

УДК: 043:577.214:578.81

**ЭВОЛЮЦИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ГЕМАГГЛЮТИНИНА И НЕЙРАМИНИДАЗЫ  
ВИРУСА ГРИППА H9N2**И.Л.Гисина<sup>2</sup>, Е.Э.Перский<sup>1</sup>, Н.И.Буланкина<sup>1</sup><sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)<sup>2</sup>Ветеринарный институт Кимрона (Бейт-Даган, Израиль)

Проведено изучение антигенных свойств гемагглютинина и нейраминидазы референтного вируса птичьего гриппа wisconsin-66 и 10 штаммов вируса птичьего гриппа H9N2, выделенных в Израиле во время эпизоотии 2000–2004 гг. Определена первичная структура участков антигенных детерминант в обоих белках этих штаммов. Показано, что в первой половине эпизоотии произошла бурная дифференциальная эволюция вируса H9N2. Она характеризовалась появлением штаммов с антигенными свойствами, близкими к свойствам различных вирусов гриппа, циркулирующих в природе. К концу эпизоотии все эти новые штаммы были вытеснены вирусом с антигенными свойствами «классического» референтного вируса H9N2. Описаны аминокислотные замены в сайтах антигенных детерминант гемагглютинина и нейраминидазы, лежащие в основе этого явления.

Ключевые слова: *вирус гриппа, H9N2, гемагглютинин, нейраминидаза, антигенные детерминанты, эволюция.*

**Введение**

Важнейшей составляющей эволюции вируса гриппа являются структурно-функциональные изменения его поверхностных белков – гемагглютинина (ГА) и нейраминидазы (НА). Эти белки играют особую роль в инфицировании – с их помощью вирус адсорбируется на клетках организма хозяина и проникает в них. Именно против этих белков направлен в основном иммунный ответ инфицируемого организма. Антигенные свойства ГА и НА положены в основу классификации вирусов гриппа.

Изменения первичной структуры антигенных детерминант ГА и НА, даже не очень существенные на первый взгляд, а также различные варианты их сочетаний могут определять вирулентность вируса и способны повлиять на эффективность защиты организма хозяина от инфекции.

В настоящее время, однако, тонкие детали эволюции антигенных свойств вируса гриппа изучены недостаточно полно. В данной работе исследованы особенности изменений антигенных свойств вируса H9N2 в процессе его локальной эволюции во время эпизоотии 2000–2004 гг. в Израиле.

**Материал и методика**

Работа проведена на 10 штаммах вируса гриппа H9N2, вызвавшего в 2000–2004 гг. эпизоотию в птицеводческих хозяйствах Израиля, и референтном штамме птичьего гриппа ty/wisconsin-66 (H9N2).

Штаммы, выделенные в начале, середине и конце эпизоотии – ty/90710 – 30.05.2000 г., ch/786 – 07.12.2001 г., ty/868 – 20.01.2002 г., ty/615 – 30.01.2002 г., ty/616 – 30.01.2002, ty/625 – 10.02.2002 г., ch/1304 – 05.05.2003 г., ch/1308 – 12.05.2003 г., ch/1373 – 14.07.2003 г., ty/1562 – 28.12. 2003 г., были получены из Израильской коллекции вирусных изолятов. Референтный штамм был любезно предоставлен доктором Скехелом (Dr. Skehel, World Influenza Center, National Institute for Medical Reserch, Mill Hill, London).

Для изоляции вирусов инфицировали 9–10-дневных куриных эмбрионов, вводя в аллантаисную полость культуру вируса (1 мл трахеальных и клоакальных смывов в глицерофосфатном буфере, pH 7,2). Через 48–96 часов после заражения аллантаисную жидкость отбирали, аликвотировали, проверяли на присутствие антигена, замораживали и хранили при –80°С. Вирусную РНК выделяли из аллантаисной жидкости с помощью набора mini kit Viral RNA фирмы QIAGEN, Valencia, Calif. и использовали для клонирования ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Lee et al., 2001).

Продукты реакции подвергали электрофорезу в агарозном геле, вырезали, очищали при помощи набора фирмы QIAGEN, Valencia, Calif. и секвенировали.

Восстановление аминокислотных последовательностей по нуклеотидным и их статистический анализ провели с помощью компьютерной программы Bio Edit Package, Version 5.

Антигенные свойства ГА и НА определяли с помощью реакции торможения гемагглютинационной активности (РТГА) и торможения ферментативной активности НА (РТНА) соответственно.

