

ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОВИРУСА D68 НА ЦИКЛ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА.

В данном обзоре статьи мы изучили влияние статуса клеточного цикла на репликацию вируса EV-D68, а также влияние вируса EV-D68 на цикл клетки-хозяина. Данные показывают, что репликация EV-D68 неразрывно связана с циклом клетки-хозяина, хотя схема регуляции существенно отличается от таковой у EV-A71. Эти результаты еще больше расширяют понимание патогенных механизмов энтеровирусов и предоставляют потенциальную цель для лечения и профилактики заболеваний, связанных с энтеровирусами.

Ключевые слова: энтеровирус 68 (EV-D68), клеточный цикл, остановка G0/G1, репликация вируса, взаимодействие хозяина и патогенна

Jamalova F.A.

Mallahodjaev A.A. (student)

Department of Microbiology, Virology and Immunology
Samarkand State Medical University

THE EFFECT OF ENTEROVIRUS D68 ON THE HOST CELL CYCLE.

In this study, we examined the effect of cell cycle status on EV-D68 virus replication, as well as the effect of EV-D68 on the host cell cycle. Our data show that EV-D68 replication is inextricably linked to the host cell cycle, although the regulatory pattern is significantly different from that of EV-A71. These results further expand our understanding of the pathogenic mechanisms of enteroviruses and provide a potential target for the treatment and prevention of enterovirus-associated diseases.

Keywords: enterovirus 68 (EV-D68), cell cycle, G0/G1 arrest, virus replication, host-pathogen interactions

Введение. Человеческий энтеровирус 68 (EV-D68) — это новый патоген, который может вызывать тяжелые респираторные заболевания и связан со случаями паралича, особенно среди детей. Впервые он был выделен из образцов, полученных в Калифорнии от четырех детей с пневмонией и

бронхиолито [1]. За последние 10 лет вспышки инфекции EV-D68 были зарегистрированы в Италии, США, Германии, Китае и ряде других стран, с рекордным числом подтвержденных случаев в 2014 году [2]. К сожалению, в настоящее время не существует вакцин для профилактики и лекарств для лечения будущих вспышек, в основном из-за того, что информация о факторах хозяина, необходимых для репликации EV-D68, скудна [3]. EV-D68 принадлежит к энтеровирусам (семейство *Picornaviridae*, род *Enterovirus*), которые представляют собой безоболочечные вирусы с положительной одноцепочечной РНК длиной около 7500 нуклеотидов и содержат большую открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин, который расщепляется с образованием соответствующих вирусных белков [4]. На основании молекулярных и биологических характеристик четыре вида энтеровирусов человека (HEV) в настоящее время обозначаются как HEV-A, -B, -C и -D. В качестве особенности своего патогенного механизма многие вирусы облегчают свою собственную репликацию, взаимодействуя с факторами хозяина, которые регулируют прогрессию клеточного цикла [5]. Примеры можно обнаружить у ДНК-вирусов, ретровирусов и РНК-вирусов. ДНК-вирусы, которые реплицируются в ядре, были тщательно исследованы с точки зрения контроля клеточного цикла клеток-хозяев [6]. Например, некоторые небольшие ДНК-вирусы, включая обезьяний вирус 40, аденовирус и вирус папилломы человека, у которых отсутствуют собственные полимеразы, используют полимеразу хозяина для содействия входу клеток в фазу S из фазы G0/G1. Для других крупных ДНК-вирусов, например, герпесвирусы могут вызывать остановку G0/G1, чтобы избежать конкуренции за ресурсы репликации клеточной ДНК. Регуляция клеточного цикла также наблюдалась для ретровирусов, которые, как и ДНК-вирусы, реплицируются в ядре [8].

Целью данной обзорной статьи является изучение влияния цикла клетки-хозяина на продукцию вируса EV-D68 и способность вируса манипулировать клеточным циклом.

Материалы и методы. Вирусы и клетки Штаммы Fermon (ATCC, VR-1826), US/KY/14-18953 (ATCC, VR-1825D) и US/MO/14-18947 (ATCC, VR-1823D) EV-D68; и штамм Changchun077 EV-A71 были описаны ранее (). Вирусы размножали в клетках рабдомиосаркомы человека RD (№ CCL-136), а супернатанты собирали и хранили при температуре -80°C . Клетки эмбриональной почки человека (клетки HEK 293T) (№ CRL-11268) и клетки RD были приобретены в ATCC (Манассас, Вирджиния, США) и использовались в соответствии с предыдущим исследованием. Клетки содержались в

модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки [7].

