирусната инокулация, което съвпада с периода на покачване съдържанието на инфекциозен вирус в мозъка и повишаване на леталитета.

Дизоксарил-резистентен мутант се получава след три пасажа на дизоксарил-чувствителния щам на вирус Коксаки В1 (Connecticut 5) в клетки FL в присъствие на дизоксарил (30 µM).

Девет пасажа на дизоксарил-резистентния мутант [Cox B1 (dis-r30µM /FL] в клетки FL в присъствие на дизоксарил водят до получаване на дизоксарил-зависим мутант [CoxB1 (dis-d30µM/FL)].

Наблюдава се реверсия на получените дизоксарилите мутанти (към чувствителност съотв. към резистентност) в отсъствие на инхибитора на 6-ия пасаж при Cox B1 (dis-r30µM /FL, след 8-9 пасажа при изолирания в мишки Cox B1 (dis-r25mg/kg/m), съотвтно след 10 пасажа при CoxB1 (dis-d30µM/FL).

Проучени бяха фенотипните характеристики (класически генетични маркери) на дизоксарилите мутанти на вирус Коксаки В1.

Установено бе, че размерът на плаките под агар при дизоксарил-резистентните и дизоксарил-зависимия мутант е отчетливо по-голям (признак S+) в сравнение с дизоксарил-чувствителния изходен щам. Резистентните и зависимия мутанти се отличават с неправилна форма на плаките.

При изследване на термочувствителността при 50°C се установява висока термочувствителност на резистентните мутанти в сравнение с изходния дизоксарил-



чувствителен мутант. Зависимият мутант заема междинно място, но е по-близък по този признак до изходния дизоксарил-чувствителен щам. Дизоксарил-резистентният мутант, изолиран от мозъци на мишки е с по-ниска термочувствителност в сравнение с получения в клетъчни култури. Дизоксарил-резистентния мутант показва висока термолабилност при 54°C в сравнение с дизоксарил-чувствителния и дизоксарил-зависим мутанти, чиято термочувствителност при тази температура е еднаква. При 46°C кривите на термоинактивация следват характерен двувълнов ход и се наблюдава почти пълното им съвпадение при чувствителната, резистентната и зависимата популации към дизоксарил на вирус Коксаки В1.

При изследване на патогенността за мишки на дизоксарилите мутанти се установява слабо повишаване на патогенността на дизоксарил-резистентните мутанти в сравнение с изходния дизоксарил-чувствителен мутант. Дизоксарил-зависимият мутант в присъствие на дизоксарил показва еднаква патогенност с изходния щам в отсъствие на дизоксарил и обратно.

Дизоксарил-зависимият мутант показва отчетливо повишена патогенност за мишки (43-кратно) в присъствие на дизоксарил (25 мг/кг дневно) в сравнение с патогенността му в отсъствие на дизоксарил курс.

При изследване кинетиката на ефекта на дизоксарил върху репликацията на дизоксарил-чувствителния щам в клетки FL (продукция на инфекциозни вириони) в постановка на едностъпен цикъл (МОИ = 50) се установява висока чувствителност към инхибитора при ранното му добавяне (първата половина на латентния период). Прилагането на дизоксарил през лаг-фазата и експоненциалната фаза на цикъла е без какъвто и да е ефект. Тези данни показват, че дизоксарилът атакува "ранен" процес във вирусната репликация (етапът на разсъбличане).

Ефектът на дизоксарил върху репликацията на дизоксарил-зависимия мутант в клетки FL при аналогична експериментална постановка показва съществени различия в сравнение с чувствителния изходен щам. Липсата на дизоксарил през латентния период е без ефект върху добива на инфекциозни вириони в края на едностъпния цикъл. Пълно блокиране на вирусната репликация се наблюдава единствено при недобавяне на дизоксарил в продължение на целия едноциклов тест. Прилагането на съединението даже в късните етапи на цикъла (през експоненциалната фаза) гарантира нормална продукция на инфекциозни вириони. Получените резултати показват, че липсата на дизоксарил блокира процеса на зреене (сглобяване на инфекциозни вириони), и не възпрепятства етапа на разсъбличане при дизоксарил-зависимия мутант на вирус Коксаки В1.

При секвенционния анализ на дизоксарилите мутанти се установява промяна в локуса на VP1 в РНК на дизоксарил-резистентните и дизоксарил-зависим мутанти на вирус Коксаки В1 в сравнение с изходния дизоксарил-чувствителен щам – инсерция на ААА вместо ААС (ntt 2749-2751 от изходния див щам/ins ААAnt). При секвенционния анализ се доказва висока степен на идентичност (97%) между частта от генома, кодираща VP1 белтъка между дизоксарил-резистентните мутанти, получени в клетъчни култури и мишки и между дизоксарил-резистентния мутант, получен в клетъчни култури и полученият от него зависим мутант. Тази идентичност е значимо по-ниска (91-92%) при сравняване с изходния дизоксарил-чувствителен мутант.

