

УДК 578.832.1 – 51.76

DOI: 10.15587/2519-8025.2018.153462

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ ГЕНІВ HA, NA ТА NP ВІРУСУ ПТАШИНОГО ГРИПУ А (УПОРІВНЯННІ ШТАМІВ H1N1 ТА H7N9)

© С. В. Буряченко

Мета. У зв'язку з високою антигенною мінливістю та властивістю до реасортації генів вірусу грипу типу А провести аналіз варіабельності генетичних маркерів двох різних антигенних підтипів штамів вірусу грипу А H1N1 та H7N9 виділених від різних хазяїв (людини та птиці).

Матеріали та методи. Послідовності нуклеотидів для аналізу були взяті з бази даних (NCBI). За допомогою програми кластерного аналізу MEGA6 та обрахування генетичних дистанцій за алгоритмом ClustalW кодуєвих послідовностей нуклеотидів генів HA, NA та NP-білку, були проведені визначення на вибірці штамів грипу А. Визначення однонуклеотидних замін у позиціях за наявності мутацій проводили за допомогою програми Flusurver. Побудову дендрограм здійснювали парногруповим методом кластеризації UPGM, достовірність обраховували за допомогою бут-стреп аналізу. Варіабельність генів нейромінідази, гемаглютиніна та нуклеопротеїду визначали шляхом локального вирівнювання послідовностей за алгоритмом Сміта – Уотермана програми VectorNTI-11.

Результати. Були сформовані консенсусні послідовності (КП) для HA, NA та NP- генів; знайдені загальні консервативні ділянки (мотиви). Виконаний аналіз вірусних нуклеїнових кислот на варіабельність генетичних маркерів вірусу пташиного грипу HA, NA та NP, що кодують фактори вірулентності у субтипів H1N1 та H7N9 показав генетичну мінливість (варіабельність) генів гемаглютиніну та нейромінідази. Вибірка послідовностей генів показала, що гени HA вірусу пташиного грипу мають більший міжштамовий поліморфізм, ніж гени NA та NP-білку. Генетичними маркерами високої варіабельності є гени гемаглютиніну субтипу H1N1 та гени NA у субтипа H7N9.

Висновки. У статті аналізуються структурні особливості генів поверхневих білків та нуклеопротеїду вірусів грипу А H1N1 та АH7N9. Визначена степінь синонімічності нуклеотидних замін. Встановлен зв'язок розподілу нуклеотидного поліморфізму та показників синонімічних та несинонімічних замін. Висока варіабельність гену HA, та децю менша – NA, обумовлює здатність вірусу пташиного грипу, зокрема його високовірулентного штаму H1N1 та менш вірулентного H7N9, долати міжвидовий бар'єр, тоді як фактор реплікації, що кодується геном NP, має менше значення для подолання міжвидового бар'єру, що обумовлює його нижчу, порівняно з HA та NA, варіабельність

Ключові слова: пташиний грип А, H1N1, H7N9, варіабельність генів, гемаглютенін, нейромінідаза, нуклеопротеїн

1. Вступ

Вірус *Influenzavirus A* (родина *Orthomyxoviridae*) є збудником пташиного грипу— гострого високо контагіозного захворювання респіраторного та шлунково-кишківникового тракту [1]. Згідно поліморфізму нуклеотидних та амінокислотних послідовностей пташиного грипу поділяється на три типи — А, В та С. Найбільш розповсюдженим зоонозним агентом є вірус типу А, який здатен долати міжвидовий бар'єр і уражувати птахів та ссавців, зокрема людей [2, 3]. Вірус типу А має найбільшу серед пташиного грипу кількість хазяїв. Такі властивості даного вірусу обумовлені вищою швидкістю його еволюції, ніж у вірусів типу В та С [1, 3].

2. Літературний огляд

Періодично *Influenzavirus A* викликає епізоотії, епідемії та пандемії [3]. За останні роки через масові епізоотії у більш ніж 50 країнах проводився вимушений забій мільйонів голів птахів [4, 5].

Найбільш важливими факторами вірулентності вірусу пташиного грипу є поверхневі протеїни — гемаглютенін (HA, або H) і нейромінідаза (NA або N), та фактор реплікації нуклеопротеїн (NP). Поліморфізм даних генів залишається недостатньо

дослідженим [6]. Пташиний грип А поділяється на підтипи згідно поліморфізму HA та NA. Існують 18 HA (H) та 11 NA (N) підтипів. Епізоотії, здебільшого, обумовлені високовірулентним штамом H1N1 та менш вірулентним H7N9 [7, 8].

