

Жамалова Ф.А.

Маллаходжаев А.А. (студент)

*Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Самаркандский государственный медицинский университет*

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.

Mallaxodjaev 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 (FACScan; 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.