Определение титра вируса. Титры вируса определяли путем измерения 50% инфекционной дозы культуры ткани (TCID₅₀) в микротитрационном анализе с использованием клеток RD, как описано. Клетки RD высевали и инкубировали при 37°C в течение 24 ч в 96-луночных планшетах. Супернатант, содержащий вирус, последовательно разбавляли в 10 раз, и добавляли 100 мкл разбавителя вируса на лунку в восьмикратной повторности. До достижения экспериментальной конечной точки цитопатический эффект наблюдали один раз в день. В соответствии с методом Рида-Мюнха вирусные титры TCID₅₀ определялись на основе предположения, что материал с 1×10^5 TCID₅₀/мл будет производить $0,7 \times 10^5$ бляшкообразующих единиц/мл [9].

Инфекция. Клетки были ложно инфицированы или инфицированы EV-D68 или EV-A71 при множественности заражения (MOI) 0,8. После 2 ч адсорбции вируса клетки были промыты фосфатно-солевым буфером (PBS) один раз, затем добавлена свежая культуральная среда.

Освобождение клеточного цикла. Субконфлюэнтные культуры клеток RD были синхронизированы в фазе G₀/G₁ путем лишения сыворотки. Примерно 5×10^5 клеток были посеяны в 6-луночный планшет и поддерживались в среде без сыворотки в течение 24 ч. После заражения вирусом EV-D68 добавляли свежий 10% DMEM для высвобождения клеток из G₀/G₁.

Анализ клеточного цикла методом проточной цитометрии. Окрашивание пропидиум-йодидом (PI) использовалось для измерения содержания ядерной ДНК согласно предыдущему исследованию. Сначала клетки собирали и фиксировали 1 мл холодного 70% этанола при 4°C в течение ночи, а затем ресуспендировали в буфере для окрашивания PI (50 мкг/мл PI (Sigma), 20 мкг/мл РНКазы в PBS) в течение 2 ч при 4°C. Для анализа клеток, окрашенных PI, использовали сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACSscan; BD), и для каждого образца подсчитывали не менее 10 000 клеток. Для анализа данных использовали ModFit LT, версия 2.0 [10]

Вестерн-блот-анализ. Клетки, инфицированные вирусом или ложно инфицированные, собирали в разное время после заражения EV-D68 и промывали один раз PBS, как описано ранее (Yu et al.). В анализах вестерн-блоттинга использовались следующие антитела: анти-CDK2 (Cell Signal), анти-циклинE1 (Proteintech), анти-CDK4 (Cell Signal), анти-CDK6 (Cell Signal), анти-циклинD (Cell Signal), анти-CDK1 (Boster), анти-циклинB1 (Santa Cruz) и анти-гистон (GenScript). Вторичные антитела от мыши или кролика были получены от Jackson Immuno Research.

Количественная ПЦР в реальном времени. Вся работа проводилась в выделенной зоне ПЦР-clean, как описано ранее (Yu et al.). РНК была извлечена из инфицированных и неинфицированных клеток с использованием реагента Trizol (Gibco-BRL, Rockville, Md.) и выделена, как указано производителем. РНК была обработана ДНКазой (DNase I-RNase-Free, Ambion) для удаления любой загрязняющей ДНК; 200 нг общей РНК были подвергнуты обратной транскрипции с использованием олиго-dT-праймеров с использованием набора High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) в 20 мкл реакции кДНК, как указано производителем. Для количественной ПЦР матрица кДНК была добавлена в 20 мкл реакции с SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) и 0,2 мкМ праймера. Амплификацию проводили с использованием ABI Prism 7000 в течение 40 циклов при следующих условиях: начальная денатурация при 95°C в течение 10 мин; 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин. Кратность изменений рассчитывали относительно GAPDH с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Иммуноферментный анализ. Клеточные лизаты были исследованы на CDK4, CDK6, cyclinD1, CDK2, cyclinE1, CDK1, cyclinB1 и гистон с помощью наборов ELISA (Meiyan, Шанхай, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Микропланшет был количественно определен с помощью микропланшетного ридера (Bio-Rad, Hercules, CA, США). Экспрессия целевого белка была нормализована по экспрессии гистона [11].