РТГА проводили в 1% взвеси куриних еритроцитів, що містить 4 аглютинаційні одиниці (АЕ) антигена з використанням набору референтних антитітел до 15-ти серотипів ГА (Н1–Н15).

РТНА проводили в рівних об'ємах вірусоносії алантоїсної рідини та антинейрамінідазної сироватки, використовуючи для цього набір референтних моноспецифічних антитітел до всіх 9-ти серотипів нейрамінідаз вірусу грипу (NA1–NA9).

Обидві реакції проводили за методом, рекомендованим ВОЗ (ОІЕ, 2000).

Ферментативну активність НА, не зв'язаної з антитітелами, визначали за ступенем гідролізу субстрату – фетину – при 37°C (Palmer et al., 1975) та виражали в одиницях оптичної щільності при  $\lambda=549$  нм.

Всі типи антитітел були отримані від доктора Вебстера (Dr. Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA).

### Результати та обговорення

Проведені реакції гальмування виявили для обох білків наявність кроссреактивності – взаємодія ГА та НА ряду штамів вірусу не тільки з антитітелами до Н9 та Н2, але й з антитітелами до інших серотипів цих білків (табл. 1 та 2).

В обох випадках кроссреактивність спостерігалася на початковій стадії епізоотії (в період 2000–2002 рр.), у т.ч. «ранніх» штамів, і зникла з появою «пізніх» (в період 2002–2003 рр.).

Суттєво, що титр антитітел, що гальмує активність обох білків, зростає в ході епізоотії.

Звичайно, ці явища є наслідком структурних змін молекул ГА та НА в результаті заміни деяких амінокислотних залишків в сайтах, що визначають антигенні властивості цих молекул (Skehel, 2002).

Таблиця 1.

РТГА з антитітелами до ГА та амінокислотні залишки, що входять до його антигенного сайту II

Штам вірусу, дата ізоляції	Референтні антитітелі	Амінокислотні залишки в змінюваних позиціях		
		135	183	216
ty/90710/, 30.05.2000	Н2, Н6, <b>Н9</b> , Н13	<b>Гли</b>	Асн	<b>Глн</b>
ch/786/, 07.12.2001	Н6, <b>Н9</b> , Н13	<b>Гли</b>	Асн	<b>Лей</b>
ty/625/, 10.02.2002	<b>Н9</b> , Н13	<b>Гли</b>	Асн	<b>Лей</b>
ch/1308/, 12.05.2003	<b>Н9</b>	<b>Асп</b>	Асн	<b>Лей</b>
ty/1562/, 28.12.2003	<b>Н9</b>	<b>Асп</b>	Асн	<b>Глн</b>

Молекула ГА містить 3 антигенні сайти (Wilson et al., 1981): I-й (позиції 129, 147, 152), змішаний (позиції 127, 179, 188) та II-й (позиції 135, 183, 216). В сайті I ГА досліджуваних штамів не виявлено заміни амінокислотних залишків. В змішаному сайті виникали окремі заміни Тре→Асп (позиція 179) та Тре→Про (позиція 188), які досить швидко випробували зворотні переходи, і в кінці епізоотії в цих позиціях завжди знаходився Тре.

Заміни амінокислотних залишків, які мають регулярний характер, відбулися тільки в II-му сайті в позиціях 135 та 216.

Максимальний рівень кроссреактивності спостерігався в тому випадку, коли в усіх трьох позиціях сайту II знаходилися полярні (гідрофільні) незаряджені амінокислотні залишки. Заміна Глн в позиції 216 на неполярний гідрофобний залишок Лей зменшила ступінь кроссреактивності, а подальший зворот в цій позиції Лей→Глн та заміна в позиції 135 Гли на негативно заряджений (кислий) залишок Асп привели до зникнення кроссреактивності – реакція гемаглютинації гальмувалася тільки антитітелами до Н9.

Таблиця 2.