## ИЗВОДИ

От проведените изследвания могат да се направят следните изводи:

1. Приложението на лечебен курс с пикорнавирусния инхибитор дизоксарил при експериментална инфекция с вирус Коксаки В1 в мишки води до появата на лекарствено резистентна популация в мозъка на мишките.
2. Получен е дизоксарил-зависим мутант на вирус Коксаки В1 в резултат на серийни пасажи на дизоксарил-резистентния мутант в присъствие на дизоксарил.
3. Налице са съществени различия във фенотипните характеристики между дизоксарил-резистентните мутанти на вирус Коксаки В1 (размер и форма на плаките, термочувствителност и патогенност за животни). Резистентните мутанти показват известно повишаване на патогенността за новородени мишки.
4. При използване на постановка на едностъпен репликативен цикъл бе установено, че дизоксарилът инхибира ранните етапи (разсъбличането) на дизоксарил-чувствителния мутант, а при дизоксарил-зависимия мутант неговата липса блокира процеса на сглобяване на инфекциозните вириони и е без ефект върху етапа на разсъбличане.
5. При секвенционния анализ на РНК на дизоксарил-резистентните мутанти бе установена промяна в локуса на VP1 при резистентните и зависимия мутанти в сравнение с изходния (инсерция на AAA вместо AAC (ntt 2749-2751 от изходния див щам/ins AAAnt)). При резистентните и зависимия мутанти бе доказана висока степен на идентичност по отношение на частта от генома, кодираща белтъка VP1, и рязко по-ниска степен в сравнение с изходния дизоксарил-чувствителен лабораторен щам.

## ПРИНОСИ

В резултат на извършената работа са направени следните приноси с оригинален характер (описани за първи път в литературата):

1. Доказано е развитието на резистентна ентеровирусна популация към химиотерапевтик в мозъка на експериментални животни, заразени с вирус Коксаки В1 и подложени на лечебен курс с WIN съединение (дизоксарил). Това обяснява умерения лечебен ефект на WIN съединението *in vivo*.
2. Получен е зависим към WIN съединение (дизоксарил) мутант на модел ентеровирус (вирус Коксаки В1).
3. Изследвана е реверсията при лекарствените мутанти, резистентни и зависими към WIN съединение (дизоксарил) на модел ентеровирус (вирус Коксаки В1).
4. Изследвани са генетичните маркери при резистентните и зависима към WIN съединение (дизоксарил) ентеровирусна популация (размер и форма на плаките, термочувствителност и патогенност за животни).
5. Разработен е комплекс от генетически маркери, предложен като изискване при изследване на ентеровирусни инхибитори.

6. Получени са данни върху механизма на действие на дизоксарила върху репликацията на дизоксарил-зависимия мутант на вирус Коксаки В1 – инхибиране на процеса на сглобяване на инфекциозните вириони.
7. Извършен е молекулярно-генетичен анализ (секвенционен анализ) на геномния участък, кодиращ VP1 на дизоксариловите мутанти на вирус Коксаки В1.

## НАУЧНИ ТРУДОВЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

### I. ПУБЛИКАЦИИ:

1. Nikolova, I., Galabov, A. S. (2002): The Virus Mutants Resistant to Chemotherapeutics – A Main Problem in the Treatment of Viral Infections. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 16/ 2002/2, 65-71.
2. Nikolova, I., Galabov, A. S. (2003): Development of resistance to disoxaril in *Coxsackievirus B1* infected newborn mice. *Antiviral Res.* 60, p. 35-40.
3. Nikolova, I., Galabov, A. S. (2002): Isolation of Disoxaril-Dependent Mutant of *Coxsackievirus B1*. Proceed Tenth Congress of the Bulgarian Microbiologists, Plovdiv, Oct 9-12, 2002 (in press).

### II. НАУЧНИ ДОКЛАДИ:

1. Nikolova, I., Galabov, A. S. (2000): Development of Resistance to Disoxaril in *Coxsackievirus B1* Infected Newborn Mice. 13<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Baltimore, Maryland, USA, April 16-21, 2000.
2. НИКОЛОВА, И., Гълъбов, А. С. (2001): Вирусните мутанти, резистентни към химиотерапевтици – основен проблем при вирусните инфекции. Кръгла маса “Генетиката и предизвикателствата на XXI век”, Пловдив, България, 9 Ноември, 2001.
3. Nikolova, I., Galabov, A. S. (2002): Comparative Study on Some Genetic Markers of Disoxaril-Resistant and Disoxaril-Sensitive Mutants of the *Coxsackievirus B1*. 15<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Prague, Czech Republic, March 17-21, 2002.
4. Nikolova, I., Galabov, A. S. (2003): Isolation of Disoxaril-Dependent Mutant of *Coxsackievirus B1*. 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Savannah, Georgia, USA, April 27- May 1, 2003.
5. Galabov, A. S., Nikolova, I., Nikolaeva, L. (2003): Antiviral Drugs and Drug Combinations. In Proc. & Abstr. Book (M. Uzun, Z. Erturan, Ö. Ang, Eds) of Microbiologia Balkanica 2003 (3<sup>rd</sup> Balkan Conference of Microbiology, Istanbul, Sept. 4-6, 2003), p. 183.
6. Galabov, A. S., Nikolova, I. (2003): Disoxaril-dependent mutant of *Coxsackievirus B1*. 5<sup>th</sup> European Congress of Chemotherapy and Infection, Rhodes Island (Greece), Oct. 17-20, 2003.