3. Мета та задачі дослідження

Метою дослідження було провести аналіз варіабельності генів HA, NA та NP вірусу пташиного грипу, що кодують фактори вірулентності HA, NA та NP, відповідно, на прикладі штамів H1N1 та H7N9.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Проаналізувати приблизно 8 тисяч штамів вірусу грипу типу А підтипів H1N1 та H7N9 виділених від людини та птиці з бази даних National Centre of Biotechnology Information.

2. Визначити вибірку нуклеотидних послідовностей досліджуваних штамів вірусу грипу А субтипів H1N1 та H7N9.

3. Провести кластерний аналіз заміни у кожній позиції багаточислених вирівнювань кодуючи областей нуклеотидних послідовностей досліджуваних генів.

4. Провести аналіз структурної варіабельності окремих доменів генів.

4. Матеріали та методи

Матеріалом досліджень слугували нуклеотидні послідовності генів *HA*, *NA* та *NP* штамів вірусу пташиного грипу H1N1 та H7N9, отримані з Національного центру біотехнологічної інформації (National Centre of Biotechnology Information) [9].

Кластерний аналіз та обрахування генетичних дистанцій послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP* здійснювали за алгоритмом ClustalW за допомогою програми MEGA 6. Для визначення доли синонімічних та несинонімічних замін у кожній позиції багаточислених вирівнювань кодуєчих областей нуклеотидних послідовностей використовували програмне обрахування. Однонуклеотидні заміни визначали за наявності мутацій у генах (за допомогою програми Flusurver). Побудову дендрограми здійснювали за парногруповим методом кластеризації з арифметичним усередненням UPGM (UnweightedPair-GroupMethod), достовірність обраховували за допо-

могою бут-стреп аналізу при числі реплікацій рівному 500 [10, 11]. Достовірним вважали результат, більший за 70 [11].

Варіабельність генів *HA*, *NA* та *NP* досліджували шляхом локального вирівнювання добраних послідовностей за алгоритмом Сміта-Уотермана за допомогою програми VectorNTI-11 [12]. Поліморфні локуси визначали на найдовших нуклеотидних послідовностях відповідних генів.

5. Результати та обговорення

Результати кластерного аналізу добраних послідовностей наведено на рис. 1–3. Числа на вузлах – показник бут-стреп аналізу. По осі X – довжина гілок (заміни на позицію).

За результатом кластерного аналізу послідовності гену *HA* штамів H1N1 та H7N9, утворюють окремі кластери, що свідчить про високий рівень поліморфізму даного гену (рис. 1).