**РТНА с антисыворотками к НА и аминокислотные остатки, входящие в её переменные участки**

Штамм вируса, дата изоляции	Референтные антисыворотки	Аминокислотные остатки в переменных позициях			
		312	346	381	386
ty/wisconsin-66, 1966	<b><math>\alpha</math>/N2</b>	<i>Изолей</i>	<i>Асн</i>	<i>Гли</i>	<i>Про</i>
ty/90710/, 30.05.2000	<b><math>\alpha</math>/n2, <math>\alpha</math>/N3b</b>	<i>Изолей</i>	<i>Гли</i>	<i>Асп</i>	<i>Ала</i>
ty/868/, 20.01.2002	<b><math>\alpha</math>/N2, <math>\alpha</math>/N3a</b>	<i>Изолей</i>	<i>Гли</i>	<i>Асп</i>	<i>Ала</i>
ty/615/, 30.01.2002	<b><math>\alpha</math>/N2, <math>\alpha</math>/N3a</b>	<i>Изолей</i>	<i>Гли</i>	<i>Асп</i>	<i>Ала</i>
ty/616/, 30.01.2002	<b><math>\alpha</math>/N2, <math>\alpha</math>/N3a</b>	<i>Изолей</i>	<i>Гли</i>	<i>Асп</i>	<i>Ала</i>
ch/1304/, 05.05.2003	<b><math>\alpha</math>/N2</b>	<i>Вал</i>	<i>Ала</i>	<i>Гли</i>	<i>Про</i>
ch/1373/, 14.07.2003	<b><math>\alpha</math>/N2</b>	<i>Вал</i>	<i>Ала</i>	<i>Гли</i>	<i>Про</i>
ty/1562/, 28.12.2003	<b><math>\alpha</math>/N2</b>	<i>Вал</i>	<i>Ала</i>	<i>Гли</i>	<i>Про</i>

Таким образом, полученные результаты наглядно демонстрируют, как эволюционные изменения антигенного статуса ГА исследованных штаммов в ходе эпизоотии зависели от физико-химических характеристик (полярности, наличия и знака заряда) аминокислотных остатков, заменяющих друг друга.

В РТНА с референтным вирусом ty/wisconsin-66 нейраминидазную активность тормозила только антисыворотка против N2 (табл. 2).

У исследованных же штаммов, уже начиная с середины 2000 г., такое торможение осуществляет и антисыворотка к N3. В это время замены аминокислотных остатков, в сравнении с референтным штаммом, появились в позициях: 346 (Асн→Гли), 381 (Гли→Асп) и 386 (Про→Ала). Возникшая кроссреактивность отчетливо коррелирует с этими заменами.

Появление кроссреактивности может определяться изменением физико-химических свойств и конформационной гибкости переменных участков молекулы НА.

В позиции 346 произошла замена, при которой полярность данного участка молекулы не изменилась. К тому же, Гли, заменивший Асн, имеет существенно меньший размер. Таким образом, эта замена, в отличие от двух других, является консервативной и, вероятно, не может повлиять на свойства белка в данном участке (Шульц, Шример, 1982).

Замена незаряженного Гли на отрицательно заряженный (к тому же более крупный) остаток Асп (позиция 384), напротив, способна существенно повлиять на свойства НА в рассматриваемом сайте.

Замена Про→Ала (позиция 386) не влияет на гидрофобность в данном сайте. Однако следует учесть, что аланин имеет существенно меньший размер и, в отличие от пролина, не ограничивает подвижность полипептидной цепи в месте своего расположения, что может быть важным для определения круга возможных партнеров (в том числе и антител) молекулы НА в данном её участке.

Не исключено, что важны не только конкретные аминокислотные замены, но и их сочетания. Так, референтный вирус имеет в позициях 381 и 386, т.е. на небольшом расстоянии вдоль полипептидной цепи, Гли и Про. Как известно, влияние этих аминокислот на конформационную гибкость белковых молекул противоположно: глицин её повышает, а пролин резко ограничивает. Замена данного сочетания на сочетание Асп и Ала оказалась, очевидно, благоприятной для расширения круга антител, нейтрализующих активность НА, о чем свидетельствует появление кроссреактивности.

Описанная ситуация продолжалась до начала 2003 г., когда на протяжении короткого времени произошли замены во всех 4-х переменных позициях. В позициях 312 и 346 наблюдались замены соответственно Изолей→Вал (консервативная замена) и Гли→Ала, что повышает гидрофобность в данном участке и может до некоторой степени снизить свободу внутримолекулярных движений. Наиболее существенными, на наш взгляд, являются две другие замены. В позициях 381 та 386 произошел возврат к Гли и Про, как и у референтного штамма. Это, вероятно, отражает возврат к отобранной в ходе эволюции вируса оптимальной конформационной гибкости и полярности в этом участке молекулы.

Одновременно с данными заменами исчезает и кроссреактивность – нейраминидазную активность вновь тормозит только антисыворотка к N2.