Результаты и их обсуждение. Энтеровирус 68 (EV-D68) обычно вызывает легкие или тяжелые респираторные заболевания, включая насморк, чихание, кашель, боли в теле и мышцах, хрипы, затрудненное дыхание, а в случаях некоторых младенцев, детей и подростков — смерть. Хотя EV-D68 был впервые выявлен в Калифорнии в 1962 году, число людей в одной вспышке в 2014 году с подтвержденной инфекцией EV-D68 было намного больше, чем число, зарегистрированное в предыдущие годы. Трудно предсказать, появится ли EV-D68 снова в будущих вспышках, но ценность разрешения патогенного механизма EV-D68 очевидна [12]. В этом исследовании изучили патогенный механизм EV-D68, чтобы выявить связь между вирусной инфекцией и циклом клеток-хозяев. Чтобы оценить возможность того, что статус клеточного цикла влияет на репликацию вируса EV-D68, сначала синхронизировали клетки в G0/G1. Результаты показывают, что арест G0/G1 способствует репликации EV-D68 и увеличивает вирусную вирулентность, не влияя на проникновение вируса. Также оценили влияние синхронизации фазы S и фазы G2/M на вирусную продукцию [13]. Результаты показывают, что синхронизация фазы S не влияет на проникновение, репликацию или продукцию вируса по сравнению

с контрольной обработкой, в то время как синхронизация G2/M подавляет вирусную репликацию и снижает вирусную вирулентность, но не влияет на проникновение вируса. Эти результаты показывают, что фаза G0/G1 наиболее благоприятна для репликации EV-D68, что фаза S может поддерживать некоторую вирусную продукцию, и что фаза G2/M является ингибирующей для вирусной продукции хозяина [7].

Учитывая, что фаза G0/G1 поддерживает продукцию EV-D68, вирусу было бы выгодно манипулировать циклом клеток-хозяев для увеличения вирусной продукции. Действительно, штамм EV-D68 Fermon продемонстрировал значительную способность увеличивать процент клеток в фазе G0/G1. Штамм EV-D68 Fermon был выделен в Соединенных Штатах в 1962 году, но циркулирующие в настоящее время штаммы, включая EV-D68 US/MO/14-18947 и US/KY/14-18953, могут быть более актуальны для текущего здоровья человека [6,9]. Поэтому исследовали, обладают ли эти два циркулирующих в настоящее время штамма схожей способностью манипулировать клеточным циклом. Результаты подтвердили, что циркулирующие штаммы EV-D68 манипулируют клеточным циклом таким же образом, как и штамм Fermon, хотя текущие штаммы имеют более высокую вирулентность, чем Fermon. Таким образом, после более чем 50 лет эволюции EV-D68 по-прежнему обладает способностью останавливать клетки в фазе G0/G1, но вирулентность EV-D68 возросла [15].