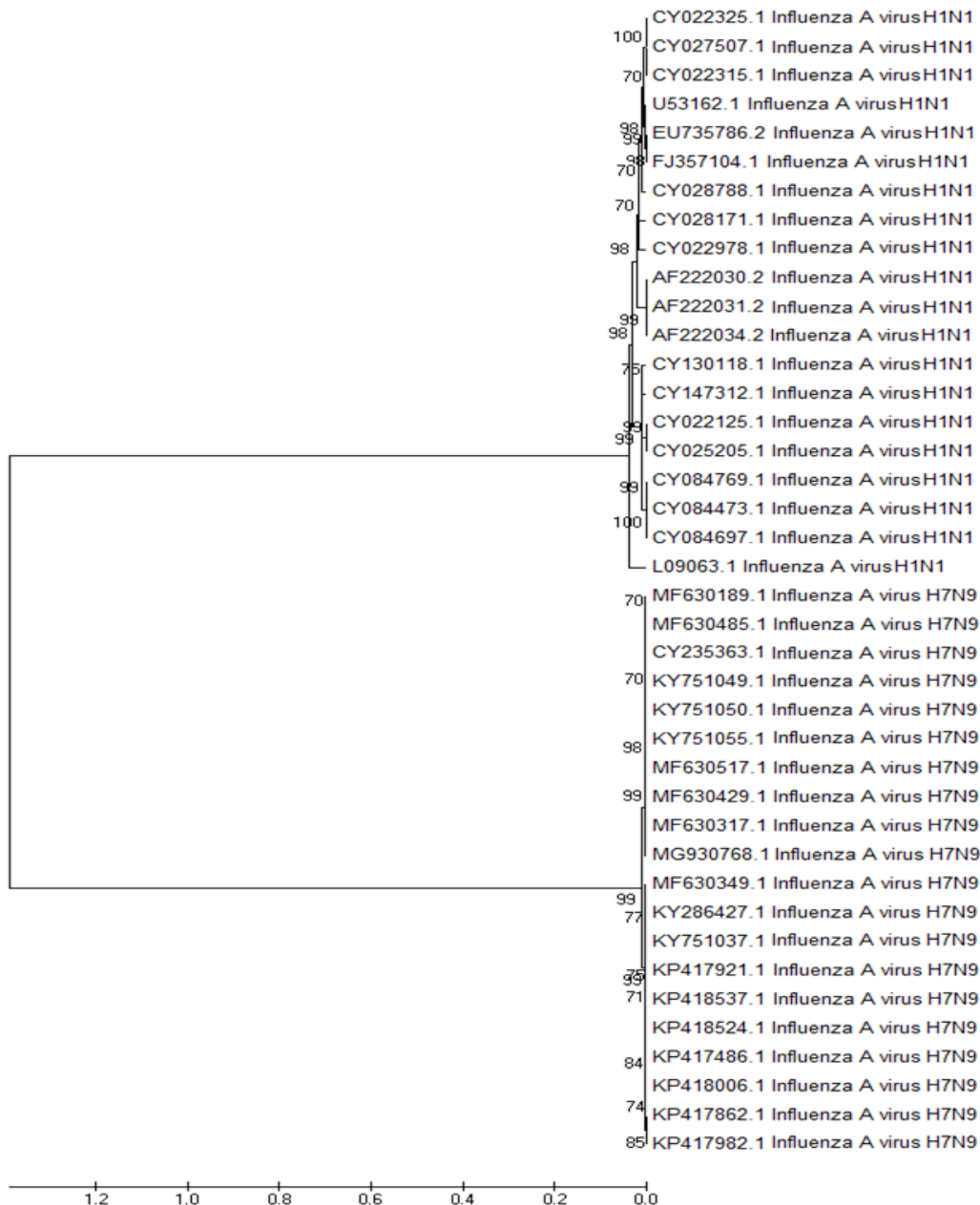


Рис. 1. UPGM - дендрограма, побудована за результатом кластерного аналізу послідовностей гену *HA* штамів вірусу пташиного грипу H1N1 та H7N9

Послідовності гену *NA* штаму H7N9 утворюють окремий кластер, а також спільний кластер з послідовностями штаму H1N1 (рис. 2).

На рис. 2. показано, що нуклеотидні послідовності гену *HA* штаму H1N1 є генетично ідентичними. Частина нуклеотидних послідовностей гену *NA* шта-

му H7N9 утворює окремий кластер, інша частина утворює спільний кластер з нуклеотидними послідовностями гену *NA* штаму H1N1.

Послідовності гену *NP* штаму H1N1 утворюють окремий кластер, а також спільний кластер з послідовностями штаму H7N9 (рис. 3).

