

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему
«Біоінформатичний аналіз мінливості штамів вірусу грипу»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконала: студентка групи МгБТ-23

Парчевська Д. Д.

Науковий керівник: к.т.н., доц. Волошина І. М.

Рецензент: к.б.н., доц. Юнгін О. С.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2024 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Парчевській Дарині Дмитрівні**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **«Біоінформатичний аналіз мінливості штамів вірусу грипу»**

Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «03» вересня 2024 року № 188-уч..

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо мінливості штамів вірусу грипу; біоінформатичні методи аналізу; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ; огляд літератури; об'єкт, мета та методи дослідження; експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 03.09.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовні терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	07.09.2024	
2	Розділ 1 Огляд літератури	09.10.2024	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	16.10.2024	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	30.10.2024	
5	Висновки	07.11.2024	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	13.11.2024	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)	14.11.2024	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)	18.11.2024	
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Дарина ПАРЧЕВСЬКА

Науковий керівник роботи _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Парчевська Д.Д. Біоінформатичний аналіз мінливості штамів вірусу грипу – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».
– Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

Кваліфікаційну роботу присвячено комплексному дослідженню штамів вірусу грипу трьох різних носіїв – родів *Homo* та *Sus* і виду *Aves*. Робота охоплює проведення біоінформатичного аналізу генетичної мінливості штамів вірусу грипу з використанням сучасних методів обробки та аналізу геномних даних з метою виявлення закономірностей у мутаціях вірусу, прогнозування їхнього впливу на ефективність вакцин, а також кращого розуміння механізмів еволюції вірусу та його адаптації до нових умов середовища.

У роботі представлено загальну характеристику вірусу грипу, зокрема його основних поверхневих глікопротеїнів – гемаглютиніну та нейрамінідази. Крім того, досліджено механізм дії та сучасні проблеми вакцин, що зумовлює актуальність нашого дослідження.

Кваліфікаційна робота також включає огляд методів дослідження, серед яких – використання сучасних баз даних нуклеотидних послідовностей (NCBI), метод попарного вирівнювання за допомогою програми BLAST, метод множинного вирівнювання у програмі ClustalW та метод філогенетичного аналізу. Результати проведених за допомогою цих методів досліджень було узагальнено в таблицях, що демонструють відсоток спорідненості між аналізованими послідовностями.

Ключові слова: вірус грипу, гемаглютинін, нейрамінідаза, вакцина, нуклеотидна послідовність.

ANNOTATION

Parchevska D.D. Bioinformatics analysis of the variability of influenza virus strains - Manuscript.

Qualification work in the specialty 162 “Biotechnology and bioengineering.” - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2024.

The qualification work is devoted to a comprehensive study of influenza virus strains of three different carriers - the genera *Homo* and *Sus* and the species *Aves*. The work includes bioinformatics analysis of genetic variability of influenza virus strains using modern methods of processing and analyzing genomic data to identify patterns in virus mutations, predict their impact on vaccine efficacy, and better understand the mechanisms of virus evolution and its adaptation to new environmental conditions.

The paper presents a general characterization of the influenza virus, in particular, its main surface glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase. In addition, the mechanism of action and current problems of vaccines are investigated, which determines the relevance of our study.

The qualification work also includes a review of research methods, including the use of modern nucleotide sequence databases (NCBI), the method of pairwise alignment using the BLAST program, the method of multiple alignment in the ClustalW program, and the method of phylogenetic analysis. The results of the studies conducted using these methods were summarized in tables showing the percentage of similarity between the analyzed sequences.

Keywords: influenza virus, hemagglutinin, neuraminidase, vaccine, nucleotide sequence

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1	11
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1 Характеристика вірусу грипу	11
1.2 Вакцини та сучасні проблеми вакцинації	15
Висновки до розділу 1	25
РОЗДІЛ 2	27
ОБ’ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	27
2.1 Вибір та характеристика об’єкту та предмету дослідження.....	27
2.2. Методи проведення дослідження	32
2.2.1 Бази даних нуклеотидних послідовностей	32
2.2.2 Аналіз нуклеотидних послідовностей та філогенетичний аналіз	36
Висновки до розділу 2	43
РОЗДІЛ 3	44
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	44
3.1 Оцінка різноманіття нуклеотидних послідовностей для дослідження.....	44
3.2 Результати попарного вирівнювання послідовностей	46
3.3 Результати множинного вирівнювання послідовностей.....	53
Висновки до розділу 3	55
ВИСНОВКИ.....	56
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	57
ДОДАТКИ.....	62

ВСТУП

Актуальність теми. Грип є серйозною проблемою для громадського здоров'я, щорічно інфікуючи 5-15% населення планети. Вірус грипу належить до родини *Orthomyxoviridae* і має три типи А, В і С. Інфікування вірусом грипу А є найпоширенішим і найважчим, як правило, у людей. Він швидко поширюється і за короткий проміжок часу вражає популяцію людей, що мешкає на значних територіях, з різним ступенем патології від легкого до важкого.

Резервуаром вірусу грипу А є дикі водоплавні птахи та інші види тварин, такі як птахи, свині, тхори, коні, тюлені, кити, норки, гігантські мурахіди, коти і собаки. Віруси грипу В і С мають дуже обмежене коло господарів і з'являються переважно в людей.

Віруси грипу типу А викликають потенційно смертельні респіраторні інфекції серед людей у всьому світі. Еволюція вірусів грипу відбувалася шляхом обміну генами (реасорбції) між пташиними, свинячими та людськими вірусами, відповідальними за минулі глобальні пандемії грипу: 1918-Н1Н1, 1957-Н2Н2, 1968-Н3Н2 та 2009-Н1Н1pdm09, які забрали мільйони життів. Наслідки пандемій ще більше погіршуються сезонними інфекціями грипу, які, за оцінками, спричиняють надлишкову смертність на рівні 4,0-8,8 на 100 000 осіб у всьому світі.

Геномна характеристика циркулюючих штамів вірусу грипу для розуміння їхньої еволюції і того, як нові віруси з'являються і поширюються серед населення, є важливою для ефективного вірусного контролю та профілактики. Однак швидкі та безперервні геномні зміни через мутації (генів) або заміни (білків), реасортацію і рідше – рекомбінацію роблять прогнозування дуже складним.

Хоча епідеміологія, пов'язана з інфекцією грипом, вивчається вже кілька років, деякі факти, пов'язані з передачею хвороби, залишаються недостатньо вивченими. Тому дослідження і аналіз фенотипових і генотипових властивостей різних штамів вірусу грипу, а також встановлення генетичних взаємозв'язків між ними, є необхідною складовою для розуміння механізмів адаптації та

варіабельності вірусу та подальшої розробки засобів боротьби і профілактики з інфекцією.

Мета дослідження – проведення біоінформатичного аналізу генетичної мінливості штамів вірусу грипу з використанням сучасних методів обробки та аналізу геномних даних.

Завдання дослідження:

- охарактеризувати вірус грипу та сучасний стан вакцин;
- дослідити сучасні бази даних нуклеотидних послідовностей і програми для їхнього аналізу;
- виявити закономірності у спорідненості штамів вірусу грипу в різних носіїв, у різний час і на різних локаціях .

Об'єкт дослідження – вірус грипу, зокрема його основні поверхневі глікопротеїни – гемаглютинін і нейрамінідаза.

Предмет дослідження – мінливість штамів вірусу грипу.

Методи дослідження. У роботі було використано такі загальнонаукові методи дослідження як аналіз (для вивчення вірусу грипу за його складовими та для здійснення огляду програм, що входять до складу NCBI), синтез (для узагальнення отриманих результатів порівняння послідовностей та отримання більш повних висновків), експеримент (для перевірки гіпотези про залежність мінливості штамів вірусу грипу від носія та його місцезнаходження), дедукція (для отримання часткових висновків) та індукція (для підсумовування загальних висновків на основі отриманих фактів). Також ми вдалися до спеціальних методів дослідження, а саме – використання сучасних баз даних нуклеотидних послідовностей (NCBI), методу попарного вирівнювання за допомогою програми BLAST, методу множинного вирівнювання у програмі ClustalW та методу філогенетичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у застосуванні комплексного підходу до аналізу мінливості вірусу грипу за допомогою біоінформатичних інструментів. Вперше будуть проаналізовані деякі мутації у

штамах грипу, що поширюються в певному регіоні та в певний період часу, що сприятиме глибшому розумінню локальних епідемічних процесів.

Практичне значення одержаних результатів. По-перше, біоінформатичний аналіз допомагає ідентифікувати найбільш поширені та стабільні мутації, щоб розробити вакцини, які краще відповідають сучасним штамам. По-друге, аналіз генетичної варіативності вірусу дозволяє передбачити потенційні спалахи грипу, допомагаючи державам і міжнародним організаціям готуватися до епідемій і впроваджувати профілактичні заходи. По-третє, дослідження на рівні геному вірусу грипу виявляють мутації, що можуть впливати на стійкість до існуючих антивірусних препаратів, та пропонують нові мішені для терапії. Окрім цього, використання біоінформатичних платформ для обміну даними про штами вірусу між різними країнами сприяє створенню ефективніших глобальних стратегій боротьби з грипом. Насамкінець, робота над таким проектом сприяє підготовці спеціалістів з біоінформатики, які можуть застосовувати сучасні комп'ютерні методи в аналізі генетичних даних, що є критично важливим для медицини.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження було апробовано на Всеукраїнській конференції «Актуальні питання сучасної медицини та фармації» (19-20 вересня 2024 року, Харківський політехнічний інститут)

Публікації. Тези на тему «Геномні технології в розробці вакцин» та стаття в електронному збірнику матеріалів конференції «Інноватика в освіті, науці та бізнесі: виклики та можливості» (15 листопада 2024 р.) на тему «Біоінформаційні методи, що використовуються в біотехнології».

1. **Парчевська Д. Д., Волошина І.М.** Геномні технології в розробці вакцин // «Актуальні питання сучасної медицини та фармації»: матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (м. Харків, 19-20 вересня 2024 р., м. Харків) / – Х.: НФаУ, 2024. – С. 159-161 (додаток А), сертифікати (додаток Б).

2. **Парчевська Д. Д., Грецький І. О., Волошина І. М.** Біоінформаційні методи, що використовуються в біотехнології Публікація статті у матеріалів конференції

«Інноватика в освіті, науці та бізнесі: виклики та можливості» (15 листопада 2024 р.) (друк). (додаток В).

Структура і обсяг роботи: Основна частина кваліфікаційної науково-дослідницької роботи викладена на 57 сторінці, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 54 найменування публікацій зарубіжних дослідників. В роботі представлено три додатки, що представляють виконання індивідуального плану магістра.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика вірусу грипу

Вірус грипу належить до родини *Orthomyxoviridae* (Ортоміксовірусні) та поділяється на такі типи: *Alphainfluenzavirus* (вірус грипу А), *Betainfluenzavirus* (вірус грипу В), *Gammainfluenzavirus* (вірус грипу С) і *Deltainfluenzavirus* (вірус грипу D).

Вірус грипу має плеоморфний вигляд під електронним мікроскопом (рис.1.1).

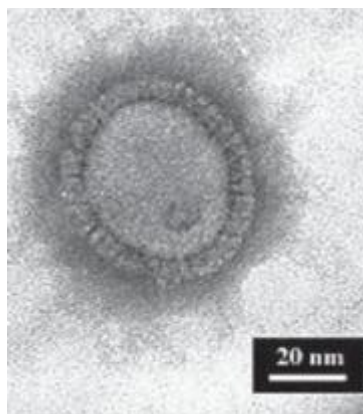
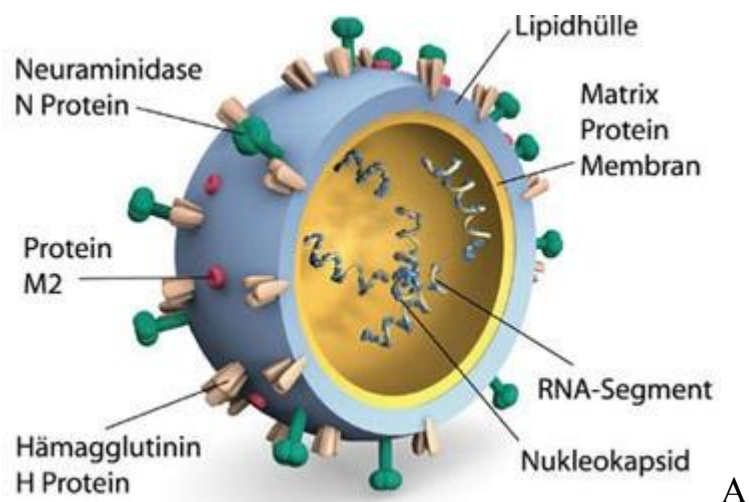


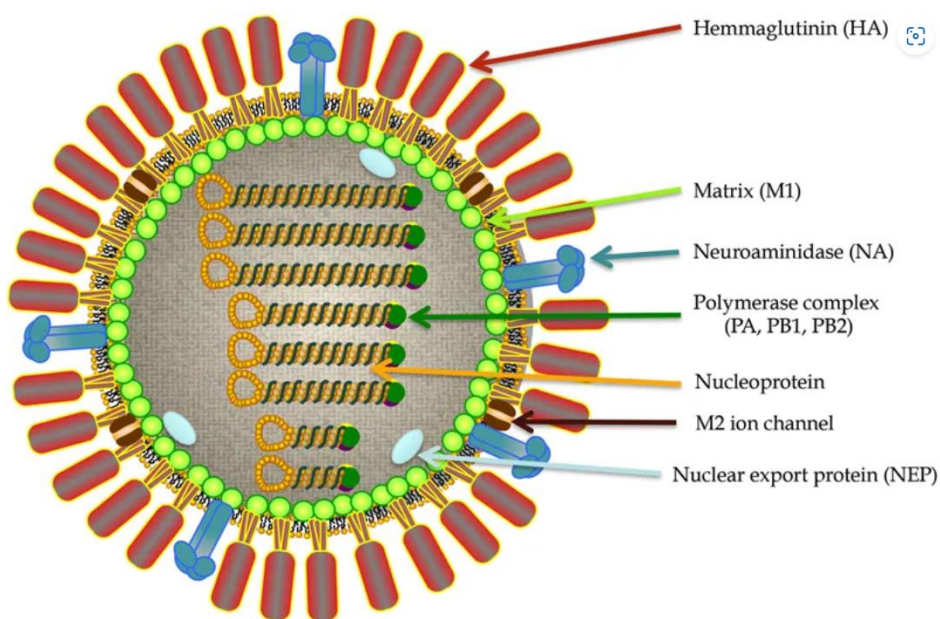
Рис.1.1 Електронна мікрофотографія вірусу грипу H1N1 [43, с. 11-18]

Деякі частинки виглядають сферичними з середнім діаметром 100 нм, тоді як інші мають витягнуту форму довжиною близько 300 нм. Вірусна частинка має ліпідну оболонку, в яку вбудовані три вірусні білки – глікопротеїни HA і NA, а також невелика кількість трансмембранного білка M2 (рис. 1.2). Подвійний ліпідний шар, що містить HA, NA і M2, оточує внутрішній білковий шар, утворений матричним білком M1, який оточує вірусний геном, пов'язаний з нуклеопротейном NP і невеликою кількістю PB1, PB2 і PA, що утворюють комплекс РНК-полімерази. Всередині вірусної частинки знаходиться також ядерний експортний білок NEP, також відомий як неструктурний білок NS2 [5, с. 49-53 ; 28, с. 47-89]. Геном вірусів грипу А утворений вісьмома сегментами одноланцюгової РНК негативної

полярності, розмір яких варіює від 890 нуклеотидів (н.п.) до 2350 н.п. Загалом геном містить



А



Б

Рис. 1.2 Схематичне зображення будови вірусу грипу. А – 3D зображення вірусу в розрізі, Б – 2D зображення вірусу в розрізі

близько 13 600 н.п. і кодує 11 білків. Всі вірусні гени мають 5' і 3' нетрансльовані ділянки (NTR) різної довжини, які містять сигнали реплікації та інкапсуляції. Останні 13 і 12 н.т. з 5' і 3' кінців, відповідно, є висококонсервативними серед усіх генів вірусу [47, с. 137-175 ; 28, с. 47-89].

Віруси грипу типу А, В та С є висококонтагіозними збудниками респіраторних захворювань людини. Вірус грипу вирізняється своєю надзвичайною здатністю пристосовуватися до нових господарів. Адаптація нових штамів вірусу грипу А до організму людини спричиняє цілі пандемії. Під час «Великого грипу» 1918 року за півтора роки загинув приблизно кожен 30-й житель планети. Пташиний грип також викликає серйозні захворювання в домашньої птиці [12, с. 809]. На противагу цьому, існує лише один відомий підтип вірусу грипу В, який переважно інфікує людей, тому пандемічний потенціал вірусів грипу В дуже низький, хоча і вони можуть викликати важкі респіраторні захворювання. Віруси грипу С стають причиною легких респіраторних захворювань у людей і деяких тварин, і є найменш вивченим типом [47, с. 137-175 ; 51, с. 691-740.].

Пік захворюваності в помірному кліматі припадає на зимові місяці. З 1977 року два підтипи грипу А, H1N1 і H3N2, а також грип В сезонно циркулюють у людській популяції [16, с. 14-22 ; 54, с. 152-179]. Сезонний грип, за різними оцінками, забирає 250-650 тис. життів на рік у всьому світі. Його типові симптоми включають раптове підвищення температури, біль у м'язах, головний біль і виснаження, і досягають піку через 2-3 дні після зараження і зникають протягом 1-2 тижнів. Ускладнення виникають у меншості випадків, часто через вторинні бактеріальні інфекції або загострення серцево-судинних і респіраторних захворювань. До груп ризику належать немовлята, люди похилого віку, вагітні жінки та особи з ослабленим імунітетом [42, с. 809]. Спалахи захворювання на вірус грипу фіксують кожні 1 – 3 роки, тоді як глобальні епідемії відбуваються кожні 10 – 15 років, що можна пояснити появою нових штамів або підтипів існуючих типів вірусу (табл. 1.1).

З огляду на епідемічний і пандемічний потенціал вірусів грипу А, до них прикута увага національних та міжнародних організацій охорони здоров'я. Залежно від антигенності білків гемаглютиніну (далі – HA) та нейрамінідази (далі – NA) віруси грипу А класифікують на різні підтипи: 16 підтипів HA (H1-H16) та 9 підтипів NA (N1-N9) [16, с. 14-22 ; 51, с. 152-179.].

Таблиця 1.1

Поява антигенних підтипів грипу А, пов'язаних з епідеміями захворювання

Роки	Підтип	Характер епідемії
1889 – 1890	H2N8	Важка пандемія
1900 – 1903	H3N8	Помірна епідемія
1918 – 1919	H1N1	Важка пандемія
1935 – 1936	H1N1	Неважка епідемія
1946 – 1947	H1N1	Неважка епідемія
1957 – 1958	H2N2	Важка пандемія
1968 – 1969	H3N2	Помірна епідемія
1977 – 1978	H1N1	Неважка епідемія

Дикі водоплавні птахи, такі як качки, чайки та морські птахи, є найголовнішими носіями цих вірусів, оскільки в цій популяції циркулюють всі описані підтипи Н і N. Вважається, що вони є джерелом вірусів, які інфікують інші види птахів і ссавців. Багато підтипів грипу А інфікують птахів безсимптомно або викликають легкі симптоми; однак деякі штами підтипів H5 і H7 є високопатогенними і викликають важку хворобу і смерть у деяких диких і домашніх видів птахів. Подібно до пташиних інфекцій, деякі штами грипу можуть безсимптомно інфікувати свиней, тоді як інші штами можуть викликати грипозні симптоми у цих тварин, такі як лихоманка, кашель та виділення з носа. На відміну від птахів, свині інфікуються сезонно переважно підтипами грипу H1N1, H3N2 та H1N2 [54, с. 691-740].

Свині вважаються основним проміжним господарем вірусів пташиного грипу, які вносять відповідні генетичні зміни щоб інфікувати людей. Вони мають клітинні рецептори, які відповідають вірусам людського та пташиного грипу [23, с. 67–73 ; 48, с. 25–31], і в кількох доповідях наведено генетичні докази підтримки цієї гіпотези [42, с. 211–217; 15, с. 5–15]. Віруси грипу підтипів H1N1, H1N2 та H3N2 широко циркулюють у популяціях свиней. Крім того, повідомлялося про інфікування свиней вірусами інших підтипів, таких як H3N1, H4N6, H5N1, H5N2 та H9N2 [39, с. 169–173]. Однак філогенетичне різноманіття всіх вірусів свинячого грипу (SIV) на сьогодні не з'ясоване [51, с. 1-2].

1.2 Вакцини та сучасні проблеми вакцинації

Задля розуміння актуальності теми нашої роботи слід з'ясувати стан вакцин проти грипу на сьогодні, проблеми в цій галузі та способи їх подолання.

У своїй роботі Majed Ghattas наводить таке визначення поняття вакцин: «... біологічні препарати, призначені для стимуляції та підготовки імунної системи до боротьби з інфекцією або хворобою... що використовують здатність високорозвиненої імунної системи ссавців розпізнавати, реагувати та запам'ятовувати патогени» [18, с. 1]. Дещо інакше трактування дає Європейська фармакопея: «Вакцини для застосування людиною - це препарати, що містять антигени, які мають властивість створювати у людини специфічний активний імунітет проти інфекційного агента або токсину, або антигену, що виробляється ним» [20, с. 25]. Вакцини працюють за таким принципом: спочатку імунна система розпізнає антигени інфекційних агентів, здатні визначати імунну відповідь. Вони називаються «імуногенними» і активують різні імунні реакції, деякі з яких є захисними через їхню здатність нейтралізувати інфекційний агент або його патогенність. Потім вакцини імітують певні імуногенні характеристики інфекційних агентів, викликаючи такі ж захисні імунні реакції ще до контакту з патогенним агентом. Вакцинація використовує пам'ять імунної системи, і її реактивність підвищується під час подальшого контакту з інфекційним агентом,

запобігаючи таким чином патологічним проявам. Схема роботи вакцин наведена на рис. 1.3:

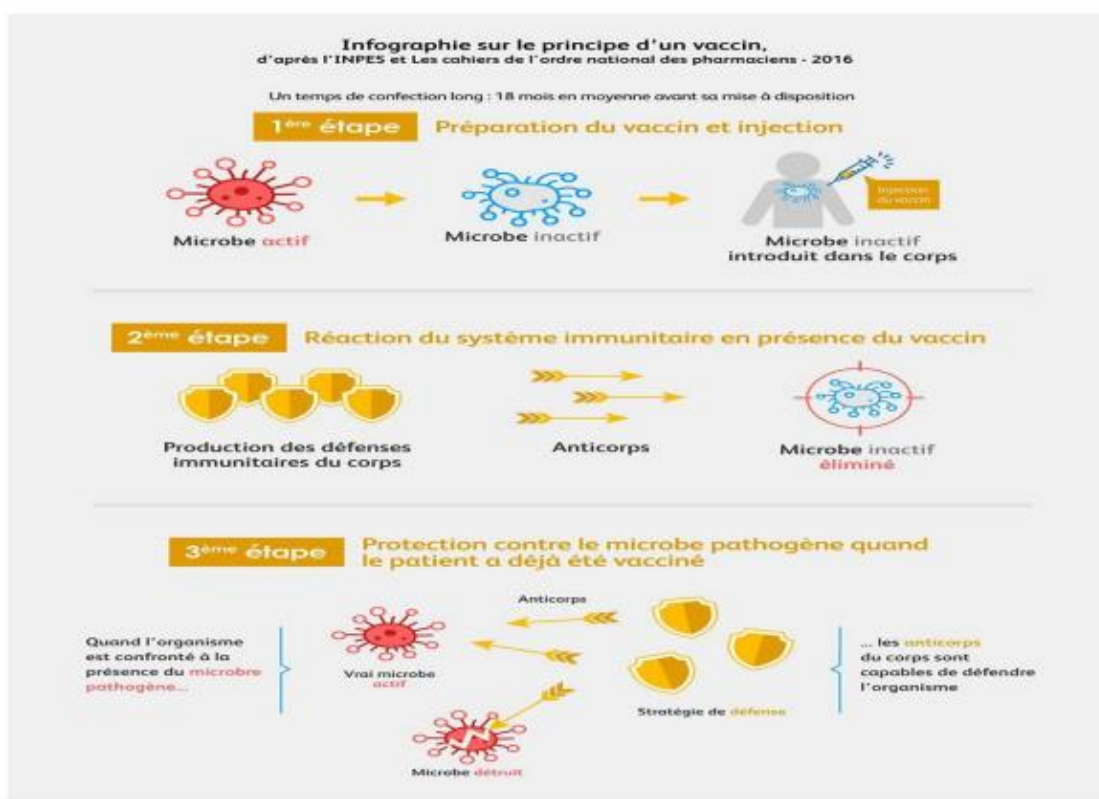


Рис. 1.3 Інфографіка про принцип дії вакцини [20].

Для забезпечення зазначеного вище процесу, до складу вакцин входять:

- цілі мікроорганізми (бактерії, віруси або паразити), інактивовані фізичними або хімічними засобами, які зберігають адекватні імуногенні властивості;
- цілі живі мікроорганізми, які від природи не є вірулентними або були оброблені з метою зменшення їхньої вірулентності при збереженні адекватних імуногенних властивостей;
- антигени, виділені з мікроорганізмів або отримані шляхом генної інженерії чи хімічного синтезу, які можуть використовуватися в первинному стані, бути детоксикованими фізичними або хімічними засобами, а також у формі агрегатів, кон'югатів або полімерів з метою підвищення їх імуногенної сили [20].

Часто до вакцин додають ад'юванти для покращення імуногенності (здатності викликати імунну відповідь) та ефективності в деяких групах населення (наприклад, серед немовлят, людей похилого віку та осіб із ослабленим імунітетом)

[18]. Якщо антиген адсорбований на мінеральному ад'юванті, вакцина називається адсорбованою [20].

До складу також можуть входити консерванти, стабілізатори, допоміжні речовини та сліди продуктів, що залишилися під час виробництва. Типові компоненти вакцин наведено на рис. 1.4:

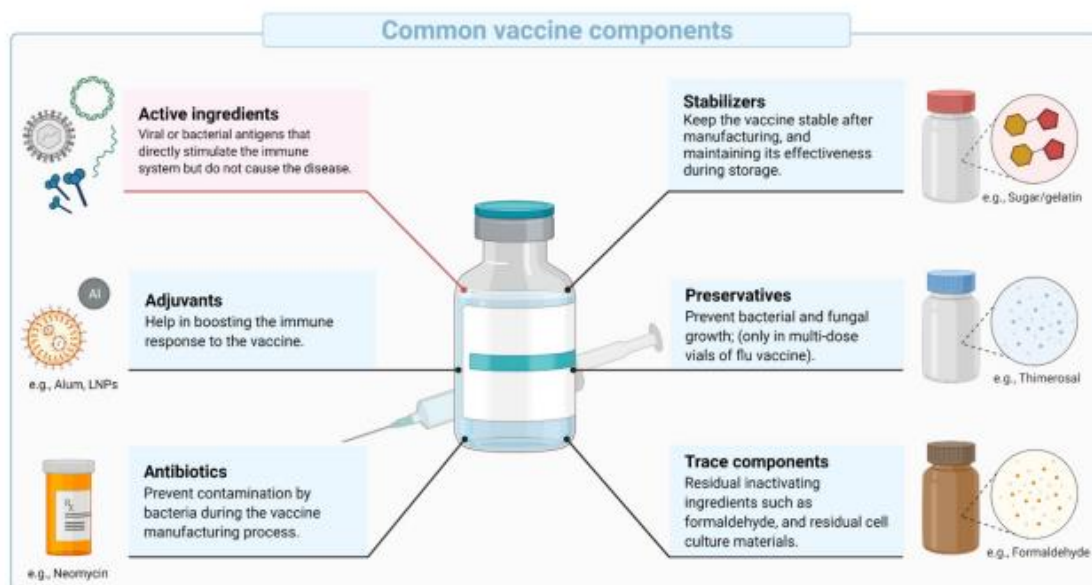


Рис. 1.4 Схематичне зображення типових компонентів вакцин, включаючи діючі речовини, стабілізатори, ад'юванти, консерванти, антибіотики та мікроелементи [18].

До вакцин висувається ряд вимог. Як правило, вакцина повинна забезпечувати тривалий, якщо не остаточний, захист. Вона має бути ефективною в низьких дозах, легкою в застосуванні та стабільно підтримувати свою активність. Також вона не повинна мати несприятливих наслідків для пацієнта. Не слід забувати, що ефективність вакцини також залежить від низки факторів, пов'язаних з особою, яку вакцинують, якістю вакцини та способом її введення [20]. Основні вимоги до вакцин систематизовано в таблиці 1.2:

Таблиця 1.2

Характеристика ефективних вакцин [2]

Безпека	Вакцина не повинна спричиняти хворобу або смерть
Захист	Вакцина повинна захищати проти хвороби
Підтримка захисту	Захист проти хвороби повинен тривати кілька років
Індукція нейтралізуючих антитіл	Деякі патогени (типу поліовірусу) інфікують критичні клітини. Нейтралізуючі антитіла істотні для запобігання інфекції таких клітин
Індукція протективних клітин	Деякі патогени, зокрема внутрішньоклітинні, більш ефективно пригнічуються клітинно-медійованою відповіддю
Практичні міркування	Низька вартість дози. Біологічна стабільність. Зручність застосування. Незначність побічних ефектів

Наразі не існує єдиної класифікації типів вакцин, адже ця галузь постійно розвивається. Так, вони можуть розрізнятися, залежно від мікроорганізмів, способу обробки та розміру. Їх поділяють на:

- профілактичні (які запобігають захворюванню шляхом введення антигенів здоровим людям і в основному розробляються для боротьби з інфекційними захворюваннями та, як правило, призначені для вироблення антитіл, які нейтралізують патоген (нейтралізуючі антитіла або NAb));
- терапевтичні (вводяться в якості постконтактної терапії для зміцнення імунної системи суб'єкта проти хронічної інфекції, передракових станів або вже існуючих захворювань, таких як рак, і призначені для індукції клітинного імунітету, що призводить до знищення інфікованих клітин) [18, с. 1-3];
- бактеріальні (були розроблені в період із 1882 по 1927 рік і зараз викликають сумніви їх сумнівну ефективність та погану переносимість більшості з них):
- живі атенуйовані (перші вироблені вакцини, створюють невидиму інфекцію з появою нейтралізуючих антитіл, а патогенність послаблюється шляхом пропускання мікроорганізму через культури клітин за несприятливих умов (температура, вид клітин) або хімічним шляхом);
- вбиті або інактивовані (після ідентифікації та ізоляції інфекційних агентів, їх розмножують у дуже великих кількостях, перш ніж знищити хімічним або термічним способом. Ці вакцини, не мають проблем з безпекою (за винятком

тих, що пов'язані з невідповідними імунологічними реакціями) і є хорошими імуногенами, здатними викликати задовільну і захисну гуморальну відповідь):

- анатоксини (отримані з бактеріальних токсинів, очищені і потім інактивованих шляхом хімічної обробки або нагрівання. Ефективність цих вакцин є задовільною, а механізми імунітету в цьому випадку покладаються виключно на стійкість нейтралізуючих антитіл);

- полісахаридні вакцини (корпускулярні бактеріальні вакцини на основі полісахаридів):

- очищені (їх називають вакцинами «старого покоління», вони захищають лише впродовж обмеженого часу і не можуть вводитися дітям віком до двох років);

- кон'юговані (капсульний полісахарид кон'югований з так званим білком-носієм і ця кон'югація перетворює тимонезалежну реакцію на тимозалежну, що робить ці вакцини імуногенними, починаючи з 6-го тижня життя, з посиленням захисту з часом).

- вірусні:

- живі атенуйовані (інфекційні агенти штамів вірусів розмножуються в лабораторії, поки вони природним або штучним чином не втратять свою патогенну природу шляхом мутації. Отримані штами не здатні повністю розвивати хворобу, яку вони раніше викликали, але зберігають свої антигени і здатність викликати імунну відповідь. Цей тип вакцин, як правило, більш ефективний і має більш тривалий ефект, ніж вакцина на основі інактивованих інфекційних агентів. Однак, оскільки вакцини складаються з життєздатних мікроорганізмів, зберігати їх стає дедалі важче);

- інактивовані вірусні вакцини (ці вбиті мікроорганізми розпізнаються імунною системою як будь-який інший екзогенний антиген і, відповідно, викликають низький рівень цитотоксичної активації Т-лімфоцитів);

- субодиничні вірусні вакцини (складаються з обмеженої кількості антигенів, виділених і очищених з віріону. Таким чином, вакцина містить лише ті компоненти, які необхідні для вироблення захисних антитіл) [20].

Однак, незважаючи на наявність такої різноманітності типів вакцин, на сьогодні контрольованими завдяки ним лишається, згідно з різними джерелами, лише близько 30 захворювань [1]. Це пояснюється викликами та проблемами в галузі вакцинології, наведеними нижче.

На думку дослідника Richard B. Kennedy, можна виокремити такі виклики, що стоять на шляху розробки вакцин:

- високі витрати на розробку вакцин, що постійно зростають;
- більш суворі вимоги до безпеки;
- очікування суспільства щодо 100% ефективності вакцини й одноразової дози зокрема;
- необхідність дотримання температурного режиму в холоді;
- необхідність швидко реагувати на глобальні спалахи захворюваності;
- тривалий період розробки продукту (зазвичай близько 10 років);
- обмежена кількість виробників вакцин;
- низька ефективність деяких ліцензованих вакцин;
- економічні інтереси стають вище за потреби громадського здоров'я;
- імунодеградація населення світу та погана реакція на більшість вакцин (зокрема через старіння та супутні проблеми зі здоров'ям);
- постійна поява нових патогенних мікроорганізмів з вищою трансмісивністю, смертністю або можливістю уникнути імунної відповіді (наприклад, туберкульоз, малярія та ВІЛ) та незнання їхньої природи;
- обмежена кількість схвалених і прийнятих ад'ювантів;
- невідповідна або шкідлива імунна відповідь, або ж недостатня її тривалість [27].

На рис. 1.5 ці та інші проблеми вакцинології поділені на 5 основних категорій: розуміння роботи імунітету, мінливість організму хворого, мінливість патогену, безпечність вакцини та фактори навколишнього середовища й місця перебування.

Слід також додати що геномна мінливість деяких патогенів та їхня здатність до швидкої мутації створює виклики для розробки вакцин і може призвести до ухилення від імунної відповіді, що робить наявні вакцини менш ефективними [18].

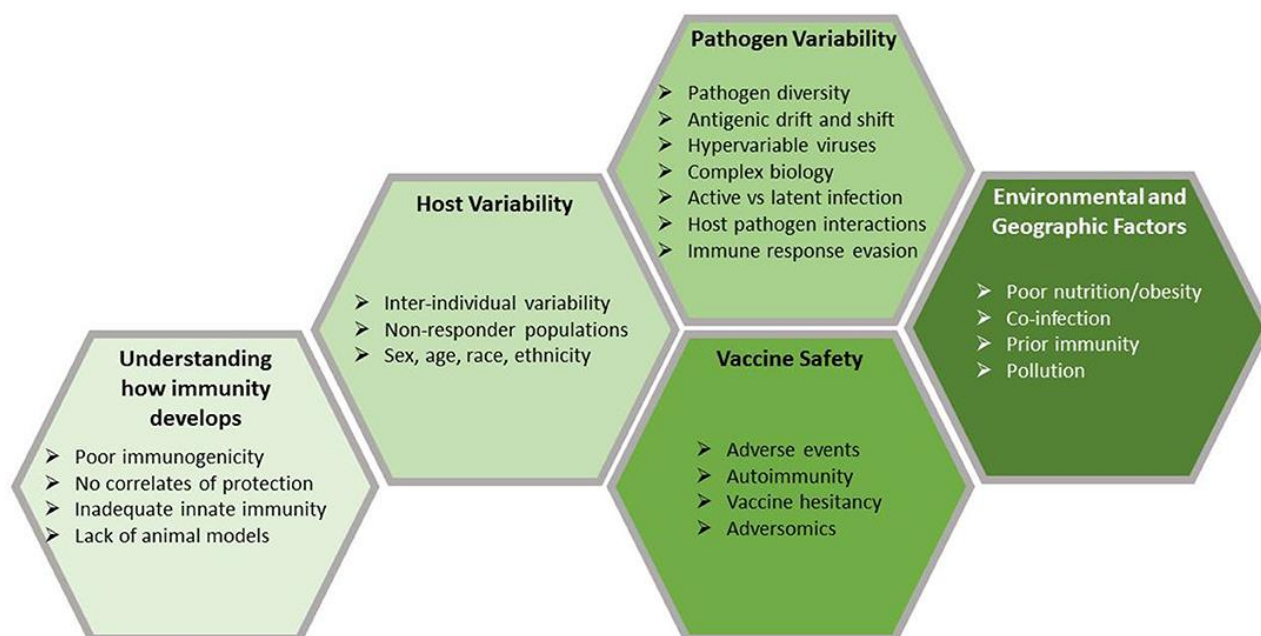


Рис. 1.5 Бар'єри на шляху до розробки вакцин

Helen H. Мао конкретизує проблеми самого процесу виробництва вакцин і наводить такі:

- матеріали, які використовуються у фазі клінічних випробувань, як правило, виробляються на промислових підприємствах. Для різних вакцин використовується багато різних технологічних платформ. Важко стандартизувати приміщення та обладнання. Для кожної вакцини або для кожного сімейства вакцин зазвичай потрібні унікальні приміщення та обладнання. Створення нового виробництва комерційного масштабу займає тривалий час (зазвичай 3-5 років), і часто потрібні великі капітальні інвестиції;
- успішне розширення виробництва вимагає глибокого розуміння процесів і проведення добре спланованих експериментів для завершення розширення виробництва;

- значні зміни у виробничих потужностях або виробничих процесах можуть вимагати схвалення регуляторних органів або навіть проведення додаткових клінічних випробувань;
- сучасні вакцини, як правило, чутливі до температури, вони потребують зберігання в холодильних камерах при температурі 2-8°C або навіть нижче (-20°C або -60°C), а також спеціального обладнання для наповнення та фінішної обробки, щоб уникнути потенційного забруднення. Це створює значні труднощі в управлінні виробництвом, зберіганні готової продукції та в управлінні ланцюгами поставок;
- через непередбачуваність попиту на сезонні вакцини (наприклад, вакцини проти грипу) та вакцини для екстреного використання (як вакцини проти лихоманки Ебола), виробники вакцин потребують завчасних закупівель і значного часу для підготовки сировини, приміщень і обладнання, контролю якості та людських ресурсів для виробництва цих вакцин [32].

Говорячи про вірус грипу, слід звернути увагу на такий факт: грип оминає нашу імунну систему через, з одного боку, невелику кількість мутацій у вірусному гені, що призводять до змін у ключових поверхневих глікопротеїнах (гемаглютинін НА та нейрамінідаза NA) та значну структурну зміну вірусу – з іншого, що призводить до появи нового НА та/або NA, які можуть бути віднесені до нового підтипу, що вимагає щорічної вакцинації [24]. Саме тому при розробці вакцин проти вірусу грипу виникає ряд питань.

По-перше, в цих вакцинах завжди присутній елемент «вгадування» на непостійна ефективність. Це пояснюється тим, що ВООЗ щорічно аналізує дані світового епіднагляду за вірусами, щоб визначити, який саме штам (штами) рекомендувати для різних регіонів, і невідповідність між «вгаданими» або «прогнозованими» штамми (компонентами вакцини) та фактично циркулюючими штамми вірусів у певний час у певному регіоні призводить до відносно низької ефективності вакцини. Більше того, для розщеплення різних штамів вірусу грипу потрібна різна кількість поверхнево-активної речовини, що відображає різну внутрішню структурну стабільність вірусу (неопубліковані спостереження

первинного автора). Це може призвести до того, що пропорції нерозщепленого вірусу будуть різними для вірусів різних штамів [24].

По-друге, регуляторні органи не поспішають впроваджувати нові розробки для вирішення проблем, пов'язаних з дослідженнями та розробкою вакцин. Так, для визначення вмісту НА та стабільності/потужності вакцин досі використовується метод однократної радіальної імунодифузії, який був розроблений іще в 1960-х роках і може давати значну похибку. У наш час були винайдені більш чутливі методи, проте вони не є прийнятими ні виробниками вакцин, ні регуляторними органами [24].

По-третє, на стабільність вакцини проти вірусу грипу впливають багато параметрів, таких як початкова концентрація титру, тип поверхнево-активної речовини, початкова та залишкова концентрація поверхнево-активної речовини, кількість етапів фільтрації та кінцева концентрація НА. Наразі у розробці та виробництві вакцин залишається ряд питань без відповідей:

- Які інші параметри процесу безпосередньо впливають на вихід вірусу?
- Який взаємозв'язок між виходом вірусу і штамом вірусу?
- Чи має імуносупресія значний вплив на вихід вірусу?
- Яка чутливість виходу вірусу до температури?
- Як впливає концентрація інокуляту на вихід вірусу?
- Які фактори росту та/або поживні речовини посилюють ріст вірусу та наскільки?
- Як тип іступінь глікозилювання вірусу впливають на його вихід?
- Як різні поверхнево-активні речовини та їх концентрації взаємодіють з вірусом?
- Як внутрішня стабільність вірусу впливає на стабільність кінцевого препарату?
- Чи можна розробити швидкі та чутливі методи ранжування/скринінгу ефективності?
- Як різні добавки впливають на стабільність?

Розуміння цих питань дозволить більш точно контролювати кожен етап виробництва вакцини та забезпечити стабільний вихід вірусу в кожній партії [24].

Окрім цього, для покращення поточного стану галузі вакцинування пропонується посилити епіднагляд і моніторинг для отримання швидкого та ефективного контролю над патогенами, що мають епідемічний та пандемічний потенціал. Платформи наступного покоління також можуть бути використані для ідентифікації більш консервативних послідовностей як імуногенів для подолання антигенної різноманітності цих патогенів. Крім того, підхід «якість через дизайн», що поєднує нову якісну методологію з кількісною моделлю біопроектів, може бути використаний для підвищення надійності та масштабованості виробництва. Нарешті, структуру та імуногенний компонент патогену можна краще зрозуміти і передбачити за допомогою машинного навчання та комп'ютерного аналізу. Штучний інтелект також може допомогти спрогнозувати еволюцію вірусів і допомогти впоратися з новими їх варіантами. Генерування потужної імунної відповіді у людей з ослабленим імунітетом і людей похилого віку - ще одне поле можливостей для майбутньої розробки вакцин. Краще розуміння імунної біології, включаючи імуногенез, запальне старіння і вибір ад'ювантів, може сприяти розробці вакцин, здатних викликати більш потужну відповідь у людей похилого віку та осіб з ослабленим імунітетом [18, с. 23].

Окремим рішенням викликів у цій галузі слід зазначити геноміку. За останнє десятиліття були розроблені і створені нові вакцини, включаючи ліцензовану вакцину проти менінгококу В, з використанням підходів, заснованих на геноміці, таких як вакциноміка (яка має на меті зрозуміти геномні та системні дані для з'ясування основ міжіндивідуальних варіацій імунної відповіді), реверсивна вакцинологія (яка використовує інформацію про генетичну послідовність для ідентифікації імуногенних антигенів). Зі зростанням складності і зниженням вартості генних аналізів і технологій секвенування наступного покоління геноміка прискорює розробку нових вакцин у XXI столітті [27].

Геноміка та новітні геномні технології вплинули на розробку вакцин і можуть допомогти подолати як ті бар'єри в розробці вакцин, що існують уже тривалий час,

так і ті, що пов'язані з появою нових патогенів, які мають важливе значення для громадського здоров'я. На рис. 1.6 показано так звані інструменти геноміки, застосування яких може по-справжньому революціонізувати процес проектування, розробки, тестування і впровадження вакцин [27].

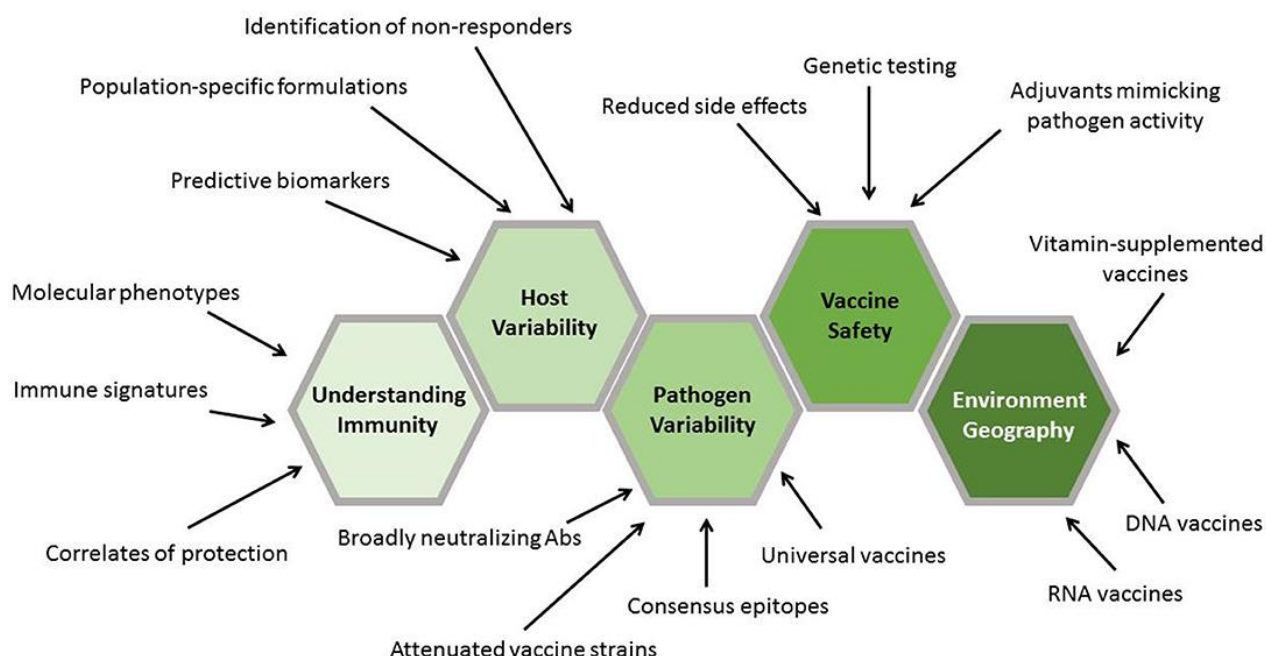


Рис. 1.6 Внесок геноміки в етапи розробки вакцин

Висновки до розділу 1

Вірус грипу належить до родини *Orthomyxoviridae* і поділяється на чотири типи: А, В, С, D. Вірус має плеоморфну форму та складається з ліпідної оболонки з вірусними білками, включаючи глікопротеїни НА і NA, і внутрішньої білкової оболонки, що захищає геном. Геном вірусу грипу А містить 8 сегментів РНК та кодує 11 білків. Віруси типів А, В та С є збудниками респіраторних захворювань, причому вірус А має високий пандемічний потенціал через здатність до адаптації. Грип викликає сезонні спалахи, причому вірус H1N1 та H3N2 постійно циркулюють серед людей. Пташині й свинячі штами вірусу можуть заражати людей, викликаючи небезпечні пандемії, наприклад, «великий грип» 1918 року.

Дикі птахи є природними носіями вірусу грипу, а свині можуть виступати проміжними господарями. Вірус грипу H1N1, H1N2 і H3N2 поширений серед свиней, і ці тварини можуть стати джерелом нових штамів грипу для людей.

Вакцини є найефективнішим інструментом громадського здоров'я для боротьби з інфекційними захворюваннями. Створення нових вакцин – це повільний, систематичний, дорогий і складний процес. І хоча в цій галузі наразі спостерігається значний прогрес, робота ще далека від завершення; залишаються значні виклики, перелічені в розділі 1. Для їх подолання й успішної розробки безпечних і ефективних вакцин, які знайдуть широке застосування, необхідна координація між науковцями, лікарями, посадовими особами системи охорони здоров'я, промисловістю, розробниками вакцин і суспільством. Нещодавні досягнення в галузі геномних технологій можуть допомогти знайти необхідні рішення.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Вибір та характеристика об'єкту та предмету дослідження

За об'єкт дослідження було взято основні поверхневі глікопротеїни вірусу грипу, гемаглютинін і нейрамінідазу, які домінують на поверхні віріонів і на які направлена дія нейтралізуючих антитіл.

Гемаглютинін (НА), що кодується четвертим сегментом, є важливим глікопротеїном і основним поверхневим антигеном, який відповідає за прикріплення віріонів до організму господаря, визначаючи патогенність і вірулентність [51, с. 52–79].

Шостий сегмент кодує нейрамінідазу (НА), яка є другим основним поверхневим антигеном, пов'язаним з вивільненням новоутворених вірусних частинок і стійкістю до ліків [51, с. 52–79].

Крім мутацій, які виникають внаслідок впливу антигенів, НА і NA вірусів грипу А (IAV) можуть існувати в різних формах. На сьогодні ідентифіковано 16 НА і 9 NA підтипів вірусу грипу типу А [16, с. 14–22] і виявлено більше сотні з можливих 144 комбінацій НА-NA [4, с. 37–44]. IAV підтипів H1N1 та H3N2 є ендемічними для людини, постійно циркулюють серед населення та спричиняють сезонні спалахи захворюваності. Зоонозна передача вірусів з деякими іншими комбінаціями НА і NA (наприклад, H5N1, H7N9 і H9N2) від птахів і свиней відбувається спорадично, однак ці віруси повинні набути додаткових мутацій, щоб легко передаватися між людьми [13, с. 407–421; 21, с. 342–360]. Якщо віруси з новим підтипом НА, який часто супроводжується новим підтипом NA, набудуть цієї здатності, існує потенційна загроза нової пандемії, оскільки ніхто не матиме імунітету нейтралізуючих антитіл до нового вірусу.

Функції як гемаглютиніну, так і нейрамінідази, включають взаємодію з сіаловою кислотою, кінцевою структурою, пов'язаною з основними залишками цукру, що експресуються глікопротеїнами або гліколіпідами на поверхні клітин [16]. Зв'язування НА з сіаловими кислотами, представленими клітинними

рецепторами, запускає проникнення в клітину шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу, хоча можуть бути використані й інші ендоцитарні шляхи, включаючи мікропіноцитоз [16]. Основна функція NA відбувається на фінальній стадії інфікування. Вірусна NA видаляє сіалові кислоти як з клітинних рецепторів, так і з новосинтезованих NA і HA на віріонах, що формуються, які були сіалізовані в рамках процесів глікозилювання в клітині-господарі [16]. Розщеплення сіалових кислот NA запобігає агрегації віріонів і припиняє зв'язування вірусу з клітиною-хазяїном, що гине, через HA, що дозволяє ефективно вивільняти похідні вібріони та поширюватися на нові клітини-мішені [16]. Схема взаємодії вірусу та клітини господаря, а також репродукції вірусу наведено на рис. 2.1.

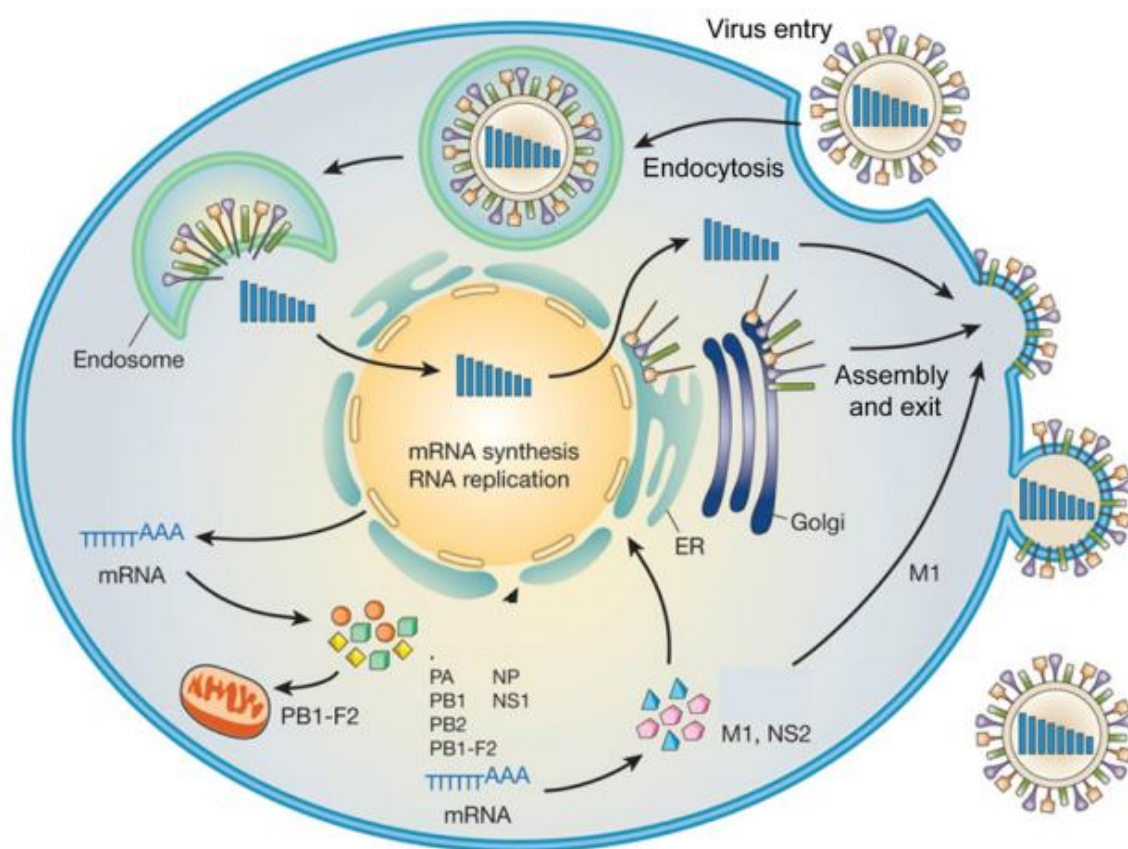


Рис. 2.1 Взаємодія вірусу грипу з чутливою клітиною

Роль вірусного HA в прикріпленні та інфікуванні вивчена добре, проте дослідження ролі NA в інфекційному циклі IAV здебільшого обмежуються його роллю у вивільненні похідних вібріонів із інфікованих клітин. Більшість робіт,

присвячених NA, зосереджені на вірусних інгібіторах, які націлені на неїта блокують цю функцію. Попри те, що деякі дослідники припускають, що функція NA не впливає на ранню стадію інфікування IAV [16], існують думки, що сіалідазна активність NA допомагає вірусу отримати доступ до клітин, каталізуючи розщеплення сіалових кислот, представлених рецепторами-приманками, такими як муцини [16], що потенційно надає NA важливого значення у проникненні вірусу в клітину. Крім того, експерименти, що демонструють зменшення інфікування клітин у присутності препаратів, що блокують NA, свідчать про одну з головних ролей NA на етапі проникнення вірусу [16].

Гемаглютинін посідає важливе місце під час проникнення вірусів грипу в клітину. Цей білок є ключовим на початкових етапах інфекції, оскільки він відповідає за прикріплення вірусу до клітинного рецептора. Ця взаємодія частково пояснює діапазон господарів і тканинний тропізм вірусів грипу [54, с. 1691-1740]. Амінокислоти в активній ділянці NA відіграють вирішальну роль у зв'язуванні та специфічності рецептора. Так, наявність глутаміну і гліцину в амінокислотних залишках 226 і 228 в NA підтипів H2 і H3 дозволяє розпізнавати пташині рецептори, тоді як залишки лейцину і серину в тих же позиціях забезпечують зв'язування з рецепторами людини [6, с. 286-295 ; 12, с. 17-23 ; 35, с. 567-569 ; 41, с. 361-373].

З іншого боку, у випадку NA підтипу H1 залишки глутамінової кислоти і гліцину в залишках 190 і 225 відповідають за взаємодію з пташиними рецепторами, тоді як наявність аспарагінової кислоти в тих же залишках забезпечує специфічність зв'язування з людськими рецепторами [19, с. 533-536 ; 45, с. 43-55 ; 50, с. 655-659]. Штами грипу А (H1N1) 2009, які були охарактеризовані до цього часу, мають аспарагінову кислоту в амінокислотних залишках 190 і 225, що частково пояснює його здатність інфікувати людей [17, с. 197-201 ; 36, с. 931-939]. Крім того, що гемаглютинін відповідає за прикріплення вірусу до клітини, він є критично важливим для проникнення вірусу всередину клітини, оскільки він опосередковує злиття вірусної та клітинної мембран. Крім того, він є основною мішенню для нейтралізуючих антитіл [54, с. 1691-1740].

НА – це паличкоподібний білок, який має трансмембранний домен, що вбудовується у вірусну мембрану, і глобулярну головку, що складається з трьох ідентичних доменів, які утворюють шип, що виступає з вірусної поверхні. Глобулярна головка має щонайменше п'ять передбачуваних антигенних сайтів, які оточують сайт зв'язування рецептора у штаму А (H1N1) 1918 [45, с. 66-70]. Білок НА синтезується як попередник молекули НА₀, яка посттрансляційно розщеплюється на домени НА 1 і НА 2. Це розщеплення є важливим для вірусної реплікації, оскільки в умовах низького рН в ендоцитарних везикулах, воно дозволяє конфірмаційну зміну НА, яка вивільняє гідрофобний пептид, розташований на амінокінцевій ділянці домену НА 2. Цей пептид необхідний для злиття вірусної та клітинної мембран, що дозволяє вихід вірусного рибонуклеопротеїнового комплексу в цитоплазму [44, с. 231-241].

Білок НА є критично важливим фактором, що визначає вірулентність і патогенність вірусів грипу, з чітким зв'язком між розщепленням і вірулентністю. Високовірулентні штами пташиного грипу (H5 і H7) мають білок НА з кількома основними амінокислотними залишками в місці розщеплення, які розпізнаються протеазами, присутніми всюди; таким чином, інфікування цими штамами може призвести до системного поширення вірусу. З іншого боку, штами з низькою вірулентністю мають білки НА з одним залишком аргініну в місці розщеплення і розщеплюються лише тканинно-специфічними протеазами, такими як триптаза Clara, що призводить до інфекцій, які зазвичай є локалізованими і протікають у легкій формі [22, с. 74-78]. Штами грипу А (H1N1)-2009 мають лише один аргінін у місці розщеплення НА [17, с. 197-201 ; 33, с. 931-939].

Білок нейрамінідаза (NA) вірусу грипу А – це глікопротеїн, що експресується на поверхні вірусу. Його основна біологічна роль полягає у відщепленні кінцевих залишків сілової кислоти, які є рецепторами для білка гемаглютиніни [37, с. 159–163].

NA є тетрамером і складається з чотирьох ідентичних поліпептидів. Вбудовуючись в оболонку вірусу, вона становить приблизно 10-20% від загальної кількості глікопротеїнів на поверхні віріона, з приблизно 40-50 шипами NA і 300-

400 шипами НА на вібріоні, середня довжина якого становить 120 нм [16]. Чотири мономери, кожен з яких складається приблизно з 470 амінокислот (які є у всіх вірусах грипу А), об'єднуються в чотири окремі структурні домени: цитоплазматичний хвіст, трансмембранну ділянку, стебло і головку (рис. 2.2).

Кріоелектронно-томографічні дослідження показали, що тетрамер НА існує у вигляді локальних кластерів на поверхні віріона або у вигляді ізольованих шипів, оточених НА [16]. Залежно від довжини стеблової ділянки, НА може виступати трохи більше або менше [16] над вірусною оболонкою, ніж НА, що може впливати на загальну ферментативну активність вірусу [34].

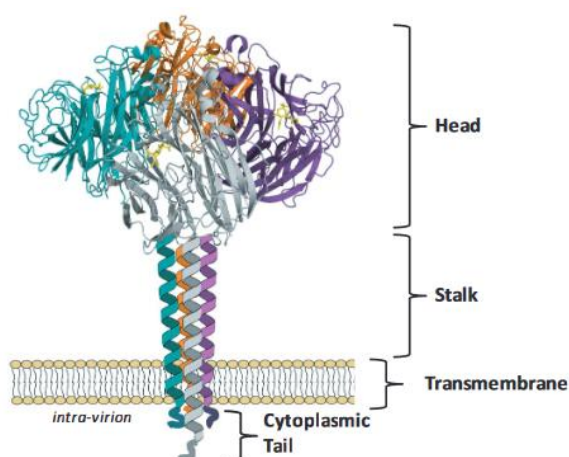


Рис. 2.2 Будова нейрамінідази [34]

Видалення цих залишків з поверхні інфікованих клітин і новоутворених вірусів запобігає злипанню вірусів, що формуються, один з одним або з поверхнею клітин [37, с. 159–163]. Вважається, що здатність розщеплювати сіалову кислоту також допомагає вірусу проникати в слиз [6, с. 227–233]. НА, як поверхневий білок, також є мішенню для імунної системи людини. Оскільки НА функціонує головним чином у вивільненні новоутворених вірусних частинок, антитіла проти неї не запобігають початковому інфікуванню, однак різко обмежують її поширення. Разом з іншим основним поверхневим білком грипу, НА, НА демонструє більшу генетичну мінливість, ніж інші гени грипу.

Головка білка NA містить щонайменше дві антигенні ділянки; амінокислоти, що входять до їхнього складу, можуть дозволити вірусу «обійти» імунітет [53, с. 93–104]. Відомо, що в організмі людини в 1957 році новий підтип нейрамінідази N2 замінив раніше циркулюючий підтип N1. Зміна NA не є критичною для виникнення пандемії, оскільки пандемічний штам 1968 року виник із раніше циркулюючого N2. Однак вважається, що колективний імунітет до N2 зменшив тяжкість пандемії 1968 року [10, с. 225–228].

Матеріалом для дослідження слугували білки HA та NA, знайдені в нуклеотидних послідовностях представників родів *Homo* та *Sus* і виду *Aves*. Усього було відібрано 72 нуклеотидні послідовності, порівну для кожного роду та виду. Результати їхнього вивчення наведено в розділі 3.

2.2. Методи проведення дослідження

2.2.1 Бази даних нуклеотидних послідовностей

Для виконання поставлених задач здійснювали пошук нуклеотидних послідовностей консервативних ділянок геномів представників родів *Homo* та *Sus* і виду *Aves* у електронній базі даних NCBI (National Center for Biotechnology Information). Вона надає засоби для надсилання та завантаження даних, програмне забезпечення для аналізу та візуалізації, освітні заходи та матеріали про продукти NCBI, а також програмне забезпечення та послуги для підтримки зростаючої спільноти розробників. Завдання NCBI полягає в допомозі в пошуку нових підходів до роботи з великими обсягами даних і в наданні дослідникам більшого доступу до аналізу та обчислювальних інструментів для покращення розуміння генетичної спадщини [34].

Власне Національний центр біотехнологічної інформації було створено ще в 1988 році як підрозділ Національної медичної бібліотеки, яка, будучи частиною Національного інституту здоров'я, могла мати внутрішню дослідницьку програму з обчислювальної молекулярної біології. З того часу обсяг і різноманітність даних, які зберігаються в NCBI, надзвичайно розширилися, і їх можна загалом згрупувати в шість категорій: література, здоров'я, геноми, гени, білки та хімічні речовини.

Компоненти колективних досліджень Національного інституту здоров'я складають найбільший біомедичний дослідницький центр у світі [34].

Місія NCBI як національного ресурсу інформації з молекулярної біології полягає в розробці нових інформаційних технологій, які допоможуть зрозуміти фундаментальні молекулярні та генетичні процеси для підтримки здоров'я та контролювання захворювань. Зокрема, NCBI було доручено створити автоматизовані системи для зберігання та аналізу даних про молекулярну біологію, біохімію та генетику; сприяння використанню таких баз даних і програмного забезпечення дослідницькою та медичною спільнотою; об'єднання зусиль зі збору біотехнологічної інформації як на національному, так і на міжнародному рівнях; проведення досліджень передових методів комп'ютерної обробки інформації для аналізу структури та функцій молекул [34].

NCBI проводить дослідження фундаментальних біомедичних проблем на молекулярному рівні з використанням обчислювальних методів; співпрацює з декількома підрозділами Національного інституту здоров'я, академічними колами, промисловістю та іншими державними установами; сприяє науковому обміну, спонсорує зустрічі, семінари та цикли лекцій, підтримує навчання з фундаментальних і прикладних досліджень у галузі обчислювальної біології для постдокторантів через Програму внутрішнього дослідження Національного інституту здоров'я; розробляє, поширює, підтримує та координує доступ до різноманітних баз даних і програмного забезпечення для наукових і медичних спільнот; розробляє та просуває стандарти для баз даних, зберігання та обміну даними, а також біологічної номенклатури [34].

NCBI має багатодисциплінарну дослідницьку групу, що складається з комп'ютерників, молекулярних біологів, математиків, біохіміків, лікарів-дослідників і структурних біологів, які зосереджуються на фундаментальних і прикладних дослідженнях у сфері обчислювальної молекулярної біології. Вони не тільки роблять важливий внесок у фундаментальну науку, але й винаходять нові методи для прикладної дослідницької діяльності, вивчаючи фундаментальні біомедичні проблеми на молекулярному рівні з використанням обчислювальних

методів. Такі проблеми включають, наприклад, організацію генів, аналіз послідовності та прогнозування структури. Наразі дослідницькі проєкти включають: виявлення та аналіз організації генів, шаблонів повторюваних послідовностей, білкових доменів і структурних елементів, створення генної карти геному людини, математичне моделювання кінетики ВІЛ-інфекції, аналіз ефектів помилок секвенування для пошуку в базі даних, розробка нових алгоритмів для пошуку в базі даних і вирівнювання множинних послідовностей, побудова баз даних без надлишкових послідовностей, математичних моделей для оцінки статистичної значущості подібності послідовностей і векторних моделей для пошуку тексту. Крім того, дослідники NCBI підтримують постійну співпрацю з Національним інститутом здоров'я, а також із численними академічними та державними дослідницькими лабораторіями [34].

Дослідницька програма у відділенні комп'ютерної біології зосереджена на теоретичних, аналітичних і прикладних підходах до широкого кола фундаментальних проблем молекулярної біології. Експертиза групи зосереджена на аналізі послідовностей, структури та функцій білків, хімічній інформатиці та аналізі геномів. Дослідницькі інтереси також охоплюють широкий спектр тем з обчислювальної біології та інформатики. До них належать алгоритми пошуку в базі даних, ідентифікація сигналу послідовності, математичні моделі еволюції, статистичні методи у вірусології, динамічна поведінка систем хімічних реакцій, статистичні алгоритми текстового пошуку, прогнозування структури та функцій білків, порівняльна геноміка, таксономіка дерева, популяційна генетика та системна біологія [34].

Багато фундаментальних дослідницьких проєктів служать для збагачення загальнодоступних баз даних і інструментів програмного забезпечення NCBI. Спільні зусилля дослідників NCBI і зовнішнього дослідницького співтовариства привели до розробки інноваційних алгоритмів (BLAST, PSI-BLAST, VAST і COG), нових підходів до дослідження та створення і фундаментальних ресурсів (PubChem і CDD), які змінили сферу обчислювальної біології. Алгоритми та програми, які зараз розробляються, мають потенціал для подальшого просування наукових

відкриттів. Дослідники співпрацюють, щоб визначити нові сфери аналізу та відповідні обчислювальні механізми [34].

Національний центр біотехнологічної інформації (NCBI) надає великий набір онлайн-ресурсів для біологічної інформації та даних, включаючи базу даних послідовностей нуклеїнових кислот GenBank і базу даних PubMed цитат і рефератів, опублікованих у наукових журналах. Система Entrez забезпечує операції пошуку та отримання більшості цих даних із 38 різних баз даних. Електронні утиліти служать інтерфейсом програмування для системи Entrez. Багато веб-додатків доповнюються спеціальними реалізаціями програми BLAST, оптимізованою для пошуку спеціалізованих наборів даних. Нові ресурси, випущені минулого року, включають PubMed Labs і новий пошук у базі даних послідовностей. Ресурси, оновлені минулого року, включають PubMed, PMC, Bookshelf, ресурс для перегляду геномних даних, Assembly – для розгляду прокаріотичних геномів, а також Genome, BioProject, dbSNP, dbVar, бази даних BLAST, igBLAST, iCn3D і PubChem [34].

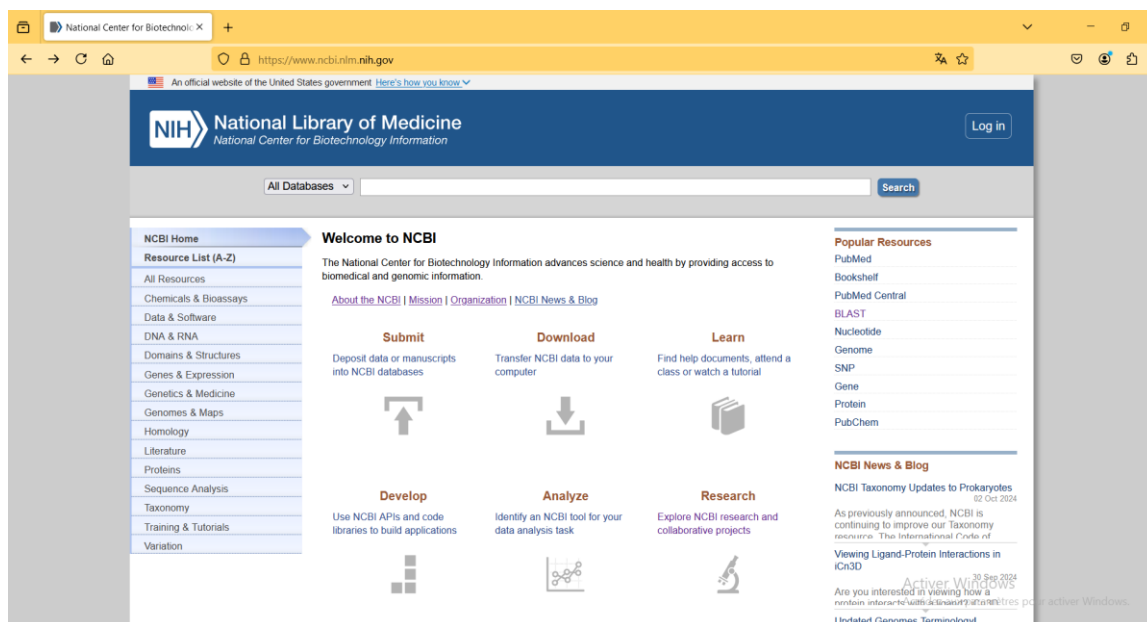


Рис. 2.3 Інтерфейс бази даних NCBI [3]

2.2.2 Аналіз нуклеотидних послідовностей та філогенетичний аналіз

Для реалізації методу парного вирівнювання послуговувалися програмою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), яка входить до функціоналу бази NCBI.

BLAST — широко використовуваний інструмент для пошуку збігів із послідовністю запитів у великій базі даних послідовностей, такій як Genbank. BLAST призначений для пошуку локальних вирівнювань, тобто максимальних областей високої схожості між послідовністю запиту та послідовністю бази даних, що дозволяє вставляти та видаляти сайти. Незважаючи на те, що оптимальне рішення цієї проблеми не піддається обчисленням, BLAST використовує ретельно розроблену та перевірену евристику, яка дозволяє виконувати пошук дуже швидко (часто за секунди). Для кожного порівняння BLAST повідомляє оцінку добротності та оцінку очікуваної кількості збігів із рівним або вищим балом, ніж було б знайдено випадково, враховуючи характеристики послідовностей. Коли це очікуване значення дуже мале, послідовність із бази даних вважається «хітом» і ймовірним гомологом послідовності запиту [7].

BLAST знаходить подібні ділянки між послідовностями. Програма порівнює нуклеотидні або білкові послідовності з базами даних послідовностей і обчислює статистичну значущість збігів. BLAST можна використовувати для висновку про функціональні та еволюційні зв'язки між послідовностями, а також для ідентифікації членів сімейств генів [34].

Для здійснення множинного вирівнювання було використано програму Clustal. Вона широко використовується в молекулярній біології для множинного вирівнювання послідовностей нуклеїнових кислот і білків, а також для підготовки філогенетичних дерев. Популярність залежить від низки факторів, у тому числі не лише від точності результатів, але й від надійності, портативності та зручності програми. Нові функції включають вихід форматів NEXUS і FASTA, друк чисел діапазону та швидші обчислення філогенетичних дерев. Хоча спочатку Clustal був розроблений для роботи на локальному комп'ютері, було створено численні веб-сервери, зокрема в Європейському інституті біоінформатики [3].

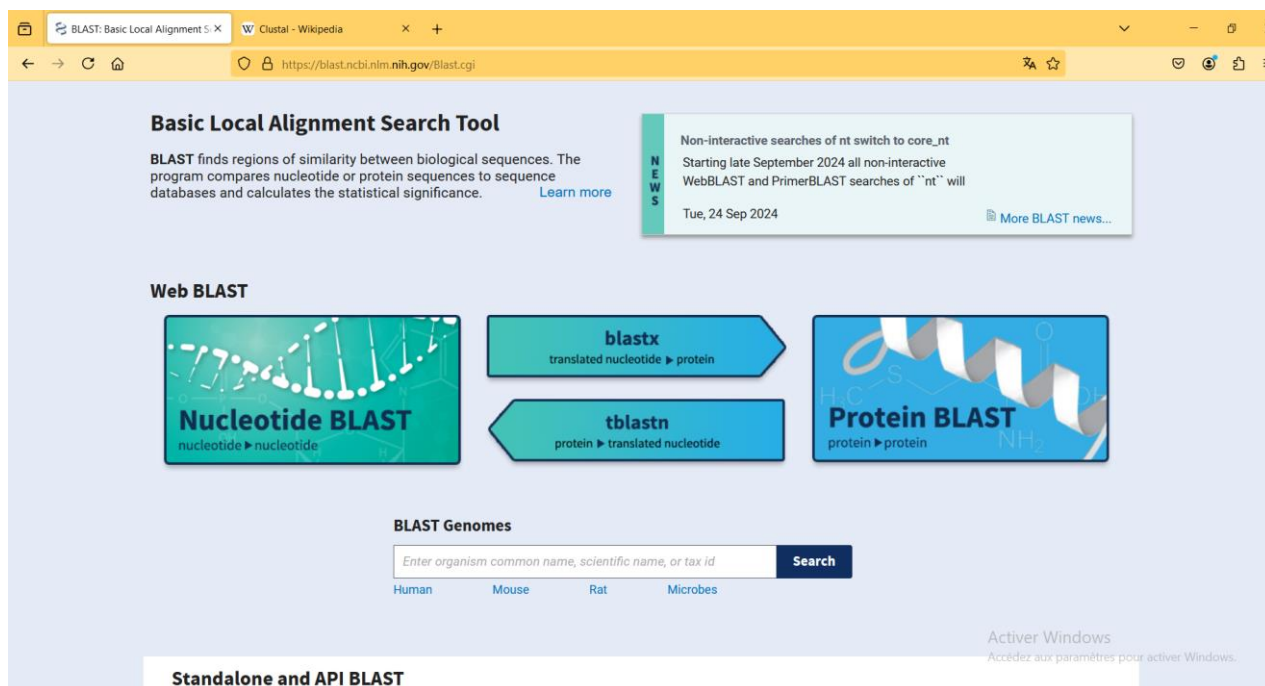


Рис. 2.4 Інтерфейс інструменту для пошуку збігів між послідовностями BLAST

Одним із наріжних каменів сучасної біоінформатики є порівняння або вирівнювання білкових послідовностей. За допомогою численних вирівнювань послідовностей біологи можуть вивчати закономірності послідовності, що збереглися в ході еволюції, і родові зв'язки між різними організмами. Послідовності можна вирівнювати по всій довжині (глобальне вирівнювання) або лише в певних областях (локальне вирівнювання). Найбільш широко використовувані програми для глобального множинного вирівнювання послідовностей належать до серії програм Clustal. Перша програма Clustal була написана Десом Хігінсом у 1988 році і була розроблена спеціально для ефективної роботи на персональних комп'ютерах, які на той час мали слабку обчислювальну потужність за сучасними стандартами. Він поєднав алгоритм динамічного програмування, що ефективно використовує пам'ять зі стратегією прогресивного вирівнювання. Множинне вирівнювання поступово створюється серією попарних вирівнювань відповідно до порядку розгалуження в направляючому дереві. Для початкового попереднього порівняння використовувався швидкий алгоритм вирівнювання на основі слів, а дерево було побудовано за допомогою методу UPGMA. У 1992 році було створено нову версію під назвою ClustalV, яка містила

вирівнювання профілів (вирівнювання вже наявних вирівнювань) і можливість генерувати дерева з множинного вирівнювання за допомогою методу з'єднання сусідніх. Третє покоління серії, ClustalW, випущене в 1994 році, включило ряд удосконалень в алгоритм вирівнювання, таких як зважування послідовності та автоматичний вибір відповідної матриці порівняння залишків на кожному етапі в множинне вирівнювання. Крім того, приблизний пошук слів, що використовувався для етапу попереднього порівняння, було замінено більш чутливим алгоритмом динамічного програмування, а конструкція дендограми за допомогою UPGMA була замінена на NJ [3].

Розробка серії Clustal була необхідна для того, щоб надати надійні, портативні програми, здатні забезпечувати якісне, біологічно точне та відносно швидке вирівнювання. Тісна співпраця між біологами та комп'ютерними вченими є, ймовірно, однією з головних причин успіху та подальшого широкого використання програм Clustal. ClustalW привів до низки розробок, включаючи останню, ClustalX. У ній присутні численні параметри, такі як перевирівнювання вибраних послідовностей або вибраних блоків вирівнювання та можливість побудови складних вирівнювань по частинах, що робить ClustalX ідеальним інструментом для інтерактивної роботи над вирівнюваннями [3].

І ClustalW, і ClustalX активно підтримуються та оновлюються. Останні вдосконалення включали можливість збереження як вирівнювання, так і філогенетичних дерев у форматі NEXUS для сумісності з низкою філогенічних програм. Остання версія програм містила чотири основні вдосконалення. Перша модифікація — це можливість зберегти результат множинного вирівнювання як файл у форматі FASTA для сумісності з низкою інших програмних пакетів. Друга — надати матрицю ідентичності у відсотках. Третім новим параметром є можливість збереження діапазону залишків у вихідному файлі під час збереження визначеного користувачем діапазону вирівнювання. Це особливо корисно при виділенні одного домену з вирівнювання багатодомених білків. Четвертим удосконаленням в останній версії є включення швидшої реалізації алгоритму NJ, який використовується для побудови дерев під час процесу множинного вирівнювання,

а також для побудови філогенетичних дерев на основі остаточного вирівнювання [3].

Для проведення філогенетичного аналізу знадобилася програма GenBank.

GenBank — це база даних генетичних послідовностей Національного інституту здоров'я, коментована колекція всіх загальнодоступних послідовностей ДНК. GenBank є частиною Міжнародного співробітництва баз даних нуклеотидних послідовностей, до складу якого входять Банк даних ДНК Японії, Європейський архів нуклеотидів і GenBank при NCBI. Між ними постійно відбувається обмін даними. Оновлення GenBank відбувається кожні два місяці. Примітки до випуску поточної версії GenBank містять детальну інформацію про оновлення і сповіщення про майбутні зміни в GenBank. База даних GenBank розроблена, щоб забезпечити та заохотити наукове співтовариство отримати найновішу та повну інформацію про послідовність ДНК [34].

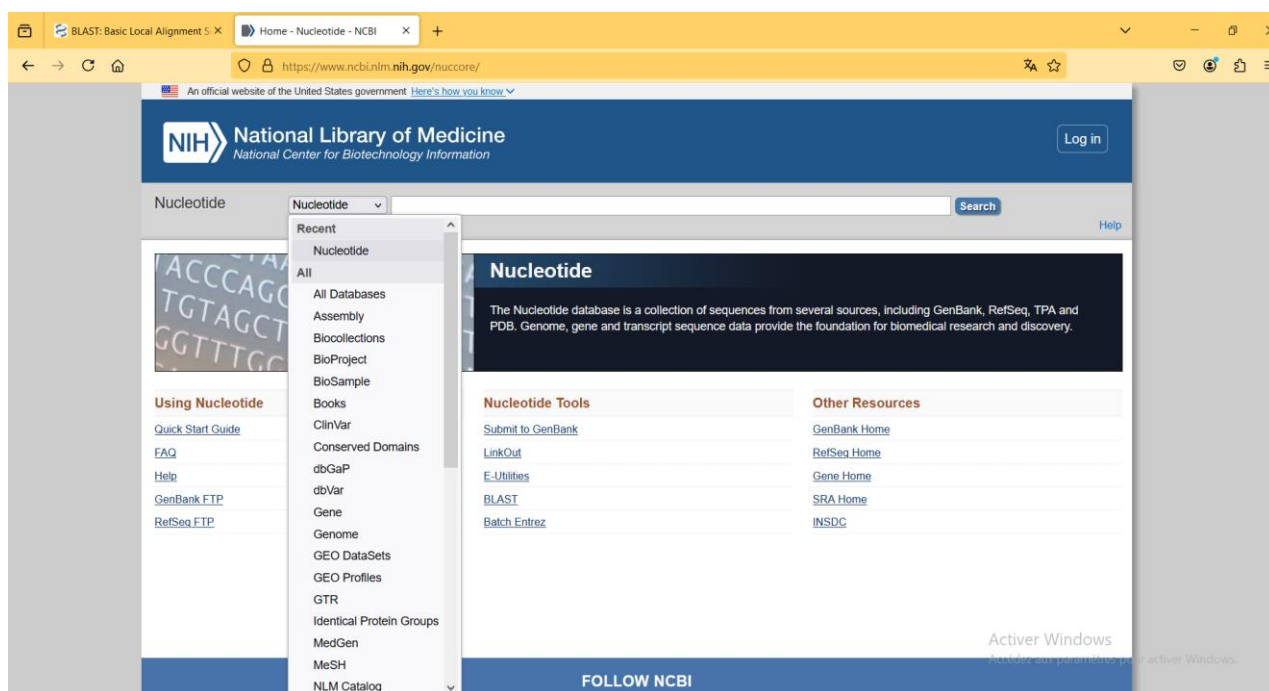


Рис. 2.5 Інтерфейс програми GenBank

Резервуарами вірусів грипу А традиційно вважаються водоплавні птахи, такі як качки та чайки. Популяції цих тварин є, як правило, інфікованими в сезон осінньої міграції та містять до 20% хворих представників [23].

Вірус грипу у птахів представлений 16 підтипами гемаглютиніну (НА) і 9 підтипами нейрамінідази (НА), крім того, зазвичай, захворювання у цих птахів протікає безсимптомно. Іноді вірус грипу А здатний переміщуватися від водних птахів, місцем свого зберігання, до свійської птиці або різних видів ссавців, долаючи захисні бар'єри цих тварин [22]. Також вірус цього типу здатний інфікувати людину, що призводить до спорадичних інфекцій, епідемій захворювань або пандемій.

Хоча взаємодія між птахами та ссавцями має вирішальне значення для розуміння появи вірусу грипу А, наші знання про екологію та еволюцію грипу в цілому різко змінилися з появою нових методів і підходів метагеномного секвенування, що дозволяє проаналізувати геномне різноманіття організмів у певному середовищі.

Перша ознака того, що філогенетичне різноманіття вірусів грипу А було більшим, ніж у моделі 16НА-9НА птах-ссавець— це виявлення штамів вірусу у фруктових кажанів (*Artibeus* spp.) з Центральної та Південної Америки, що виявляли надзвичайно високий рівень мінливості [44]. Ці штами вірусу грипу, виявлені у кажанів, представляли унікальні підтипи, H17N10 і H18N11, при чому рівень поліморфізму послідовностей деяких генів був вищим, ніж між усіма іншими відомих вірусів грипу птахів і ссавців разом. Ці ознаки вказують на тривалий еволюційний зв'язок між цими вірусами та їхніми кажанами-хазяїнами, а також на давнє відокремлення від вірусних ліній, виявлених у птахів та інших ссавців. Хоча було висловлене припущення, що штами вірусу грипу А кажанів мають біологічні властивості, необхідні для зараження людей, включно з використанням головного комплексу гістосумісності (МНС)-II як посередника інфікування [21, с. 109–112]. Однак, ці віруси можуть погано реплікуватися в деяких клітинних лініях ссавців [7].

Залишається загадкою, чому було ідентифіковано так мало послідовностей геному вірусу грипу кажанів, а єдиний інший відомий вірус кажанів, схожий на H9N2-подібний варіант, нещодавно виявлений у єгипетських кажанів і не настільки відрізняється від вірусів з Південної Америки [20].

Найбільш імовірне пояснення полягає у тому, що не були відібрані правильні популяції, і що ці віруси присутні з низьким рівнем поширеності та/або викликають лише короточасні інфекції, так що шанси виявити віруси, які активно реплікуються, є незначними. Дійсно, великий розрив у філогенезі, який пов'язує віруси гриппу кажанів з вірусами інших видів, свідчить про дуже обмежену вибірку вірусного різноманіття. Тому неминуче, що в майбутньому буде виявлено більше вірусів гриппу ссавців, у тому числі кажанів.

Ще більше несподіванок щодо кола хазяїв вірусів гриппу з'явилося завдяки масштабному метагеномному (зокрема, РНК) секвенуванню різних видів хребетних тварин. Масштабне метатранскриптомне дослідження різноманітних вірусів хребетних виявило, що послідовності, чітко пов'язані з відомими вірусами грипу, присутні у земноводних, риб і навіть у риби-пікші (*Eptatretus burgeri*), безщелепного і базального виду хребетних [35, с. 197–202]. Той факт, що ці віруси були відібрані від, здавалося б, здорових тварин, попередньо вказує на те, що вони представляють варіанти з низькою патогенністю. Примітно, що філогенез цих вірусів загалом відповідає філогенезу видів хазяїв, від яких вони були відібрані, хоча і з очевидними випадками “стрибків” хазяїна (рис. 2.6).

Ця закономірність переконливо свідчить про те, що віруси гриппу та їхні хазяї, ймовірно, еволюціонували протягом усієї еволюційної історії хребетних. Якщо це так, то в кінцевому підсумку буде ідентифіковано набагато більше вірусів гриппу від різних хребетних. Таким чином, хоча дикі водоплавні птахи справедливо вважаються основним джерелом тих вірусів грипу, які з часом з'являються у людини, вони є лише віхами в набагато давнішій еволюційній історії. Перехід від одного хазяїна до іншого, який лежить в основі злиття хвороб, відбувається на цьому фундаменті давньої кодидивергенції вірусу і хазяїна.

Особливо слід зазначити, що найближчий родич вірусу грипу В людини, виявлений на сьогоднішній день, походить від риби (*Mastacembelus aculeatus*), що знову ж таки свідчить про те, що різноманітний набір вірусів гриппу В, подібних до вірусу гриппу В, з часом буде знайдений і в інших видах хребетних [35].

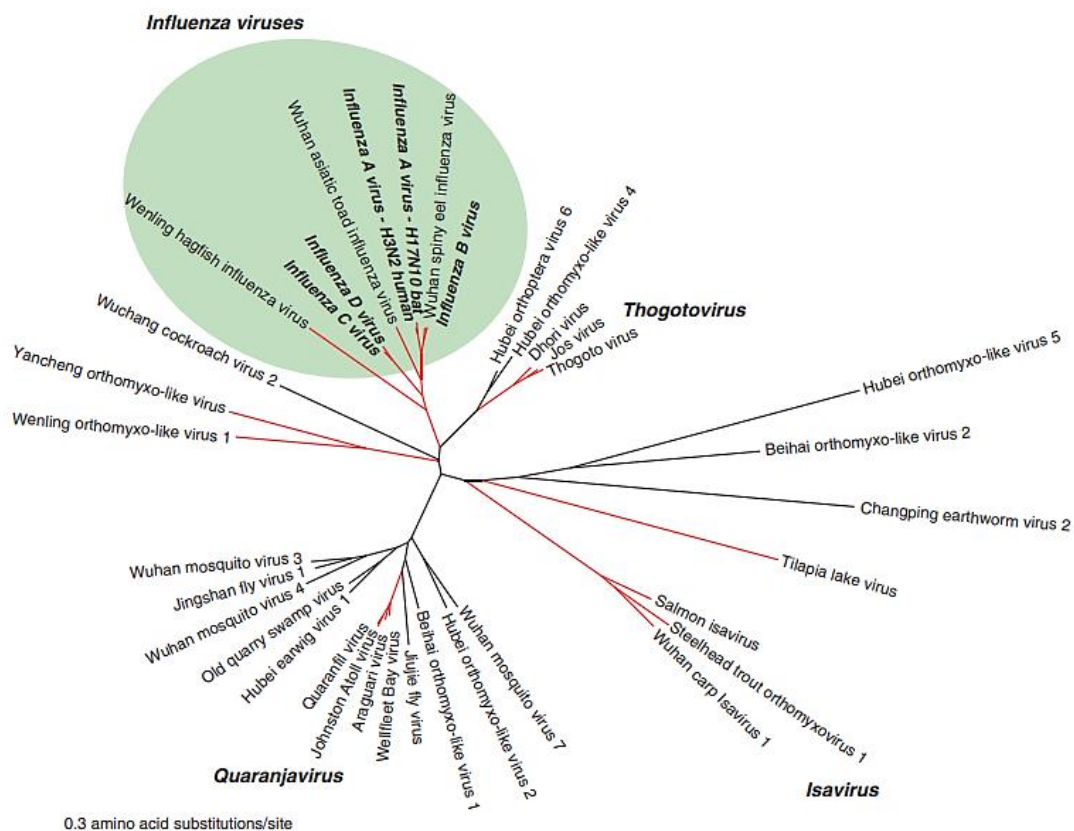


Рис.2.6 Еволюційні взаємовідносини серед ортоміксоподібних вірусів, що показують позицію вірусів грипу, асоційованих з хребетними (заштриховані зеленим кольором)

Були зроблені спроби проаналізувати філогенетичну різноманітність і поширення вірусів грипу типу А [6, с. 33–40 ; 7, с. 137; 22; 25, с. 283–287]. Зокрема, було опубліковано «панорамний філогенетичний аналіз» всіх 16 підтипів НА і 9 підтипів NA і розділено їх на 68 ліній і підліній НА і 49 ліній і підліній NA [24]. Це дослідження забезпечило комплексну основу для вивчення еволюційної та епідеміологічної історії вірусу грипу типу А. Однак, як і в усіх попередніх дослідженнях, у ньому було відібрано лише невелику кількість репрезентативних штамів, доступних для філогенетичного аналізу – 1264 послідовності НА і 1154 послідовності NA. Така обмежена вибірка послідовностей може зробити результати менш переконливими і недооцінити реальне філогенетичне різноманіття грипу типу А, особливо для вірусів грипу людини H1N1 і H3N2. Крім того, запропонована система номенклатури все ще залишається неоднозначною і менш ефективною,

оскільки для деяких послідовностей важко знайти лінію, до якої вони належать [6, с. 137 ; 22].

Ресурс вірусів грипу – це база даних послідовностей вірусів грипу та пов'язаної з ними інформації [2, с. 596–601]. Згідно з даними Генбанку на 13 березня 2024 року зареєстровано 191032 нуклеотидних послідовностей гену гемаглютиніну та 1017865 сиквенсів гену нейроменідази вірусу грипу А типу. Однак, окрім інформації про підтипи, для цих послідовностей відсутня будь-яка інша філогенетична або генетична інформація. Зокрема, багато послідовностей не проаналізовані, або в PubMed не має на це відповідних посилань.

Таким чином, повний геном вірусу грипу типу А складається з восьми одноланцюгових сегментів генів РНК, що кодують один трансмембранний і п'ять внутрішніх білків, а також дві імуностимулюючі поверхні (гемаглютинін-НА і нейрамінідазу-НА), зміни в нуклеотидній послідовності яких призводять до адаптації штамів вірусу до нового середовища та дозволяють вірусу існувати та розмножуватися в клітинах інших організмів. Існує 18 НА і 11 НА підтипів, але серед людей часто виділяють віруси H1-N3 і N1-N2.

Висновки до розділу 2

У розділі описано методи дослідження геномних послідовностей за допомогою баз даних та програмного забезпечення для аналізу і філогенетичного дослідження. Основним інструментом є NCBI — Національний центр біотехнологічної інформації, що містить бази даних нуклеотидних послідовностей, таких як GenBank і PubMed. Для аналізу нуклеотидних послідовностей використовувались програми BLAST (пошук збігів між послідовностями) і Clustal (множинне вирівнювання), а для проведення філогенетичного аналізу – такий інструмент як GenBank. Дослідження включають вивчення генетичного різноманіття вірусів грипу, особливо їхню еволюцію і поширення серед різних видів.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Оцінка різноманіття нуклеотидних послідовностей для дослідження

З появою молекулярно-генетичних і біоінформатичних методів дослідження геномів мікроорганізмів стало можливим їх ідентифікувати та вивчати мікроеволюційні процеси за допомогою порівняння консервативних ділянок геному. Швидкий розвиток молекулярно-біологічних технологій сприяє створенню значних баз даних результатів досліджень у цій сфері. Однак це призводить до нових викликів — обробка та аналіз великих обсягів інформації стають складнішими. Особливо це стосується баз даних нуклеотидних послідовностей, як-от GenBank, Mega та інші.

Інтернет-сервіси надають можливість отримати анотовані списки нуклеотидних послідовностей у відповідь на запити, які зазвичай містять ключові слова: назву гену, організму або номер послідовності, під яким вона була зареєстрована. Проте можливості обробки та аналізу цих даних є досить обмеженими. Якщо список містить кілька записів, їх можна переглянути і проаналізувати вручну, але коли в ньому сотні чи тисячі позицій, це завдання стає непродуктивним та майже неможливим.

Якщо стоїть завдання визначити кількість нуклеотидних послідовностей для кожного виду певного роду та відповідність їх певним генам, ручний перегляд таких обсягів даних є надзвичайно складним. Навіть серія запитів з різними видами або генами не полегшує аналіз. Крім того, у базах даних можуть траплятися помилки, тому деякі дані можуть бути відсутні, що спотворює результати аналізу.

Дослідження нуклеотидних послідовностей для видів, що розглядаються в роботі, показало, що найменше таких послідовностей було зареєстровано для виду *Aves*, тоді як для роду *Ното* їх існує найбільше (табл. 3.1). Однак кількість нуклеотидних послідовностей у базах даних постійно зростає, тому важливо враховувати дату отримання результатів.

Таблиця 3.1

Результати пошукового запиту у базі даних GenBank, опція Nucleotide		
для досліджуваних родів <i>Homo</i> та <i>Sus</i> і виду <i>Aves</i>		
(дані станом на жовтень 2024)		
Білок	Рід / вид	Загальна кількість записів
Hemagglutinin	<i>Homo</i>	119821
	<i>Sus</i>	32454
	<i>Aves</i>	2445
Neuraminidase	<i>Homo</i>	91369
	<i>Sus</i>	25303
	<i>Aves</i>	2252

У роботі також було проведено пошук нуклеотидних послідовностей зазначених родів і виду за регіонами їхнього виділення. Результати аналізу наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Результати пошукового запиту у базі даних GenBank, опція Nucleotide			
для досліджуваних родів <i>Homo</i> та <i>Sus</i> і виду <i>Aves</i> за регіонами їхнього			
виділення			
(дані станом на жовтень 2024)			
Білок	Рід / вид	Регіон виділення	Кількість записів
Hemagglutinin	<i>Homo</i>	Польща	10
		Англія	507
		Франція	825
	<i>Sus</i>	Польща	14
		Англія	2606
		Франція	222
	<i>Aves</i>	США (Нью-Йорк)	140
		США (Меріленд)	32

Продовження табл. 3.2

Neuraminidase	<i>Homo</i>	США (Міннесота)	113
		США (Аляска)	477
		Польща	26
		Англія	383
		Франція	331
	<i>Sus</i>	Польща	16
		Англія	47
		Франція	149
	<i>Aves</i>	США (Нью-Йорк)	250
		США (Меріленд)	37
		США (Міннесота)	298
		США (Аляска)	493

Як стає зрозуміло з аналізу, найбільша кількість записів білка НА зареєстрована: для роду *Homo* – у Франції, для роду *Sus* – в Англії та для виду *Aves* – у штаті Аляска, США. З білком NA ситуація дещо інша – найбільше записів наразі існує: для роду *Homo* – в Англії, для роду *Sus* – у Франції та для виду *Aves* – так само в штаті Аляска, США.

3.2 Результати попарного вирівнювання послідовностей

Таблиця 3.3

Результати попарного внутрішньовидового вирівнювання

Hemagglutinin							
<i>Homo</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
GQ329066	GQ329070	3136	3136	99%	0.0	99.94%	1701
GQ329066	GQ329100	3109	3109	99%	0.0	99.65%	1701

Продовження таблиці 3.3

GQ329066	GQ329106	3131	3131	99%	0.0	99.88%	1701
GQ329070	GQ329100	3114	3114	100%	0.0	99.71%	1701
GQ329070	GQ329106	3136	3136	100%	0.0	99.94%	1701
GQ329100	GQ329106	3109	3109	100%	0.0	99.65%	1701
<i>Sus</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
CY114525	CY116338	3020	3020	100%	0.0	98.71%	1701
CY114525	HM568120	3014	3014	100%	0.0	98.65%	1752
CY114525	KC881265						
CY116338	HM568120	3125	3125	100%	0.0	99.82%	1752
HJCY116338	KC881265						
HM568120	KC881265						
<i>Aves</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
MN341878	MN341886	3164	3164	99%	0.0	99.43%	1746
MN341878	MN546619	3097	3097	99%	0.0	98.74%	1767
MN341878	MT421176	3020	3020	97%	0.0	98.71%	1701
MN341886	MN546619	3092	3092	100%	0.0	98.63%	1767
MN341886	MT421176	3009	3009	97%	0.0	98.59%	1701
MN546619	MT421176	3097	3097	96%	0.0	99.53%	1701
<i>Neuraminidase</i>							
<i>Homo</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
GQ219779	GQ497278	2555	2555	100%	0.0	99.50%	1410
GQ219779	GQ497279	2516	2516	100%	0.0	98.93%	1410

Продовження таблиці 3.3

GQ219779	GU065291	2564	2564	100%	0.0	99.64%	1410
GQ497278	GQ497279	2536	2536	99%	0.0	99.15%	1410
GQ497278	GU065291	2584	2584	100%	0.0	99.72%	1410
GQ497279	GU065291	2556	2556	100%	0.0	99.29%	1410
<i>Sus</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
KJ191744	KU245749	2305	2305	100%	0.0	96.81%	1418
KJ191744	KJ191740	2529	2529	99%	0.0	100.00%	1369
KJ191744	KJ191743	2327	2327	99%	0.0	97.37%	1368
KU245749	KJ191740	2285	2285	96%	0.0	96.79%	1369
KU245749	KJ191743	2322	2322	96%	0.0	97.30%	1368
KJ191740	KJ191743	2322	2322	99%	0.0	97.36%	1368
<i>Aves</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
MH341880	MH341888	2630	2630	100%	0.0	99.79%	1433
MH341880	MH546621	1997	1997	99%	0.0	91.88%	1429
MH341880	MT421178	1962	1962	98%	0.0	91.77%	1410
MH341888	MH546621	2013	2013	99%	0.0	92.09%	1429
MH341888	MT421178	1978	1978	98%	0.0	91.99%	1410
MH546621	MT421178	2566	2566	98%	0.0	99.50%	1410

Таблиця 3.4

Результати попарного міжвидового вирівнювання

Hemagglutinin							
<i>Homo/Sus</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
GQ329066	CY114525	3025	3025	99%	0.0	98.77%	1701
GQ329066	CY116338	3125	3125	99%	0.0	99.82%	1701
GQ329066	HM568120	3121	3121	100%	0.0	99.76%	1752
GQ329066	KC881265						
GQ329070	CY114525	3031	3031	100%	0.0	98.82%	1701
GQ329070	CY116338	3131	3131	100%	0.0	99.88%	1701
GQ329070	HM568120	3125	3125	100%	0.0	99.82%	1752
GQ329070	KC881265						
GQ329100	CY114525	3014	3014	100%	0.0	98.65%	1701
GQ329100	CY116338	3103	3103	100%	0.0	99.59%	1701
GQ329100	HM568120	3097	3097	100%	0.0	99.53%	1752
GQ329100	KC881265						
GQ329106	CY114525	3025	3025	100%	0.0	98.77%	1701
GQ329106	CY116338	3125	3125	100%	0.0	99.82%	1701
GQ329106	HM568120	3120	3120	100%	0.0	99.76%	1752
GQ329106	KC881265						
<i>Homo/Aves</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
GQ329066	MH341878						
GQ329066	MH341886						
GQ329066	MH546619						

Продовження таблиці 3.4

GQ329066	MT421176	902	902	97%	0.0	76.65%	1701
GQ329070	MH341878						
GQ329070	MH341886						
GQ329070	MH546619						
GQ329070	MT421176	896	896	97%	0.0	76.59%	1701
GQ329100	MH341878						
GQ329100	MH341886						
GQ329100	MH546619						
GQ329100	MT421176	907	907	97%	0.0	76.71%	1701
GQ329106	MH341878						
GQ329106	MH341886						
GQ329106	MH546619						
GQ329106	MT421176	891	891	97%	0.0	76.53%	1701
<i>Sus/Aves</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
CY114525	MH341878						
CY114525	MH341886						
CY114525	MH546619						
CY114525	MT421176	891	891	97%	0.0	76.52%	1701
CY116338	MH341878						
CY116338	MH341886						
CY116338	MH546619						
CY116338	MT421176	902	902	97%	0.0	76.65%	1701
HM568120	MH341878						
HM568120	MH341886						
HM568120	MH546619						
HM568120	MT421176	891	891	94%	0.0	76.53%	1701

Продовження таблиці 3.4

KC881265	MH341878	1609	1609	99%	0.0	83.33%	1746
KC881265	MH341886	1587	1587	99%	0.0	83.11%	1746
KC881265	MH546619	1616	1616	100%	0.0	83.30%	1767
KC881265	MT421176	1561	1561	96%	0.0	83.25%	1701
Neuraminidase							
<i>Homo/Sus</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
GQ219779	KJ191744	2420	2420	98%	0.0	98.26%	1380
GQ219779	KU245749	2431	2431	100%	0.0	97.93%	1418
GQ219779	KJ191740	2399	2399	97%	0.0	98.25%	1369
GQ219779	KJ191743	2420	2420	97%	0.0	98.54%	1368
GQ497278	KJ191744	2422	2422	97%	0.0	98.33%	1380
GQ497278	KU245749	2451	2451	100%	0.0	98.01%	1418
GQ497278	KJ191740	2401	2401	97%	0.0	98.32%	1369
GQ497278	KJ191743	2422	2422	97%	0.0	98.61%	1368
GQ497279	KJ191744	2385	2385	97%	0.0	97.75%	1380
GQ497279	KU245749	2423	2423	100%	0.0	97.59%	1418
GQ497279	KJ191740	2364	2364	97%	0.0	97.74%	1369
GQ497279	KJ191743	2385	2385	97%	0.0	98.03%	1368
GU065291	KJ191744	2427	2427	97%	0.0	98.41%	1380
GU065291	KU245749	2471	2471	100%	0.0	98.30%	1418
GU065291	KJ191740	2407	2407	97%	0.0	98.39%	1369
GU065291	KJ191743	2427	2427	97%	0.0	98.68%	1368
<i>Homo/Aves</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
GQ219779	MH341880	1367	1367	99%	0.0	84.31%	1433

Продовження таблиці 3.4

GQ219779	MH341888	1373	1373	99%	0.0	84.38%	1433
GQ219779	MH546621	1367	1367	100%	0.0	84.23%	1429
GQ219779	MT421178	1339	1339	100%	0.0	83.87%	1410
GQ497278	MH341880	1397	1397	99%	0.0	84.55%	1433
GQ497278	MH341888	1402	1402	99%	0.0	84.62%	1433
GQ497278	MH546621	1397	1397	99%	0.0	84.54%	1429
GQ497278	MT421178	1369	1369	99%	0.0	84.18%	1410
GQ497279	MH341880	1363	1363	99%	0.0	84.05%	1433
GQ497279	MH341888	1369	1369	99%	0.0	84.12%	1433
GQ497279	MH546621	1345	1345	99%	0.0	83.83%	1429
GQ497279	MT421178	1317	1317	99%	0.0	83.48%	1410
GU065291	MH341880	1395	1395	99%	0.0	84.55%	1433
GU065291	MH341888	1400	1400	99%	0.0	84.62%	1433
GU065291	MH546621	1384	1384	99%	0.0	84.40%	1429
GU065291	MT421178	1356	1356	99%	0.0	84.04%	1410
<i>Sus/Aves</i>							
Послідовність 1	Послідовність 2	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
KJ191744	MH341880	1293	1293	100%	0.0	83.73%	1433
KJ191744	MH341888	1299	1299	100%	0.0	83.81%	1433
KJ191744	MH546621	1332	1332	100%	0.0	84.25%	1429
KJ191744	MT421178	1304	1304	100%	0.0	83.88%	1410
KU245749	MH341880	1373	1373	99%	0.0	84.23%	1433
KU245749	MH341888	1378	1378	99%	0.0	84.30%	1433
KU245749	MH546621	1323	1323	99%	0.0	83.61%	1429
KU245749	MT421178	1295	1295	99%	0.0	83.32%	1410
KJ191740	MH341880	1293	1293	100%	0.0	83.73%	1433
KJ191740	MH341888	1299	1299	100%	0.0	83.81%	1433

Продовження таблиці 3.4

KJ191740	MN546621	1332	1332	100%	0.0	84.25%	1429
KJ191740	MT421178	1304	1304	100%	0.0	83.88%	1410
KJ191743	MN341880	1325	1325	100%	0.0	84.16%	1433
KJ191743	MN341888	1330	1330	100%	0.0	84.23%	1433
KJ191743	MN546621	1323	1323	96%	0.0	84.72%	1429
KJ191743	MT421178	1295	1295	96%	0.0	84.34%	1410

3.3 Результати множинного вирівнювання послідовностей

Множинне вирівнювання послідовностей, проведене за допомогою програмного забезпечення Clustal, є важливим етапом у біоінформатичних дослідженнях. Це програмне забезпечення дозволяє автоматизовано порівнювати численні послідовності нуклеїнових кислот або амінокислот, виявляючи подібності та відмінності між ними. Застосування такого підходу забезпечує високу точність аналізу та значно скорочує час, необхідний для обробки даних, особливо у випадку великих масивів послідовностей.

Процес вирівнювання послідовностей дозволив ідентифікувати як консервативні, так і варіабельні ділянки в аналізованих послідовностях. Консервативні ділянки є регіонами, що залишаються практично незмінними в процесі еволюції. Вони зазвичай виконують важливі функції, наприклад, кодуючи структурні або функціональні домени білків. Навпаки, варіабельні ділянки відображають генетичну мінливість і можуть бути корисними для ідентифікації видоспецифічних ознак або оцінки рівня адаптивних змін.

Отримані результати мають велике значення для філогенетичних досліджень. На основі вирівнювання послідовностей можна створити філогенетичні дерева, які дозволяють візуалізувати еволюційні зв'язки між організмами чи генами. Це, у свою чергу, дає можливість простежити спільне походження, визначити ступінь спорідненості між видами, а також оцінити, як генетична інформація змінювалася з часом.

Додатково, результати вирівнювання можуть бути застосовані для оцінки генетичного різноманіття в популяціях. Аналіз варіабельних регіонів дає змогу оцінити рівень генетичних відмінностей, які часто асоціюються з пристосувальними властивостями організмів. Це важливо для збереження біорізноманіття, вивчення адаптацій до змін навколишнього середовища, а також для створення нових біотехнологічних підходів.

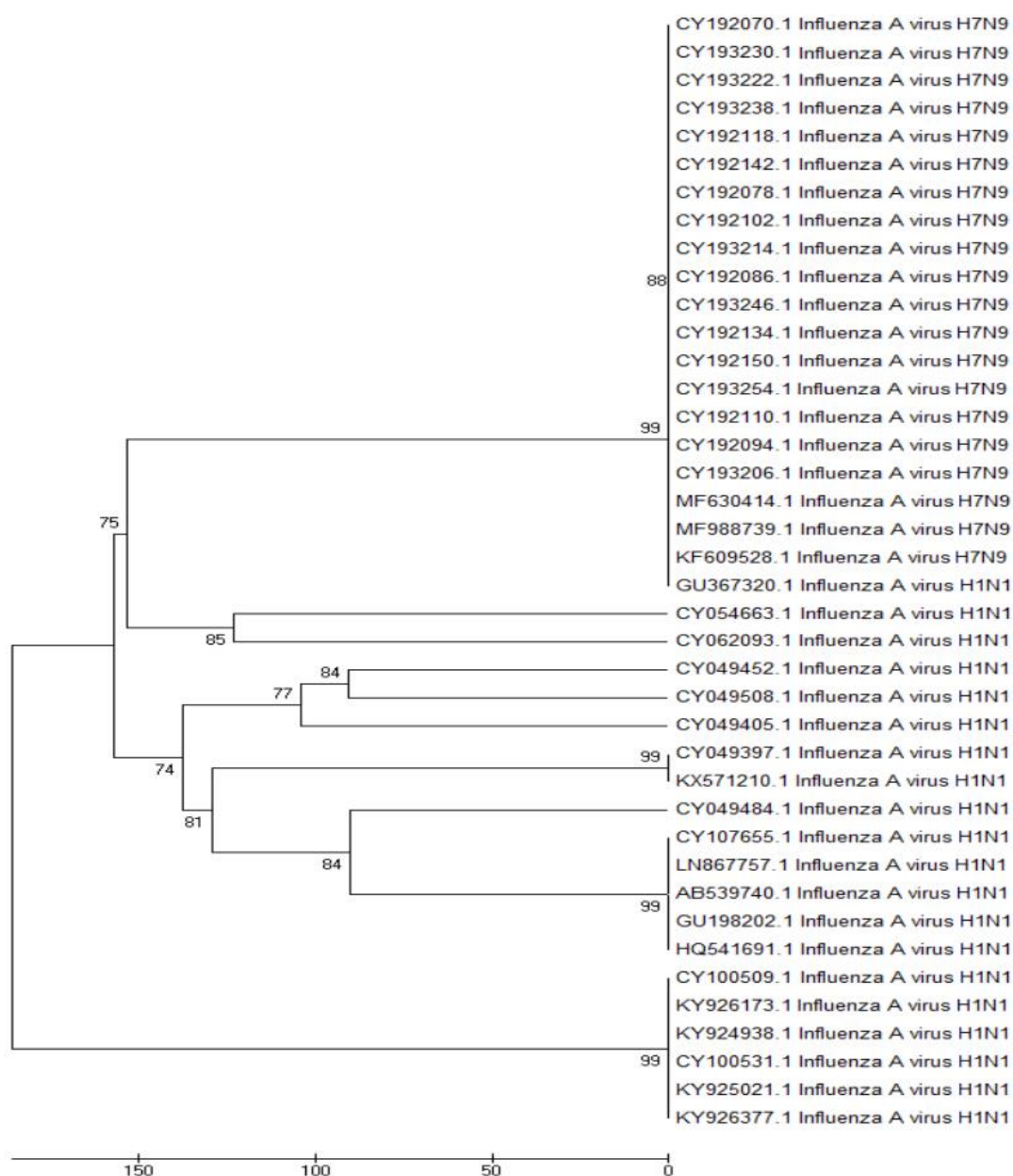


Рис. 3.1 Дендрограма послідовностей генів NA штамів вірусу пташиного грипу

Окрім того, ідентифікація функціонально значущих регіонів у послідовностях має вагоме прикладне значення. Консервативні регіони можуть бути мішенями для розробки нових лікарських препаратів або генетичних маркерів, а варіабельні ділянки – джерелом інформації для розуміння молекулярних механізмів еволюції. Усе це робить множинне вирівнювання потужним інструментом для сучасних досліджень у галузі молекулярної біології, генетики та еволюції.

Вірогідно, висока варіабельність гену НА, 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 НА та NA, варіабельність.

Таким чином, результати множинного вирівнювання, проведеного за допомогою Clustal, є не лише основою для філогенетичних досліджень, але й вагомим внеском у розуміння складних еволюційних процесів. Застосування цих даних сприяє розвитку як фундаментальних, так і прикладних аспектів сучасної науки.

Висновки до розділу 3

Грип залишається серйозною загрозою громадському здоров'ю через сезонні спалахи та ризик пандемій, спричинених міжвидовою передачею вірусу. Ефективна боротьба із захворюванням вимагає розробки нових вакцин, що є складним і ресурсомістким процесом, який потребує тісної співпраці між науковою спільнотою, системою охорони здоров'я, промисловістю та суспільством. Нещодавні досягнення в геномних технологіях відкривають перспективи для створення безпечних і ефективних вакцин, здатних протидіяти викликам грипу.

ВИСНОВКИ

1. Глобальний епіднадгляд за грипом, підтримуваний мережею ВООЗ та базами даних генетичних і епідеміологічних послідовностей, разом із сучасними математичними та обчислювальними методами, суттєво поглиблює розуміння генетичної та антигенної еволюції вірусу, сприяючи вдосконаленню процесів епідеміологічного нагляду та вибору вакцинних штамів, а також відкриваючи нові перспективи для подальших досліджень у цій сфері.

2. Методи дослідження геномних послідовностей із використанням баз даних NCBI та програмного забезпечення, таких як BLAST і Clustal, є ефективними інструментами для аналізу нуклеотидних послідовностей і філогенетичних зв'язків, що дозволяє досліджувати генетичне різноманіття вірусів грипу, їхню еволюцію та поширення серед різних видів.

3. Висока варіабельність гену НА (нейрамінідази) та помірна варіабельність гена NA вірусу грипу сприяють здатності вірусу долати міжвидовий бар'єр, що дозволяє йому адаптуватися до нових господарів. Це є важливим фактором для еволюції вірусу, оскільки дозволяє з'являтися новим штамам, здатним інфікувати різні види, включаючи людину, що є основною причиною спалахів і пандемій грипу.

4. Результати множинного вирівнювання, проведеного за допомогою Clustal, становлять важливу основу для філогенетичних досліджень і значно сприяють розумінню складних еволюційних процесів. Застосування цих даних не лише поглиблює знання в галузі молекулярної біології, але й робить вагомий внесок у розвиток прикладних аспектів науки, зокрема в області біотехнології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бондаренко А.М. Вакцинація—оцінка доцільності та ризиків. *Інфекційні хвороби*. 2019. 2, С. 75-95. URL: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/inf-patol/article/view/10329> (дата звернення: 10.09.2024)
2. Дьяченко А. Г., Галушко Н. А., Липовська В. В., Дьяченко П. А. Вакцинопрофілактика інфекцій: проблеми та перспективи. *Вісник СумДУ. Серія Медицина*, 2009. №1, С. 84-98. URL: <https://essuir.sumdu.edu.ua/bitstream-download/123456789/1723/1/%d0%94%d1%8c%d1%8f%d1%87%d0%b5%d0%bd%d0%ba%d0%bedagipp.pdf> (дата звернення: 10.09.2024)
3. About BLAST. URL: https://www.megasoftware.net/web_help_7/hc_about_blast.htm
4. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(30). P. 5637-5644.
5. Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, et al. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. *Journal of virology*. 2008. 82. 2. P. 596-601.
6. Barnett JM, Cadman A, Burrell FM, et al. In vitro selection and characterisation of influenza B/Beijing/1/87 isolates with altered susceptibility to zanamivir. *Virology*. 1999. 265. P. 286-295
7. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата звернення: 12.10.2024)
8. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008. 26, D49-D53
9. Chen JM, Ma HC, Chen JW, Sun YX, Li JM, et al. A preliminary panorama of the diversity of N1 subtype influenza viruses. *Virus Genes*, 2007. 35(1), 33-40.
10. Chen JM, Sun YX, Chen JW, Liu S, Yu JM, et al. Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza viruses based on their six internal gene sequences. *Virol*. 2009. 6, 1-17.

11. Cimini K, Ran W, Gorka M, Lee J, Malmlov A, Schinköthe J, Eckley M, Murrieta RA, Aboellail TA, Campbell CL, et al. Bat influenza viruses transmit among bats but are poorly adapted to non-bat species. *NatMicrobiol*. doi:10.1038/s41564-019-0556-9, 2019
12. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, et al. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 1994. 205(1), 17-23.
13. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu. Rev. Med.* doi: 10.1146/annurev. med.51.1.407, 2000
14. Edward C. Hutchinson. *Influenza Virus. Methods and Protocols* .2018. 1-21.
15. Engl N, Med J. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009. P. 2605-2615.
16. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005. 79. 5. P. 2814-2822.
17. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 2009
18. Ghattas, Majed, et al. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: Current progress, challenges, and opportunities. *Vaccines* 9.12, 2021). 1490 p. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/12/1490> (дата звернення: 15.09.2024)
19. Glaser L, Stevens J, Zamarin D, et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol*, 2005. V. 79. 17. P. 11533-11536.
20. Hanene Rezaiguia, Bakiri Fedoua Ghaoui Chaima L'utilisation des nouveaux vaccins et leurs impacts sur l'immunité, 2021. <https://dspace.univ-guelma.dz/xmlui/handle/123456789/12039> (дата звернення: 09.09.2024)
21. Harris, K. A., Freidl, G. S., Munoz, O. S., Von Dobschuetz, S., De Nardi, M., Wieland, B., et al. Epidemiological risk factors for animal influenza A viruses overcoming species barriers. *EcoHealth*. doi: 10.1007/ s10393-017-1244-y, 2017

22. Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, et al. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol*, 1994
23. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, 1998
24. Kayser, Veysel, Iqbal Ramzan. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Human vaccines immunotherapeutics*, 2021. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2021.1977057> (дата звернення: 15.09.2024)
25. Kandeil A, Gomaa MR, Shehata MM, El Taweel AN, Mahmoud SH, Bagato O, Moatasim Y, Kutkat O, Kayed AS, Dawson P, et al. Isolation and characterization of a distinct influenza A virus from Egyptian Bats. *J Virol* 93:e01059–18, 2019
26. Karakus U, Thamamongood T, Ciminski K, Ran W, Günther SC, Pohl MO, Eletto D, Jeney C, Hoffmann D, Reiche S, et al. MHC class II proteins mediate cross-species entry of bat influenza viruses. *Nature* 567: 109–112, 2019
27. Kennedy, Richard B., et al. Current challenges in vaccinology. *Frontiers in immunology*, 2020. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01181/full> (дата звернення: 15.09.2024)
28. Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 312: 394–397, 2006
29. Latorre-Margalef N, Tolf C, Grosbois V, Bengtsson D, Wille M, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Olsen B, Waldenstrom J. Long-term variation in influenza A virus prevalence and subtype diversity in migratory mallards in Northern Europe. *Proc R Soc B: Biol Sci* 281: e20140098, 2014
30. Liu S, Ji K, Chen J, Tai D, Jiang W, et al. Panorama Phylogenetic Diversity and Distribution of Type A Influenza Virus. *PLoS ONE* 4(3), 2009
31. Ma HC, Chen JM, Chen JW, Sun YX, Li JM, et al. 2007. The panorama of the diversity of H5 subtype influenza viruses. *Virus Genes* 34(3)

32. Mao, Helen H., Shoubai Chao. Advances in vaccines. Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology, 2020. P. 155-188.
https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2019_107 (дата звернення: 11.09.2024)
33. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Frontiers in microbiology*, 2019
34. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC168907/> (дата звернення: 12.10.2024)
35. Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *J Virol*, 1984
36. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 2009
37. Palese P, Compans RW. *J. Gen. Virol*, 1976
38. Palese P, Shaw M. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology, 2006
39. Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol*, 2009
40. Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus.
41. Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 1983
42. Shi M, Lin XD, Chen X, Tian JH, Chen L J, Li K, Wang W, Eden J S, Shen J J, Liu L, et al. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature*, 2018
43. Sitohy M, Scanu M, Besse B, Mollat C, Billaudel S, Haertlé T, Chobert JM. Influenza virus A subtype H1N1 is inhibited by methylated β -lactoglobulin. *Journal of dairy research*, 2010
44. Stegmann T, White JM, Helenius A. Intermediates in influenza induced membrane fusion. *EMBO J*, 1990

45. Stevens J, Blixt O, Glaser L, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*, 2006
46. Stevens J, Corper AL, Basler CF, et al. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science*, 2004
47. Strauss J, Strauss E. Minus-strand RNA viruses. *Viruses and Human Disease*. 2nd ed. Oxford, UK: Elsevier, 2008
48. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Jr., Chambers TM, et al. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses, 2000
49. Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DAA, ChenLM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, et al. A distinct line age of influenza A virus from bats. *ProcNatlAcadSci* 109: 4269–4274, 2012
50. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9:e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657, 2013
51. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 2007.
52. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992
53. Weifeng S, Fumin L, Chaodong Z, Fabian S, Desmond GH. A Complete Analysis of HA and NA Genes of Influenza A Viruses.
54. Wright P, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. Knipe D, Howley P, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Апробація результатів досліджень



НОВІТНІ НАУКОВІ ПІДХОДИ І ТЕХНОЛОГІЇ У СФЕРІ ПРАКТИЧНОЇ ТА ТЕОРЕТИЧНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ

Андрусак В. І., Ільїна Т. В. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РОМАШКИ АПТЕЧНОЇ КВІТОК І РОМАШКИ АПТЕЧНОЇ РІДКОГО ЕКСТРАКТУ РІЗНИХ ВИРОБНИКІВ	142
Бажурка С. В., Карпушина С. А. ЕКСТРАКЦІЯ ІМІЗИНУ З КРОВІ У ПРИСУТНОСТІ ВИСОЛЮВАЧІВ	143
Бурмей С. А., Івашко М. В., Паллаг О. В., Бойко Н. В. СИНДРОМ ПОДРАЗНЕНОГО КИШЕЧНИКУ: МОДУЛЯЦІЯ КИШКОВОГО МІКРОБІОМУ НА ЗАСАДАХ ЗП МЕДИЦИНИ	146
Кіндюк Т. В., Дмитрів А. М. ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ КОЛОЇДНОГО СРІБЛА ЯК АНТИСЕПТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ	148
Корж П. І., Ткаченко В. В., Кріцак В. В. МІНІІНВАЗИВНІ МЕТОДИКИ В ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА БРОНХОЕКТАТИЧНУ ХВОРОБУ	150
Кучма І. Ю., Большакова Г. М., Частій Т. В. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i> ПРИ ВУЛЬВОВАГІНАЛЬНОМУ КАНДИДОЗІ	151
Малоштан Л. М., Грубник І. М., Підгайна В. В. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ТА АНТИАЛЕРГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КРЕМУ НА ОСНОВІ КОРИ ВЕРБИ БІЛОЇ ТА ЦИНКУ	154
Онщенко Н. В. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ СИСТЕМИ САМАГ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ТА ДОКЛІНІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ	157
Актуальні питання сучасної медицини та фармації	234

І Міжнародна науково-практична конференція

Парчевська Д. Д., Волошина І. М. ГЕНОМНІ ТЕХНОЛОГІЇ В РОЗРОБЦІ ВАКЦИН	159
Стремоухов О. О., Кулакова О. М. АНАЛІЗ ЖОВЧІ ТВАРИННОЇ ЯК ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РЕЧОВИНИ	161
Стремоухов О. О., Кошовий О. М., Гонтова Т. М. ФІТО-ХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛОХИНИ ВИСОКОРОСЛОЇ	163
Шпичак О. С. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ УВЕДЕННЯ РОСЛИННОЇ СУБСТАНЦІЇ КАЛИНИ ЗВИЧАЙНОЇ ПЛЮДІВ ЕКСТРАКТУ РІДКОГО ДО СКЛАДУ ТАБЛЕТОВАНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ	166
Ярошевський О. А. БІЛЬ У СПИНІ. СУЧАСНІ МОДЕЛІ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ В ПЕРІОД ВОЄННОГО СТАНУ	169
Chaban T., Klenina O., Chaban I., Ogurtsov V. ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SOME THIAZOLO[4,5-b]PYRIDIN-2-ONES	171
Klenina O., Chaban T. COMPUTATIONAL CHEMISTRY STRATEGIES FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY INVESTIGATION	173
Klenina O. MOLECULAR DOCKING STUDIES OF 3H-THIAZOLO[4,5-b]PYRIDINE DERIVATIVES AS POTENTIAL LIPOXYGENASE INHIBITORS	176
Maga I. M. DETERMINATION OF CHLORAMBUCIL BY METHOD HPLC USING THE AZODERIVATION REACTION	179

забезпечує точність і високі стандарти в процесі фармацевтичного аналізу та доклінічних випробувань. Це потужний інструмент для швидкого порівняння кількох зразків паралельно, перевірки на фальсифікації, моніторингу чистоти та стабільності та кількісного визначення маркерних сполук. Ця техніка використовується в різних сферах застосування, пропонуючи готові методи дослідження.

Список використаних джерел.

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек.; за ред. О. В. Стефанова. Київ, 2001. 527 с.
2. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 14.12.09 № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 19.01.2010 р. за №53/17348.
3. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Харків: Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр», 2008. С. 56.
4. Фармацевтичний CAMAG URL: <https://www.camag.com/applications/application-field/pharmaceutical-applications>

ГЕНОМНІ ТЕХНОЛОГІЇ В РОЗРОБЦІ ВАКЦИН

Парчевська Дарина Дмитрівна,
студентка-магістрантка
кафедри біотехнології, шкіри та хутра,
Київський національний університет
технологій та дизайну,
м. Київ, Україна
Волошина Ірина Миколаївна,
кандидатка технічних наук, доцентка,
доцентка кафедри біотехнології, шкіри та хутра,
Київський національний університет
технологій та дизайну,
м. Київ, Україна

Незважаючи на наявність значної різноманітності видів вакцин, на сьогодні контрольованими завдяки ним лишається, згідно з різними джерелами, лише близько 30 захворювань [1]. Це пояснюється викликами та проблемами в галузі вакцинології, що існують на сьогодні та потребують нових підходів до їх вирішення. Одним із таких може стати використання геноміки, що може значно сприяти прогресу в розробці та вдосконаленні вакцин.

За останнє десятиліття були розроблені та створені нові вакцини, включаючи ліцензовану вакцину проти менінгококу В, з використанням підходів, заснованих на геноміці, таких, як вакциноміка (яка має на меті зрозуміти геномні та системні дані для з'ясування основ міжіндивідуальних

варіацій імунної відповіді), реверсивна вакцинологія (яка використовує інформацію про генетичну послідовність для ідентифікації імуногенних антигенів). Зі зростанням складності та зниженням вартості генних аналізів і технологій секвенування наступного покоління, геноміка прискорює розробку нових вакцин у XXI столітті [2].

Геноміка та новітні геномні технології вплинули на розробку вакцин і можуть допомогти подолати як ті бар'єри в розробці вакцин, що існують уже тривалий час, так і ті, що пов'язані з появою нових патогенів, які мають важливе значення для громадського здоров'я. Серед проблем вакцинології, що можуть бути вирішені завдяки геноміці, дослідники виділяють наступні [2]:

- неповне розуміння того, як працює імунітет – розвиток цього розуміння є важливим першим кроком до здатності прогнозувати та, зрештою, керувати імунною системою, щоб досягти бажаного результату від роботи імунітету. Рушійною силою примноження цих знань є зосередженість на геноміці, оскільки експресія генів вважається критично важливим першим кроком, адже імунні клітини розпізнають і реагують на чужорідні антигени. Отже, кожне з цих досліджень має на меті зрозуміти транскриптомні зміни, які відбуваються під час розвитку імунної відповіді;

- мінливість організму господаря – генетичні дослідження реакцій на вакцини виявили ефекти, які можна кількісно виміряти і передбачити. На основі таких досліджень можлива розробка нових вакцин та ад'ювантів, які цілеспрямовано впливають на вроджені рецептори та їхні сигнальні шляхи, що призводить до підвищення рівня захисту та посилення імунних реакцій;

- мінливість патогенів – варіабельність генетичної послідовності патогенів є основною перешкодою для розробки вакцин. Дані про геномні послідовності використовуються для визначення різноманітності штамів патогенів, ідентифікації факторів вірулентності, відбору консервативних ділянок, конструювання векторів, створення рекомбінантних білків, атенуації вакцинних штамів і створення вакцин на основі нуклеїнових кислот, які містять специфічні послідовності генів, необхідні для експресії відібраних антигенів *in vivo*. Крім того, ідентифікація таких факторів вірулентності дозволяє дослідникам вибірково видаляти ділянки геному збудника і створювати безпечніші, атенуовані штами для використання в якості живих атенуованих вакцин;

- створення нових вакцин – традиційні вакцини для профілактики інфекційних захворювань зазвичай складаються з убитих або ослаблених патогенів або білків цих мікроорганізмів. На противагу цьому, при розробці нових вакцин, що можуть сприяти значному прогресу в медицині, використовуються переваги геномних технологій, щоб зрозуміти, які гени господаря активуються/пригнічуються, які білки або метаболіти господаря задіяні та що приводить до стійкості імунної відповіді у вакцинованих осіб.

На рис. 1 наведено так звані інструменти геноміки, застосування яких може по-справжньому революціонізувати процес проектування, розробки, тестування і впровадження вакцин [2].

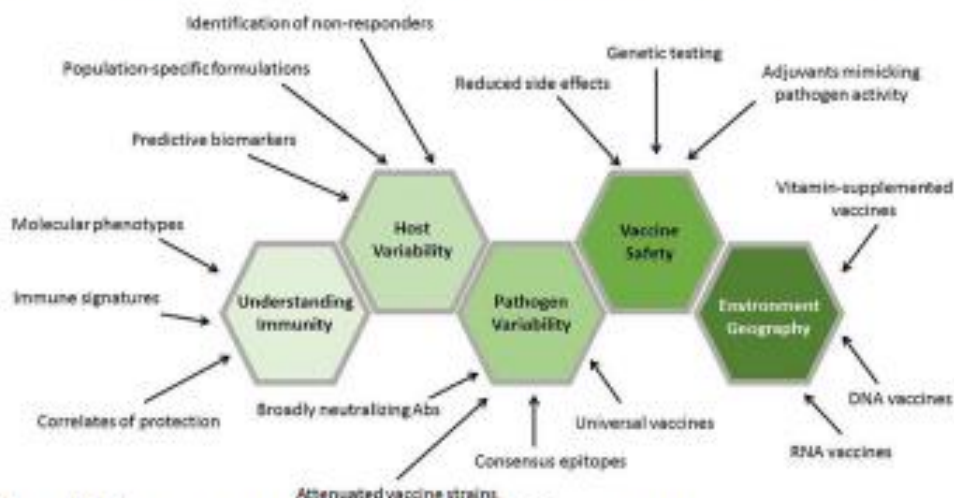


Рис. 1. Внесок геноміки в етапи розробки вакцин.

Як стає зрозуміло, результати, отримані за допомогою геномних підходів, використовуються на кожному етапі розробки вакцин. Застосування геноміки на самому початку роботи відіграє вирішальну роль у відкритті нових мішеней для вакцин. Після цього, відбувається характеристика цих мішеней з точки зору їхньої здатності викликати захисну імунну відповідь. Перевірка отриманих результатів у генетично різноманітних популяціях здійснюється за допомогою інформації, отриманої за допомогою підходів геноміки. Нарешті, застосування отриманих результатів допомагає в розробці та завершенні клінічних випробувань I-IV фаз.

Список використаних джерел.

1. Бондаренко А. М. Вакцинація – оцінка доцільності та ризиків. Інфекційні хвороби, 2019. С. 75–95. URL: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/inf-patol/article/view/10329>
2. Current challenges in vaccinology / B. Kennedy Richard et al. Frontiers in immunology. 2020. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01181/full>

АНАЛІЗ ЖОВЧІ ТВАРИННОЇ ЯК ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РЕЧОВИНИ

Стремоухов Олександр Олександрович,
кандидат фармацевтичних наук, доцент,
декан фармацевтичного факультету,
Київський міжнародний університет,
Київ, Україна
Кулакова Оксана Миколаївна,
кандидатка культурології, доцентка,
завідувачка кафедри ФТЛФМ,
Київський міжнародний університет,
Київ, Україна

Тваринництво створює достатню сировинну базу для одержання

ДОДАТОК Б

Апробація результатів досліджень



ДОДАТОК Б

Стаття за результатами дослідження

*Парчевська Д. Д., магістр, Грецький І. О., доц., Волошина І. М., доц.
Київський національний університет технологій та дизайну*
**БІОІНФОРМАЦІЙНІ МЕТОДИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В
БІОТЕХНОЛОГІЇ**

*Parchevska D. D., Master, Hretskyi I. O., Assoc., Voloshina I. M., Assoc.
Kyiv National University of Technologies and Design*
BIOINFORMATIVE METHODS USED IN BIOTECHNOLOGY

Анотація. У статті розглянуто основні біоінформаційні методи, що використовуються в сучасних біотехнологічних дослідженнях – вирівнювання послідовностей, філогенетичний аналіз, граф де Бройна. Окремо проаналізовано методи передбачення структури та функцій білків та розробки ліків. Охарактеризовано біоінформаційні системи «ЕкоІС» та «Spark».

Ключові слова: біоінформатика, біотехнології, філогенетика, вирівнювання послідовностей.

Abstract. The article discusses the main bioinformatics methods used in modern biotechnological research – sequence alignment, phylogenetic analysis, de Bruijn sequence. The methods of predicting the structure and functions of proteins and developing drugs are analyzed separately. Bioinformatics systems «EkoIS» and «Spark» are characterized.

Key words: bioinformatics, biotechnology, phylogenetics, sequence alignment.

Вступ. За останні роки в галузі біотехнологій, і зокрема в біоінформатиці, відбувся значний прогрес. Це пояснюється появою все нових і нових технологій і великої кількості різних типів даних, які потрібно інтегрувати в перспективу персоналізованої медицини. Через такі великі обсяги нових даних і швидкі темпи прогресу постають виклики в методології досліджень, адже вченим постійно необхідно добирати методи з усього переліку вже наявних, або ж створювати нові.

На сьогодні існують навчально-методичні посібники та практикуми з оглядами баз даних і технологій біоінформаційних досліджень [1]. Однак учені також зосереджуються й на окремих аспектах цієї науки. Так, Бабінцева Л. Ю. розглядає нові напрями біомедичної інформатики в стратегії змінення практичної медицини та біомедичної освіти, Кленіна О. В. вивчає використання баз даних хемоінформатики та біоінформатики у процесах комп'ютерного конструювання ліків, Ключко О. М. із командою досліджує біоінформаційну систему «ЕкоІС» з базами даних та інкорпорованими біосенсорами [8], а Ястребова О. С. цікавиться моделюванням біологічних процесів на основі даних молекулярної біотехнології та біоінформатики. Серед іноземних учених також популярні загальні огляди біоінформаційних методів і технологій. Проте, є й ті хто зосереджується на конкретних елементах цієї галузі. Наприклад, С. Belser досліджує біоінформаційні підходи до аналізу геномів і біорізноманітності, F. Dufour з їх допомогою вивчає дерегуляцію фізіологічних систем у процесі старіння, D. Lévy та його колеги – електронну кріо-мікроскопію для нового погляду на клітину та її складові [7].

Постановка завдання. Метою нашого дослідження є **аналіз біоінформаційних методів, що застосовуються в біотехнології для оптимізації біологічних процесів, генетичних досліджень, розробки нових терапевтичних препаратів і вдосконалення інструментів для обробки великих обсягів біологічних даних.** Дослідження спрямоване на систематизацію та розкриття ролі цих методів у сучасній науці.

Результати досліджень. Одним із ключових методів біоінформаційних досліджень є вирівнювання послідовностей — порівняння нуклеотидних (ДНК, РНК) або амінокислотних

(білки) послідовностей для виявлення схожих ділянок, що свідчать про функціональні, структурні або еволюційні зв'язки. З його допомогою ми можемо відповісти на питання «чи схожі дві послідовності ДНК?» та «наскільки вони схожі?» Порівняння нових послідовностей з відомими допомагає встановити їх спорідненість, виявити консервативні та варіабельні ділянки, а також дослідити еволюційні взаємозв'язки. [1, с. 72-73]. Вирівнювання — це алгоритмічний процес порівняння послідовностей, нуклеотид за нуклеотидом, для виявлення подібностей і відмінностей. У випадку подібних послідовностей, відмінності відповідають або природнім мутаціям, або помилкам секвенування: заміні одного нуклеотиду іншим, вставці додаткового нуклеотиду або видаленню нуклеотиду. Щоб визначити оптимальне вирівнювання, яке мінімізує кількість відмінностей між двома послідовностями, необхідно вивчити всі можливі комбінації вставок або видалень. Однак у довжині послідовності є експоненціальне число, тому просто розраховувати всі вирівнювання на практиці — неможливо. Вирівнювання вирішується за допомогою динамічного програмування, ідея якого полягає в тому, щоб розділити проблему на менші підпроблеми й таким чином розрахувати оптимальне вирівнювання [2, с. 4].

Вирівнювання послідовностей буває парним (між двома послідовностями) та множинним (між кількома). Незалежно від типу, можна використовувати глобальне або локальне вирівнювання. **Глобальне вирівнювання** охоплює всю довжину послідовностей і підходить для гомологічних по всій довжині. Тобто, воно більш ефективне для схожих послідовностей [1, с. 74-75]. Однак для більш віддалених послідовностей краще використовувати локальне вирівнювання, яке знаходить схожі ділянки всередині послідовностей. Найвідоміші методи — програма FastA, яка швидко знаходить схожі області, і BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), що порівнює послідовності на основі підпослідовностей, упорядковуючи результати за рівнем подібності [3, с. 31-32].

BLAST — це популярний інструмент для пошуку схожих ділянок між послідовністю запиту та великою базою даних послідовностей, наприклад, Genbank. Його завдання — виявити локальні подібності, тобто максимально схожі області між запитом та послідовністю в базі даних, допускаючи можливість вставок і видалень. Хоча ідеальне розв'язання цієї задачі є обчислювально складним, BLAST використовує спеціально розроблену евристику, яка забезпечує дуже швидкий пошук (іноді за лічені секунди). Для кожного порівняння BLAST надає показник відповідності та оцінку очікуваної кількості збігів з таким самим або вищим балом, що могли б виникнути випадково. Якщо очікуване значення є дуже низьким, то послідовність з бази даних вважається «збігом» і ймовірним гомологом запитуваної послідовності. [4].

BLAST визначає схожі фрагменти між різними послідовностями. Програма зіставляє нуклеотидні або білкові послідовності з даними в базах і розраховує статистичну значущість знайдених збігів. Цей інструмент дозволяє робити висновки про функціональні та еволюційні зв'язки між послідовностями, а також допомагає ідентифікувати членів генних сімейств [5].

Для виконання множинного вирівнювання було використано програмне забезпечення Clustal, яке є популярним інструментом у молекулярній біології для вирівнювання нуклеотидних і білкових послідовностей, а також для побудови філогенетичних дерев. Популярність Clustal обумовлена не лише високою точністю результатів, але й його надійністю, зручністю та мобільністю. Останні функції включають підтримку форматів NEXUS і FASTA, виведення нумерації діапазонів та покращену швидкість побудови дерев. Спочатку розроблений для локального використання, Clustal зараз доступний також на багатьох веб-серверах, наприклад, у Європейському інституті біоінформатики [6].

Вирівнювання білкових послідовностей є ключовим елементом сучасної біоінформатики. Завдяки множинному вирівнюванню дослідники можуть аналізувати консервативні еволюційні особливості послідовностей та родинні зв'язки між організмами. Існують два основних типи вирівнювання: глобальне, яке охоплює всю послідовність, і локальне, що охоплює лише окремі ділянки. Найчастіше для глобального вирівнювання використовують програми серії Clustal. Першу версію Clustal розробив Дес Хігінс у 1988 році з урахуванням обмеженої потужності комп'ютерів того часу. Він поєднав динамічне програмування зі стратегією прогресивного вирівнювання, де вирівнювання послідовностей проводиться поетапно, відповідно до гілок

дерева. Для початкових порівнянь застосовувався швидкий алгоритм на основі слів, а дерево створювалось методом UPGMA [6].

У 1992 році вийшла версія ClustalV з новими можливостями вирівнювання профілів та побудовою дерев методом з'єднання сусідніх. У 1994 році з'явилась ClustalW, яка додала удосконалення: вагові коефіцієнти для послідовностей і автоматичний підбір матриць для кожного етапу вирівнювання. Крім того, приблизний пошук слів замінили на більш точний алгоритм динамічного програмування, а UPGMA замінили на NJ для побудови дендограм [6].

Clustal був розроблений для забезпечення надійного і точного інструменту, що легко використовувати, а тісна співпраця біологів і програмістів стала однією з причин його успіху. ClustalW відкрив шлях для нових розробок, зокрема ClustalX, що забезпечує інтерактивне редагування вирівнювань, дозволяючи перевирівнювати окремі ділянки чи послідовності [6].

Обидві програми, ClustalW і ClustalX, продовжують підтримуватися та оновлюватися. Останні вдосконалення включають збереження результатів у форматі NEXUS для сумісності з іншими програмами. Серед нових функцій: збереження результатів у форматі FASTA, генерація матриці ідентичності у відсотках, збереження обраних діапазонів залишків, що корисно при виділенні доменів з багатодомених білків, та пришвидшення алгоритму NJ для побудови дерев [6].

Філогенетичний аналіз – невід'ємна складова багатьох біоінформаційних досліджень. Він вивчає еволюційні зв'язки між організмами та допомагає зрозуміти їхню історію. Ці зв'язки відображаються у вигляді філогенетичних дерев — діаграм, які показують еволюційний родовід. Філогенетичні дерева бувають укорінені (з позначеним загальним предком) і неукорінені (без кореня, лише зв'язки між видами). Укорінене дерево ілюструє розвиток видів від спільного предка, тоді як неукорінене показує зв'язки без зазначення напрямку еволюції [1, с. 88-90].

На увагу заслуговує найпоширеніший метод реконструкції геному за даними секвенування, що базується на «графі де Бройна». Назва походить від імені математика Ніколаса де Бройна, який представив цю структуру даних як комбінаторний об'єкт ще в 1940-х роках. Однак граф де Бройна увійшов у біоінформатику 60 років потому, з появою високопродуктивного секвенування. Метод реконструкції геному на основі графа де Бройна використовує розбиття зчитувань секвенування на короткі фрагменти, k-мери. Граф будується так, що кожен унікальний k-мер є вершиною, а перекриття між ними — ребрами. Геном відновлюється шляхом пошуку ейлерового шляху, який проходить кожне ребро один раз. Метод потребує адаптації для обробки помилок секвенування та повторюваних або непокритих ділянок геному [2, с. 5-6].

Методи передбачення структури та функцій білків – це окрема категорія біоінформаційної методології. Найпоширенішими методами передбачення вторинної структури білків є **метод Чоу-Фасмена** (базується на частоті появи амінокислот в різних структурах (α -спіралі, β -листи, β -згини) і використовує правила для передбачення), **моделювання нейронних мереж** (програми розпізнають амінокислотні комбінації у відомих структурах і відрізняють їх від інших) і **метод «найближчого сусіда»**: амінокислоти розміщуються у відповідній конформації вторинної структури [1, с. 112-113].

Методи моделювання білків поділяються на два типи: на основі шаблону (гомологічне моделювання та метод протягування) і без шаблону (*de novo* та *ab initio*). **Гомологічне моделювання** використовує схожість амінокислотної послідовності з білком-шаблоном для створення тривимірної моделі. Його точність залежить від ступеня схожості послідовностей. **Метод протягування** передбачає «протягування» білка-мішені через бібліотеку відомих білкових укладок. **Моделювання *de novo*** поєднує фрагментацію та фізичну оптимізацію для побудови моделі. **Моделювання *ab initio*** базується на фізичних принципах і моделює білок за допомогою молекулярних симуляцій, але потребує великих ресурсів [1, с. 117-124].

Для пошуку та розробки нових лікарських засобів біоінформатика також пропонує свої методи. Виявлення мішеней для ліків можливе через експерименти або комп'ютерне моделювання. Біоінформатика дозволяє проводити віртуальний скринінг і прогнозувати властивості речовин, що зменшує витрати часу і грошей [1, с. 152].

У розробці ліків у нагоді стає і кріоелектронна мікроскопія—метод візуалізації живих організмів, який зараз займає важливе місце в структурній і клітинній біології, біоінформатиці, біомедицині та клітинній фізиці. Вона дозволяє вивчати білкові структури та частинки вірусів через електронний мікроскоп, у якому зображуються заморожені зразки. Цей метод активно застосовується для створення ліків, зокрема для дослідження трансмембранних білків і нейродегенеративних захворювань. Також він використовувався для вивчення структури білків вірусу SARS-CoV-2, що допомогло у розробці терапевтичних засобів [7, с. 379].

Систему «ЕкоІС» розроблено для моніторингу в різних часових інтервалах – від мілісекунд після впливу хімічних речовин на клітини до змін у популяціях організмів через місяці чи роки. Система базується на комп'ютерних технологіях і використовує біосенсиори з електро-, хемочутливими мембранами нейронів мозку. Це дозволяє виявляти речовини у мінімальних кількостях (до 1-2 мілімолей на літр). Завдяки експертній системі, «ЕкоІС» розпізнає хімічні речовини та надає висновки щодо їх безпечності або небезпеки. Доукомплектована версія може також виявляти пожежну небезпеку [8, с. 71-72].

Система «Spark» використовується для прискорення аналізу великих біологічних даних у різних сферах: від аналізу послідовностей до епігенетики, філогенетики, розробки ліків, одноклітинного секвенування РНК та генетичних досліджень населення. SparkSeq значно покращує швидкість обробки NGS-даних, а CloudPhylo вирішує завдання філогенетичної реконструкції. У дослідженні CpG-островів і відкритті ліків застосування система «Spark» дозволила суттєво зменшити час аналізу та підвищити точність. Такі інструменти як VariantSpark і SEQSpark прискорюють генетичні дослідження, а Biospark спрощує обробку великих числових даних. «Spark» забезпечує високу продуктивність і масштабованість для біоінформатики [9].

Сучасні молекулярно-генетичні та біоінформатичні методи дослідження геномів мікроорганізмів відкривають можливості для їх ідентифікації та вивчення мікроеволюційних процесів через аналіз консервативних ділянок геному. Швидкий прогрес молекулярно-біологічних технологій сприяє створенню великих баз даних із результатами досліджень у цій галузі. Однак це породжує нові труднощі — обробка та аналіз значних обсягів інформації стають усе складнішими, особливо для баз даних нуклеотидних послідовностей, таких як GenBank.

Інтернет-сервіси надають доступ до анотованих списків нуклеотидних послідовностей на запити, які містять ключові слова, як-от назва гена, організму чи реєстраційний номер послідовності. Водночас можливості для обробки та аналізу цих даних є досить обмеженими. Коли список містить лише кілька записів, їх можна переглянути вручну, але якщо записів сотні чи тисячі, це стає непродуктивним і практично неможливим завданням.

Коли постає необхідність визначити кількість нуклеотидних послідовностей для кожного виду певного роду і їхній зв'язок з певними генами, ручний перегляд стає надто трудомістким. Серія запитів з різними видами або генами також не спрощує аналіз. Крім того, наявність помилок у базах даних може призводити до втрати інформації, що спотворює результати дослідження.

Висновки. Отже, біоінформатика стала незамінним інструментом у сучасній біотехнології. Її застосування варіюється від розкриття таємниць людського геному до розробки нових лікарських засобів. У роботі було розглянуто як базові, так і нові біоінформаційні технології та системи, що сприяють оптимізації біотехнологічних досліджень, підвищенню їх швидкості та точності. Перспективи подальших досліджень вбачаємо в аналізі біоінформаційних методів для розробки вакцин проти вірусу грипу.

Список використаної літератури

1. Кеца О. В. Основи біоінформатики: навч.-метод. посібник. Чернівецький нац. ун-т ім. Ю. Федьковича. Чернівці, 2018. 192 с. URL: <https://archer.chnu.edu.ua/xmlui/handle/123456789/3149>
2. Lemaitre, C., Salson, M., Touzet, H. Comment la bioinformatique a résolu le puzzle du génome du SARS-CoV-2. HAL, 2022. 6 p. URL: <https://inria.hal.science/hal-03896532/file/Article1%20-%20decouverte.pdf>

3. Sidi, M. L. A. Nouvelles approches informatiques et mathématiques pour la résolution de problèmes biologiques. Doctoral dissertation. Université de Tours-LIFAT, 2022. URL: <https://hal.science/tel-03807522/document>
4. About BLAST. URL: https://www.megasoftware.net/web_help_7/hc_about_blast.htm
5. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
6. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC168907/>
7. Lévy, D., Di Cicco, A., Bertin, A., Dezi, M. La cryo-microscopie électronique révèle une nouvelle vision de la cellule et de ses composants. *Médecine/sciences*, 37(4), 2021. P. 379-385. URL: <https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/pdf/2021/04/msc200425.pdf>
8. Ключко, О. М., Пітерцев, О. А., Миронов, Д. О., Тищук, Б. В. Біоінформаційна система «ЕкоІС» з базами даних та інкорпорованими біосенсорами. Редакційна колегія, 2020. 70 с. URL: https://www.researchgate.net/profile/Olena-Klyuchko/publication/361349651_Bioinformacijna_sistema_EkoIS_z_bazami_danih_ta_inkorporovanimi_biosensorami/links/62acb5e1193368baa4c32b/Bioinformacijna-sistema-EkoIS-z-bazami-danih-ta-inkorporovanimi-biosensorami.pdf
9. Guo, R., Zhao, Y., Zou, Q., Fang, X., Peng, S. Bioinformatics applications on Apache Spark. *GigaScience*, 7(8), 2018. URL: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy098>