Заключение. Основной целью анализа механизма патогенеза EV-D68 было выявление новых стратегий профилактики и лечения заболевания, поэтому провели дополнительные эксперименты для дальнейшего изучения синхронизации G2/M как подхода к подавлению репликации различных штаммов EV-D68. Результаты показывают, что в дополнение к его воздействию на штамм EV-D68 Fermon, синхронизация G2/M нокодазолом подавляла репликацию и вирулентность US/KY/14-18953 и US/MO/14-18947. Кроме того, РАВ, который является другим агентом, который может вызывать остановку G2/M, также значительно подавлял продукцию EV-D68 и EV-A71. Поскольку было показано, что нокодазол также эффективен в подавлении продукции EV-A71, лекарственные средства, вызывающие остановку G2/M, можно рассматривать как общий подход к подавлению различных типов противоянтеровирусной инфекции, что открывает новое направление для разработки противоянтеровирусных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Pons-Salort M, Oberste MS, Pallansch MA, et al: The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(12):3078-3083. doi:10.1073/pnas.1721159115
2. Одилова Г. М., Муратова З. Т. КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ // Экономика и социум. 2024. №4-2 (119). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kliniko-patogeneticheskie-aspekty-allergicheskikh-reaktsiy-u-bolnyh>.
3. Одилова Г. М. Changes in the Properties of Enterococci in Intestinal Infections in Children //world of Medicine: Journal of Biomedical Sciences. – 2024. – Т. 1. – №. 9. – С. 56-60.
4. Одилова Г. М. УСЛОВНО ПАТОГЕННЫЕ КИШЕЧНЫЕ БАКТЕРИИ ПРИ ПИЩЕВЫХ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯХ НЕУСТАНОВЛЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ //INDEXING. – 2024. – Т. 1. – №. 1. – С. 36-42.
5. Одилова Г. М. ЭПИДЕМИК АҲАМИЯТГА ЭГА БЎЛГАН МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ АНТИСЕПТИКЛАР ВА ДЕЗИНФЕКЦИЯЛОВЧИ ВОСИТАЛАРГА ЧИДАМЛИЛИГИНИ БАҲОЛАШ // Экономика и социум. 2024. №10-2 (125). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidematik-a-amiyatga-ega-b-lgan-mikroorganizmlarni-antiseptiklar-va-dezinfektsiyalovchi-vositalarga-chidamliligini-ba-olash>.
6. Abdusalomovna J. F., Giyosovna S. D. ENDOFIT MIKROORGANIZMLARNING ISTIQBOLLI YONALISHLARI VA ANAMIYATI //Ta'lim innovatsiyasi va integratsiyasi. – 2024. – Т. 17. – №. 2. – С. 197-202.
7. Vahidova Adolat Mamatkulovna, Oripova Pokiza Olimovna, Jalalova Feruza Abdusalomovna, Bobokandova Mekhriniso Fazliddinovna, & Shomurodovna Gulistan Togaimurodovna. (2021). CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF PNEUMOCOCCAL MENINGITIS IN ADULTS. *European Scholar Journal*, 2(6), 173-176. Retrieved from <https://scholarzest.com/index.php/esj/article/view/985>
8. Sul'tonovich B. K. et al. COMPARATIVE ANALIZ FAUNA PHYTONEMATODES OF WATERMELON VARIETY MARBLE OF SAMARKAND REGION //Intent Research Scientific Journal. – 2023. – Т. 2. – №. 4. – С. 1-12.
9. Sul'tonovich B. K. et al. COMPARATIVE ANALIZ FAUNA PHYTONEMATODES OF WATERMELON VARIETY MARBLE OF SAMARKAND REGION //Intent Research Scientific Journal. – 2023. – Т. 2. – №. 4. – С. 1-12.

10. Mamarasulova N.I. JARROHLIK BO'LIMIDAGI TIBBIY XODIMLARIDAN AJRATILGAN STAFILOKOKKLARNING TARQALISHI VA BIOLOGIK XUSUSIYATLARI // Экономика и социум. 2024. №1 (116). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/jarrohlik-bo-limidagi-tibbiy-xodimlaridan-ajratilgan-stafilokokklarning-tarqalishi-va-biologik-xususiyatlari> (дата обращения: 17.01.2025).
11. Давлятова М. А. и др. ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В АКУШЕРСТВЕ И ГИНЕКОЛОГИИ // Евразийский журнал медицинских и естественных наук. – 2023. – Т. 3. – №. 2 Part 2. – С. 26-35.
12. Раджабов Н. Р., Болтаев К. С. Представление многообразия решений и исследование краевых задач типа Коши–Дирихле для одного класса уравнений смешанного типа с сингулярной линией // Дифференциальные уравнения. – 1986. – Т. 22. – №. 8. – С. 1451-1452.
13. Болтаев К. С., Одилова Г. М. ВЗАИМОДЕЙСТВИИ R-ЭПИСОМНЫХ ФАКТОРОВ С ХРОМОСОМНЫМИ ГЕНАМИ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ У КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК И ШИГЕЛЛ ЗОННЕ // Экономика и социум. – 2024. – №. 2-1 (117). – С. 922-926.
14. Одилова Г. М., Амонова Ш. Л., Аввазов А. ВЫСЕВАЕМОСТИ И СВОЙСТВА КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК У ДЕТЕЙ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ КИШЕЧНЫХ РАССТРОЙСТВ И ПОЛЕ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ // SCHOLAR. – 2024. – Т. 2. – №. 6. – С. 38-44.
15. Одилова Г. М., Шодиева Д. Г., Амонова Ш. Л. О МУТАЦИЯХ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ РОДА КАНДИДА // Экономика и социум. – 2024. – №. 1 (116). – С. 1179-1182.