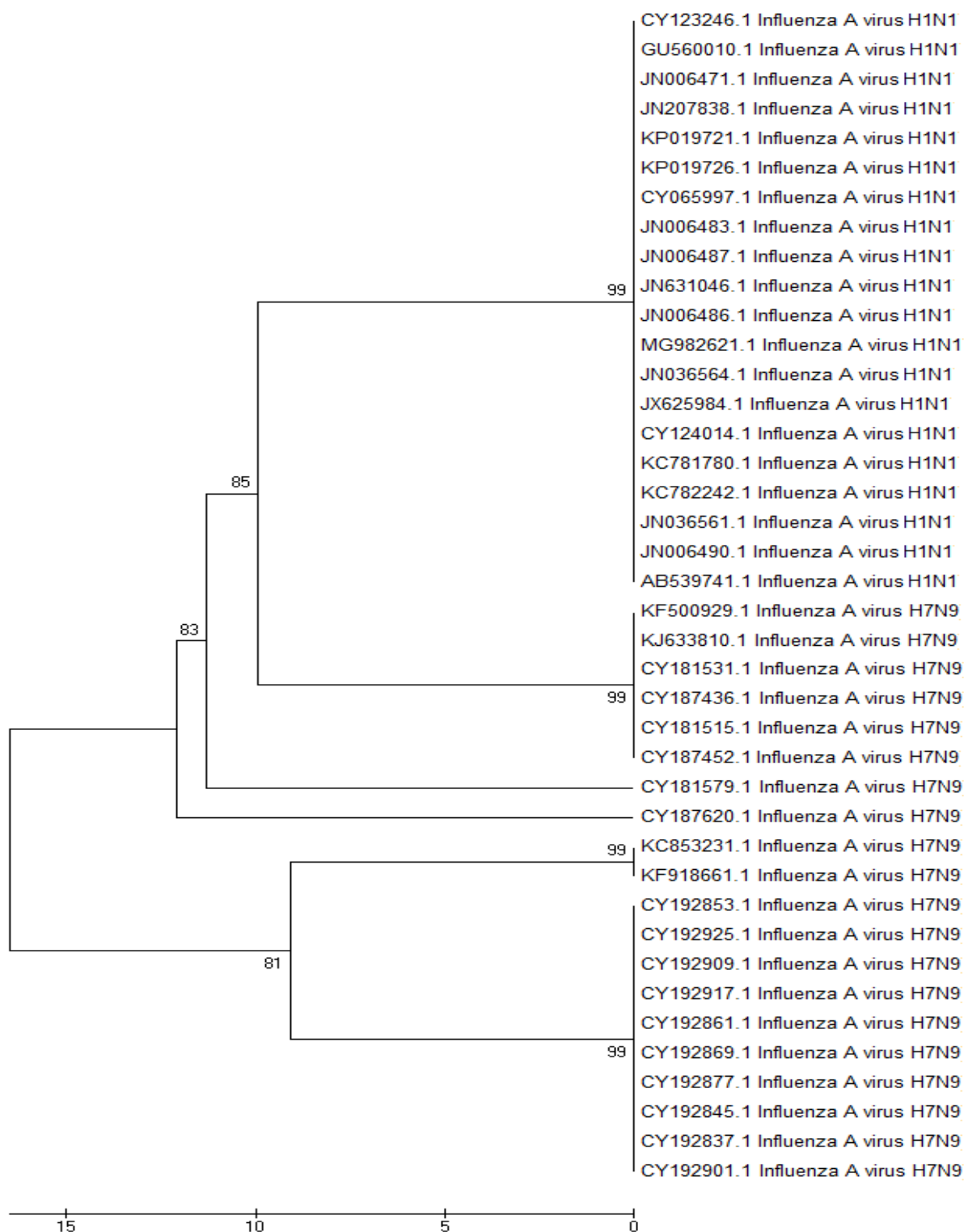


Рис. 2. UPGM-дендрограма, побудована за результатом кластерного аналізу послідовностей гену *NA* штамів вірусу пташиного грипу H1N1 та H7N9

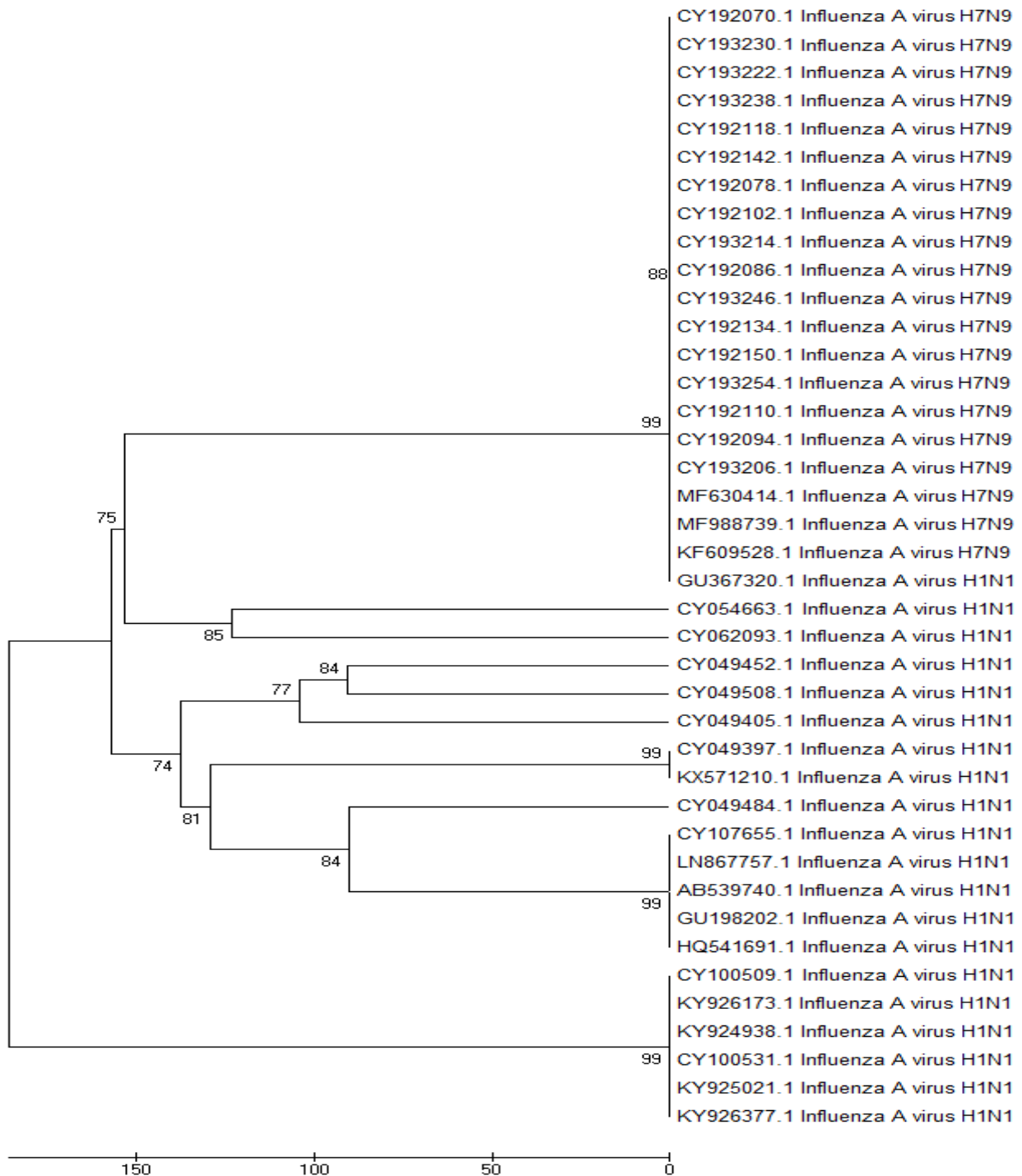


Рис. 3. UPGM-дендрограма, побудована за результатом кластерного аналізу послідовностей генів NP штамів вірусу пташиного грипу H1N1 та H7N9

Згідно рис. 3. нуклеотидні послідовності гену NP штаму H7N9 та частина нуклеотидних послідовностей штаму H1N1 є генетично ідентичними. Частина нуклеотидних послідовностей гену NP штаму H1N1 утворює окремий кластер, інша частина утворює спільний кластер з нуклеотидними послідовностями гену NA штаму H7N9.

Таким чином, показано, що ген HA вірусу пташиного грипу має більший міжштамовий поліморфізм, ніж гени NA та NP. Поліморфізм гену

HA є вищим у штаму вірусу пташиного грипу H1N1, гену NA – у H7N9, гену NP – у H1N1. Показник бутстреп аналізу у всіх випадках є більшим за 70, що вказує на достовірність результатів.

Результати дослідження варіабельності генів HA, NA та NP наведені у табл. 1.

Згідно результатів вирівнювання, найбільш варіабельним геном є HA, найменш варіабельним – NP, що співпадає з результатом кластерного аналізу.

Таблиця 1

Варіабельність генів *HA*, *NA* та *NP* вірусу пташиного грипу на прикладі штамів H1N1 та H7N9

Ген	Нуклеотидна послідовність	Ділянка гену (позиція нуклеотида 3'–5')	Тип поліморфізму
HA	U53162.1	41-43, 128-129, 191-192, 1068-1070, 1668-1670, 1718	Інсерція
		116-117, 220-223, 241, 295-297, 342-344, 399-400, 405-407, 413-416, 449-450, 459, 515, 560-563, 878-879, 912, 1612-1617, 1701, 1752-1796	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності ¹	Однонуклеотидна заміна
NA	CY123246.1	1-20, 146-148, 161-162, 241, 791, 934, 973-974, 1022-1025, 1043-1044, 1053, 1183, 1368, 1385, 1401, 1435, 1461-1480	Делеція
		110, 183, 195-196, 210-212, 222-227, 276, 292-297, 782, 1204, 1267-1268, 1281-1284	Інсерція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності ²	Однонуклеотидна заміна
NP	CY100531	1-45, 1543-1565	Делеція
		Рівномірно вздовж всієї послідовності ³	Однонуклеотидна заміна

Примітка:¹ відсоток нуклеотидних послідовностей, що мають однонуклеотидні заміни – 15.3 %; ² ----- – 8.6 %; ³ ----- – 4.3 %

У всіх випадках найбільш розповсюдженим поліморфізмом є однонуклеотидні заміни, а найбільш поліморфні ділянки розташовуються на 3' та 5' кінцях послідовностей.

Вірогідно, висока варіабельність гену *HA*, та дещо менша – *NA*, обумовлює здатність вірусу пташиного грипу, зокрема його високовірулентного штаму H1N1 та менш вірулентного H7N9, долати міжвидовий бар'єр, тоді як фактор реплікації, що кодується геном *NP*, має менше значення для подолання міжвидового бар'єру, що обумовлює його нижчу, порівняно з *HA* та *NA*, варіабельність.

6. Висновки

1. Визначили вибірку нуклеотидних послідовностей генетичних маркерів *HA*, *NA* та *NP* вірусу пташиного грипу типу А субтипів H1N1 та H7N9.

2. Показані заміни у кожній позиції вирівнювань кодуємих областей нуклеотидних послідовностей досліджуваних генів у порівнянні штамів H1N1 та H7N9.

3. По сукупності отриманих даних аналізу варіабельності структурні ділянки нуклеотидних послідовностей досліджуваних генів *HA*, *NA* є найбільш структурно та еволюційно нестабільними всередині та між штамми H1N1 та H7N9. Результати дослідження можуть бути використанні при дослідженні філогенії та молекулярної еволюції даних генів.

4. Результати вирівнювання співпадають з даними кластерного аналізу нуклеотидних послідовностей генів *HA*, *NA* та *NP*. Визначено поліморфні ділянки та тип поліморфізму досліджуваних генів.

Література

1. Taubenberger J. K., Kash J. C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation // Cell Host & Microbe. 2010. Vol. 7, Issue 6. P. 440–451. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
2. Ozawa M., Kawaoka Y. Cross Talk Between Animal and Human Influenza Viruses // Annual Review of Animal Biosciences. 2013. Vol. 1, Issue 1. P. 21–42. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103733>
3. Evolution and ecology of influenza A viruses / Webster R. G. et. al. // Microbiol Rev. 1992. Vol. 56, Issue 1. P. 152–179.
4. Brockwell-Staats C., Webster R. G., Webby R. J. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1) // Influenza and Other Respiratory Viruses. 2009. Vol. 3, Issue 5. P. 207–213. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00096.x>
5. Cyclic Avian Mass Mortality in the Northeastern United States Is Associated with a Novel Orthomyxovirus / Allison A. B. et. al. // Journal of Virology. 2014. Vol. 89, Issue 2. P. 1389–1403. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.02019-14>
6. Study of immunogenicity of recombinant proteins based on hemagglutinin and neuraminidase conservative epitopes of Influenza A virus / Dukhovlinov I. et. al. // Medical Science Monitor Basic Research. 2013. Vol. 19. P. 221–227. doi: <https://doi.org/10.12659/msmbr.884002>
7. Influenza A surface glycosylation and vaccine design / Wu C.-Y. et. al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. Vol. 114, Issue 2. P. 280–285. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1617174114>
8. Emergence of Avian Influenza Viruses with Enhanced Transcription Activity by a Single Amino Acid Substitution in the Nucleoprotein during Replication in Chicken Brains / Tada T. et. al. // Journal of Virology. 2011. Vol. 85, Issue 19. P. 10354–10363. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.00605-11>
9. Sha B., Luo M. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1 // Nature Structural Biology. 1997. Vol. 4, Issue 3. P. 239–244. doi: <https://doi.org/10.1038/nsb0397-239>
10. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / Tamura K. et. al. // Molecular Biology and Evolution. 2011. Vol. 28, Issue 10. P. 2731–2739. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

11. Efron B. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife // The Annals of Statistics. 1979. Vol. 7, Issue 1. P. 1–26. doi: <https://doi.org/10.1214/aos/1176344552>

12. Smith T. F., Waterman M. S. Identification of common molecular subsequences // Journal of Molecular Biology. 1981. Vol. 147, Issue 1. P. 195–197. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)

Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Гончаренко М. С.
Дата надходження рукопису 27.11.2018

Буряченко Семен Васильович, аспірант, відділ вивчення інфекційних хвороб птиці, ННЦ Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини, вул. Пушкінська, 83, м. Харків, Україна, 61023
E-mail: semenb837@gmail.com

УДК 597.0/5

DOI: 10.15587/2519-8025.2018.153464

АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЧНОЇ МІНЛИВОСТІ ЛЯЩА (*ABRAMIS BRAMA LINNAEUS, 1758*) ДНІПРОВСЬКО-БУЗЬКОЇ ГИРЛОВОЇ СИСТЕМИ

© К. М. Гейна

Гідробудівництво на річці Дніпро призвело до кардинальних змін іхтіоценозу пригирлових акваторій. В результаті зарегулювання природного стоку була порушена динамічна рівновага між абіотичними та біотичними параметрами середовища існування гідробіонтів всієї Дніпровсько-Бузької гирлової системи.

*Трансформаційні процеси, які тривають до сьогодні, супроводжуються змінами основних структурних характеристик іхтіоценозу, де одним із найбільш цінних представників промислових коропових завжди був лящ - *Abramis brama* Linnaeus, 1758.*

Мета. Провести морфометричний аналіз ляща Дніпровсько-Бузької гирлової системи в сучасних умовах. Порівняти отримані результати з науковими даними за попередні періоди сукцесії екосистеми Дніпровсько-Бузької гирлової системи. Пояснити причини морфологічної мінливості ляща у часі та проаналізувати статевий диморфізм у стаді. *n m t.*

Матеріали та методи. Науково-дослідні роботи виконані у відповідності до загально визначених в практиці іхтіологічних досліджень методик. Морфологічна мінливість визначена за *t*-критерієм Стьюдента (t_d). Для аналізу використані особини ляща з вікових груп п'ятрічок-шістиліток, що дозволило порівняти отримані дані з результатами попередніх досліджень.

Результати. Дослідження меристичних ознак ляща показали, що на теперішній час формули плаців є наступними: D – III 9 (10); A – III 24-26 (27); P – I 16-18; V – II 7-8; C I 19 I, а у бічній лінії нараховується від 53 до 56 лусочок. Отримані результати укладаються в межі аналогічних наукових даних минулого століття.

Встановлено, що найбільш суттєвими зміни пропорцій тіла у ляща в процесі трансформації стоку Дніпра відбуваються за висотою та довжиною спинного плаця ($t_d=7,5-8,7$; $p<0,05$). При цьому відмічено подовження хвостового стебла ($t_d=10,2$; $p<0,05$) та зменшення антеанальної відстані ($t_d=4,0$; $p<0,05$). Доведена наявність статевого диморфізму у стаді. Серед проаналізованих 22 пластичних ознак достовірна різниця виявлена за 13 показниками. У самців, внаслідок більшої рухливості, анальний плавець розташований ближче до риля ($t_d=3,38$; $p<0,05$), гостріша голова ($t_d=3,77$; $p<0,05$) та нижче тіло ($t_d=3,5$; $p<0,05$).

Висновки. Порівняльний аналіз сучасних пластичних ознак ляща Дніпровсько-Бузької гирлової системи вказує на зміни пропорцій тіла. На теперішній час достовірно встановлено, що анальний плавець змістився ближче до переднього кінця тіла ($t_d=4,0$; $p<0,05$), що є наслідком кардинального перерозподілу річкового стоку і зниження швидкості течії. Саме така ситуація призвела до подовження міграційних шляхів ляща Дніпровсько-Бузької гирлової системи та утворення популяції, яка володіє більшою рухливістю

Ключові слова: Дніпровсько-Бузька гирлова система, лящ, меристичні, пластичні ознаки, морфологічна мінливість