Всё сказанное не исключает, конечно, что и в каких-то других участках этой молекулы могли произойти замены, не обнаруженные в нашей работе, но важные для антигенных свойств HA.

Полученные результаты демонстрируют любопытные особенности эволюции вируса H9N2 в течение эпизоотии. На её начальном этапе в результате радиальной эволюции от классического вируса птичьего гриппа H9N2 – «прародителя» – произошли различные «ранние» формы, близкие по антигенным свойствам к вирусам, циркулирующим в данное время в природе и поражающим не только птиц, но и млекопитающих. Это неудивительно, так как именно такие вирусы сохранились в результате естественного отбора в процессе совместной эволюции их как носителей антигенов с эволюцией иммунной системы хозяев.

Со временем, однако, «ранние» штаммы стали вытесняться «поздними», обладающими антигенными свойствами, аналогичными свойствам классического референтного штамма H9N2, и к концу эпизоотии встречались только эти формы вируса. По-видимому, этот возврат объясняется тем, что именно такие антигенные свойства обеспечили вирусам в процессе естественного отбора в организме птиц успешную сохранность и распространение в связи с более высокой вирулентностью по сравнению со штаммами вирусов с иными антигенными характеристиками.

### Список литературы

- Шульц Г., Ширмер Р. Принципы молекулярной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 354с.  
Bio Edit Package. Version 5. – <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. – 1997–2005.  
Lee M.S., Chang P.C., Shien J.H. et al. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR // J. Virol. Methods. – 2001. – Vol.97, № 1–2. – P.13–22.  
OIE (Office International des Epizooties. Highly pathogenic avian influenza) // Manual of standards: diagnostic tests and vaccines. – Paris. – 2000. – P. 212–220.  
Palmer D.F., Dowdle W.R., Coleman M.T., Schild G.C. Advanced Laboratory Techniques for influenza Diagnosis. Immunological series // Atlanta, CDC, U.S. Department of Health, Education and Welfare. – 1975. – №6. – P. 1–14.  
Skehel J.J. Genetics of influenza viruses // Ann. Rev. Gen. – 2002. – Vol.36. – P. 305–332.  
Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution // Nature. – 1981. – Vol.292. – P. 72–75.

## ЕВОЛЮЦІЯ АНТИГЕННИХ ДЕТЕРМІНАНТ ГЕМАГЛЮТИНІНУ ТА НЕЙРАМІНІДАЗИ ВІРУСУ ГРИПУ H9N2

І.Л.Гісіна, Є.Е.Перський, Н.І.Буланкіна

Проведено дослідження антигенних властивостей гемаглютиніну та нейрамінідази референтного вірусу пташиного грипу wisconsin-66 та 10-ти штамів вірусу пташиного грипу H9N2, що були виділені в Ізраїлі під час епізоотії 2000–2004 рр. Визначена первинна структура ділянок антигенних детермінант обох білків цих штамів. Показано, що в першій половині епізоотії відбулась бурхлива диференційна еволюція вірусу H9N2. Для неї характерним було з'явлення штамів з антигенними властивостями, близькими до властивостей різних штамів, що циркулюють в природі. Наприкінці епізоотії ці нові різновиди штамів було витіснено вірусами з антигенними властивостями «класичного» референтного штаму H9N2. Розглянуто амінокислотні заміни в сайтах антигенних детермінант гемаглютиніну та нейрамінідази, що спричинили це явище.

Ключові слова: *вірус грипу, H9N2, гемаглютинін, нейрамінідаза, антигенні детермінанти, еволюція.*

---

**EVOLUTION OF HEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASE ANTIGENIC DETERMINANTS OF INFLUENZA VIRUSES H9N2****I.L.Gisina, E.E.Persky, N.I.Bulankina**

Hemagglutinin and neuraminidase antigenic properties of avian influenza virus wisconsin-66 and 10 strains of H9N2 viruses that were circulated during Israel epizooty in 2000–2004 were researched. The primary structure of antigenic determinants has been determined for both proteins. At the beginning of epizooty there was rapid differential evolution of H9N2 viruses. It consists in arise of strains with antigenic properties just like properties of different influenza viruses circulating at that period in nature. At the end of epizooty they have been excluded by the strains with the «classic» antigenic properties of referent H9N2 virus. Amino acid substitutions in antigenic sites related to this phenomenon were described.

Key words: *influenza virus, H9N2, hemagglutinin, neuraminidase, antigenic determinants, evolution.*

---

**Представлено О.П.Білозоровим**

**Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком**