

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

Кириленко Сергій Дмитрович

УДК 619:616:575.11

ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ОКРЕМИХ ШТАМІВ
ТА ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ КЛАСИЧНОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ

03.00.03 - молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеню
кандидата біологічних наук

Київ -1996

377.2

46.36.215

Роботу виконано у відділі рег
молекулярної біології і генети

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00757190 (Т)

Науковий керівник: чле

професор В. А. Кордюк.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук О. П. Соломко,
кандидат біологічних наук О. М. Живолуп.

Ведуча організація: Інститут мікробіології і вірусології ім. академіка
Заболотного НАН України

Захист дисертації відбудеться 24 грудня 1996 року о 10 годині на
засіданні спеціалізованої ради Д 016. 011. 01 по захисту дисертацій на
пошукання вченого ступеню кандидата біологічних наук при Інституті
молекулярної біології і генетики НАН України за адресою:
252143, Київ - 627, вул. академіка Заболотного, 150.

тел.: 266-55-96, факс: 266-07-59.

3 дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розіслано 20 листопада 1996 року.

вчений секретар
спеціалізованої ради,
канд. біол. наук

Л. Л. Лукаш.

Вступ. Класична чума свиней (КЧС) є одним з найбільш небезпечних вірусних інфекційних захворювань, що наносить значні економічні збитки тваринництву в багатьох країнах світу, в тому числі, і в Україні. Збудником КЧС є вірус (ВКЧС) роду *Pestivirus*, віднесений до родини *Flaviviridae* [J. M. Collett, 1988]. На сьогоднішній день в країнах так званого поясу свинарства в ветеринарній практиці все частіше зустрічаються слабковірулентні ізоляти ВКЧС, які викликають імунну толерантність і довгочасне вірусносієство, що приводить до появи атипових форм КЧС [А.Л.Семенихин, 1995]. Це, а також наявність перехресних реакцій з іншими пестівірусами в серологічних дослідженнях, ускладнює діагностику хвороби. Складною проблемою залишається питання диференціації видів, штамів та ізолятів пестівірусів.

Погіршення епізоотичної ситуації по КЧС в останні роки, поява атипових форм інфекції на фоні циркуляції слабковірулентних ізолятів вірусу і широкого використання живих вакцин в країнах СНД робить актуальною не тільки своєчасну та точну діагностику збудника КЧС, але і аналіз популяції вірусу КЧС (ВКЧС) в кожному випадку спалаху захворювання. Оскільки ці проблеми постали перед усіма країнами з розвиненим свинарством, така ситуація зумовлює поглиблений вибір стратегічних напрямків досліджень, якими стають:

- i) використання моноклональних антитіл (МКА) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення ВКЧС і диференціації його від інших пестівірусів;
- ii) порівняльний аналіз геномів ізолятів, що зустрічаються на території країни;
- iii) створення банків генів ВКЧС та їх філогенетичний аналіз;
- iv) експресія окремих генів ВКЧС в системах про- та еукаріотів та розробка на їх основі рекомбінантних вакцин та компонентів для діагностичних систем.

Як можливий шлях до вирішення проблеми масової скринінгової діагностики пропонується використання дешевого традиційного імуноферментного аналізу (ІФА), але такого, що базується на застосуванні рекомбінантних білків і моноклональних антитіл. Вважається, що висока специфічність таких компонентів дозволить зменшити або уникнути перехресних реакцій з іншими представниками роду *Pestivirus*. Крім того,

продуценти рекомбінантних білків є джерелом отримання неінфекційного антигену в значних кількостях.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Головною метою запропонованої роботи було проведення досліджень, спрямованих на: порівняльне вивчення геномів окремих ізолятів вірусу класичної чуми свиней, створення генно-інженерної системи отримання поверхневого білку Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней та вивчення його властивостей, розробка молекулярно-біологічних методів виявлення окремих ізолятів вірусу класичної чуми свиней.

Для виконання такого завдання було необхідно:

1. Отримати та клонувати фрагмент гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней, визначити його первинну послідовність.

2. Провести пошук гомології первинної послідовності фрагменту гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней до інших послідовностей, що наявні на цей час в комп'ютерних банках даних.

3. Провести порівняльний філогенетичний аналіз первинної послідовності фрагменту гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней та гомологічних послідовностей інших штамів цього вірусу, що наявні на цей час в комп'ютерних банках даних.

4. Розробити генно-інженерну систему отримання фрагменту білку Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней в *E. coli*.

5. Провести дослідження, спрямовані на вивчення фізико-хімічних властивостей отриманого рекомбінантного білку, з метою подальшого вивчення його імунологічних властивостей та використання як неінфекційного антигену для імуно-ферментних діагностикумів та рекомбінантних вакцин.

6. Розробити систему виявлення окремих ізолятів вірусу класичної чуми свиней на основі зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції.

7. Розробити систему порівняльного виявлення вірулентних та вакцинних штамів вірусу класичної чуми свиней із застосуванням технології молекулярної гібридизації на основі зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ ТА ЇЇ ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ . За

результатами роботи було розраховано та хімічно синтезовано оригінальну пару праймерів, що дозволило розробити систему для виявлення вірусу класичної чуми свиней на основі зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції. Ця система виявилася дуже інформативною і отримала високу оцінку практичних вірусологів. Вперше було клоновано фрагмент гену Е1 вірулентного штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней. Започатковано роботу по впровадженню розроблених методів в широку ветеринарно-вірусологічну практику.

Вперше було визначено первинну послідовність фрагменту гену Е1 вірулентного штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней. Це дало змогу провести пошук гомологій первинної послідовності фрагменту гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней до інших послідовностей, що наявні на цей час в комп'ютерних банках даних. Вперше проведено порівняльний філогенетичний аналіз первинної послідовності фрагменту гену Е1 вірулентного штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней та гомологічних послідовностей інших штамів цього вірусу, що наявні на цей час в комп'ютерних банках даних. Було встановлено, що штам Ші-Минь який використовуються в країнах СНД, в тому числі, і в Україні, як контрольний, та штам Альфорт, який використовується міжнародними референс-центрами МЕБ як референтний, знаходяться на протилежних полюсах філогенетичного дерева різних штамів ВКЧС, нуклеотидні послідовності яких наявні в банках даних. Це дало змогу зробити деякі практичні висновки щодо доцільності пошуку та характеристики інших вірулентних штамів ВКЧС з метою використання їх в Україні як референтних для практичної вірусології. Інформацію про нуклеотидну послідовність фрагменту гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней було передано до міжнародного банку послідовностей EMBL.

З використанням аналізу даних різних літературних джерел щодо вкладу конкретних епітопів до загальних імуногенних властивостей білка Е1 ВКЧС, розроблено генно-інженерну систему отримання фрагменту білку Е1 штаму Ші-

Минь вірусу класичної чуми свиней в Е. coli. Отримання конкретно такого фрагменту не було описано раніше. Це дало змогу започаткувати нову роботу по вивченню імунологічних властивостей рекомбінантного білка Е1 ВКЧС з метою створення безвірусних неінфекційних серологічних діагностиків та рекомбінантних вакцин.

СТРУКТУРА І ОБ'ЄМ РОБОТИ. Дисертацію викладено на 100 стор. машинописного тексту та оформлено у відповідності з Інструктивним листом ВАК України № 3 від 5 липня 1994 року. Вона складається з вступу, огляду літератури, методичної частини, опису результатів та їх обговорення, та висновків. Роботу ілюстровано 8 малюнками та 2 таблицями. Список цитованої літератури містить 145 джерел.

АПРОБАЦІЯ. Матеріали дисертації доповідались на міжнародній робочій нараді за участю провідних європейських вірусологів в IBM УААН від 27 вересня 1996 року. Дисертаційна робота пройшла апробацію на спільному науковому семінарі відділу біохімічної генетики та відділу регуляторних механізмів клітини ІМБіГ НАНУ від 19 вересня 1996 року. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті та 4 тези стендових доповідей.

ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. В роботі використовували вірулентний штам ВКЧС Ші-Минь, адаптований до перевивної культури клітин нирки свині РК-15, на рівні 37-го пасажу в даній системі (цей штам використовується в Україні для контрольного зараження свиней при перевірці імуногенних властивостей вакцин); зразки патматеріалів з господарств, де спостерігалась гостра форма хвороби, діагностовані на наявність ВКЧС референтними методами. Всі маніпуляції з інфекційними матеріалами проводились в лабораторії епізоотології Інституту ветеринарної медицини (ІВМ) УААН; матеріали були люб'язно надані провідним науковим співробітником Гришок Л. П.. Препарат вакцинного штаму ВКЧС ЛК (культуральний, живий, атенуований) був люб'язно наданий філією Контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок.

Виділення віріонної РНК проводили за схемою [D. Rasschaert, 1988] з модифікаціями (освітлений лізат заражених клітин був переварений протеїназою К в присутності ДСН з послідуною фенольною екстракцією). Комп'ютерний аналіз і підбір олігонуклеотидних праймерів, які фланкують фрагмент гену Е1 ВКЧС, проводили з використанням програмного забезпечення Primer Detective (Clontech Labs., v. 1.01). Прямий праймер СНУМ-А має послідовність 5'-TTACCCACTTCCGTGACATTCG-3' та локалізацію на послідовності РНК шт. Brescia (М31768) 2647-2668, зворотній праймер СНУМ-В 5'-TATCTTCCTCCCAACAGTGCC-3' локалізується в позиціях 3492-3471. Синтез олігонуклеотидних праймерів був виконаний за фосфорамидитним методом на ДНК-синтезаторі Gene Assembler Special (Pharmacia).

Зворотню транскрипцію препарату вірусної РНК проводили за допомогою зворотної транскриптази із вірусу мієлобластоу птахів, що була виділена у відділі біосинтезу НК та люб'язно надана Кавсаном В. М. (ІМБіГ НАНУ). ПЛР виконували на термоциклері Gene Aтаq Controller (Pharmacia) за звичайною методикою [R. K. Saiki, 1986], з модифікаціями для нашого об'єкту. Фрагмент ЗТ-ПЛР довжиною 845 п. н., що мав близько від країв сайти пізнання ендонуклеаз рестрикції SacI та EcoRI (позиції на послідовності шт. Brescia 2668 та 3448 відповідно), був оброблений відповідними рестриктазами, та вкорочений фрагмент довжиною 776 нт був елюований із агарозного гелю за методом замороження з фенолом [F. Hojman, 1990], після чого клонований в вектор загального призначення pUC18 по відповідних сайтах рестрикції [F. Sambrook, 1989]. Первинна послідовність фрагменту отриманої плазмиди pUC18-776 було визначено за методикою [F. Sanger, 1977] на автоматизованому лазерному секвенаторі A.L.F. фірми Pharmacia з використанням Auto Read Sequencing Kit цієї ж фірми.

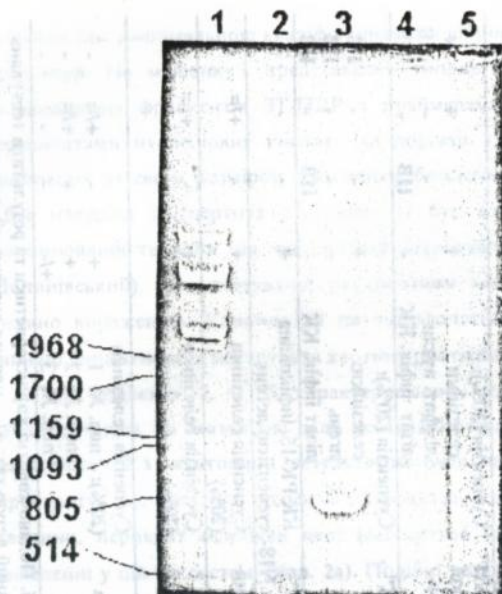
Після виконання електрофорезу в ТБЕх0.5, фарбування бромистим етидієм та фотографування, фрагменти ДНК були перенесені та імобілізовані на нітроцелюлозній мембрані Hybond-C Extra фірми Amersham по методиці [E. M. Southern, 1975] у відповідності з методичними рекомендаціями цієї ж фірми. Мічення діджоксидженіном (DIG) фрагментів ДНК, виділених із агарозного гелю, молекулярну гібридизацію та виявлення результатів гібридизації виконували за допомогою DIG DNA Labelling and Detection Kit фірми Boehringer Mannheim в жорстких умовах у відповідності з рекомендаціями виробника.

Індукція культури *E. coli* JM109, що несе експресуючі плазміди, проводилась у відповідності з рекомендаціями фірми Pharmacia. Клітини руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі MSE. Матеріал центрифугували, аліквоти осаду та суренатанту брали для приготування зразків для білкового денатуруючого електрофорезу в 12,5% ПААГ [U. K. Laemmli, 1970].

Глютатіон було імібілізовано на епоксі-активовану сефарозу 6В (Pharmacia) як рекомендовано виробником. Афіне очищення проводили в вільному об'ємі в пробірках Eppendorf, як рекомендує фірма Pharmacia. Нерозчинну в нормальних фізіологічних умовах білкову фракцію було розчинено в 8М розчині хлористого гуанідину та діалізовано супроти слабосольового буферного розчину. Діалізовані зразки центрифугували, аліквоти осаду та супернатанту брали для білкового електрофорезу. Сильнорозбавлені білкові зразки перед нанесенням на форец концентрували пересадженням почергово ТХУ та ацетоном у відповідності з рекомендаціями, люб'язно наданими Горловим Ю. І. (ІМБіГ НАНУ).

Пошук через систему Internet по банках даних GeneBank, EMBL, PDB та DDBG послідовностей, що мають виражену гомологію до послідовності клонованого фрагменту гену E1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней, було виконано за допомогою сервера BLAST Network Service по алгоритму blastn. Подальший аналіз виконано за допомогою пакету PCGENE. Послідовності різних штамів та ізолятів ВКЧС було вирівняно до послідовності клонованого фрагменту за допомогою програми FSTNSCAN та гомологічні відрізки послідовностей ізолювані з точністю до 1 нуклеотиду. Далі фрагменти 15 послідовностей штамів та ізолятів ВКЧС (включаючи Ші-Минь) довжиною 772 нт. було порівняно, консенсус 1 та дендрограму побудовано за допомогою програми множинного порівняння CLUSTAL. Консенсус 2 було побудовано шляхом порівняння цих же послідовностей та послідовностей, перерахованих нижче (див. в тексті, побудова консенсусу 2, мал. 6).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Нами було підібрано та синтезовано оригінальну пару олігонуклеотидних праймерів CHUM-A та CHUM-B, за допомогою яких можливо ампліфікувати фрагмент гену E1 вірусу класичної чуми свиней довжиною 845 п. н. (мал. 1). Для виділення та очищення віріонної РНК був використаний простий метод [D. Rasschaert, 1988] лізису за допомогою ДСН та протеїнази К з послідуною фенольною екстракцією. Результатом процедури



Мал. 1. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами SHUM-A та SHUM-B та препаратами нуклеїнових кислот.

1 - маркер величини фрагментів ДНК (гідроліз ДНК фагу *PstI*, розміри фрагментів вказані диворуч). 2-5 - продукти ЗТ-ПЛР з препаратами нуклеїнових кислот із зразків слідуючих патматеріалів: 2 - експертиза 95, суспензія лімфовузла; 3 - експертиза 67, суспензія селезінки; 4 - експертиза 89, суспензія селезінки; 5 - експертиза 96, суспензія селезінки. Електрофорез було проведено в 1% агарозі та в буфері 0.5X TBE.

були препарати сумарної фракції нуклеїнових кислот, придатні для був використаний простий метод [D. Rassehaert, 1988] лізису за допомогою ДСН та протеїнази К з послідоючою фенольною екстракцією. Результатом процедури були препарати сумарної фракції нуклеїнових кислот, придатні для використання в ЗТ-ПЛР навіть після продовженого зберігання під етиловим спиртом на протязі 6 місяців при -20 град. С або протягом 2 діб при кімнатній температурі (дані не приведені). Присутність геномної ДНК свині або хромосомальної ДНК культур клітин не приводило до хибного відтворення ЗТ-ПЛР з праймерами SHUM-A та SHUM-B в контрольних експериментах (дані не приведені). Як вихідний матеріал для аналізів було використано зразки польових патматеріалів у вигляді 20 % суспензії різних органів або проморожені та освітлені зразки інфікованих культур клітин (табл. 1).

На стадії зворотної транскрипції для побудови кДНК в реакційну суміш вносилися обидва праймери, хоча для затравлювання РНК-залежного синтезу першого ланцюга кДНК на позитивному ланцюгу РНК необхідний тільки зворотній праймер. Відомо, що присутність прямого праймера стабілізує вихід кДНК [B. French, 1994]. Крім того, додавання обох праймерів доречно з точки зору мінімізації потенційних похибок піпетування при відтворенні методики

№ ек-сперт-изн	Область, господар-ство	Вікова група, стан	Наявність знак		Викорис-тана вакцина	Вид матеріалу	Результат тестування в МФА:		Результат виявлення в:	
			клінічні	патомор-фологічні			відби-ток	в КК	ОТ-ПЛР	Гір-я
41	---	---	---	---	---	Штам ШІ-Мінш, 4Пі тсаж в КК РК15	+	НВ	+	+
---	---	---	---	---	---	Вакцина "ЛК", м. Покров	НВ	НВ	+/-	-
67	Одеська, р-п До-лишівський	від загиблих свиней	+	+	"ЛК" Покров	Суспензія селезінки (20%)	+/-	НВ	+	+
89	Київська, р-п Трубіж-ський	від вимуше-но забитих свиней	СВ	СВ	ВГПКН Сумської біофабр.	Суспензія селезінки (20%)	+	-	-	НВ
95	Полтавська, к-п Кірова	від загиблих 7-місячних свиней	+	+	"ВГПКН" Сумської біофабр.	Суспензія (20%): селезінки лімфат. вузли лізат інфік. КК	+	-	+	+
96	Полтавська, к-п Леніна	від 2 - міс. поросят	СВ	+	"ЛК-К"	Суспензія (20%):	-	-	-	НВ
						селезінки:	+	-	-	НВ
						лєнь	-	-	-	НВ
лізат інфік. КК	-	НВ	-	НВ						
98	Донецька, р-п Металіст	від 2 - міс. поросят	+	+	"ЛК-К" РАН, с.Н18	КК РК-15, інфікована суспензією легень	+	-	-	-
103	Чернігівська, к-п Леніна	від 2 - міс. поросят	НД	НД	не вакци-новані	Суспензія селезінки (20%)	+	-	+/-	-
104	р-ка Крим, к-п Перемога	від вимуше-но забитих свиней	СВ	+	вакци-новані	Суспензія селезінки (20%)	+	-	+/-	-
107	Черкаська, р-п Маяк	від безмоло-зивних поросят	СВ	+	"ЛК" Покров	Суспензія селезінки (20%):	+	-	+/-	-
						пор. № 1	+	-	+/-	-
						пор. № 2	+	-	+/-	-
пор. № 3	+/-	-	-	-						

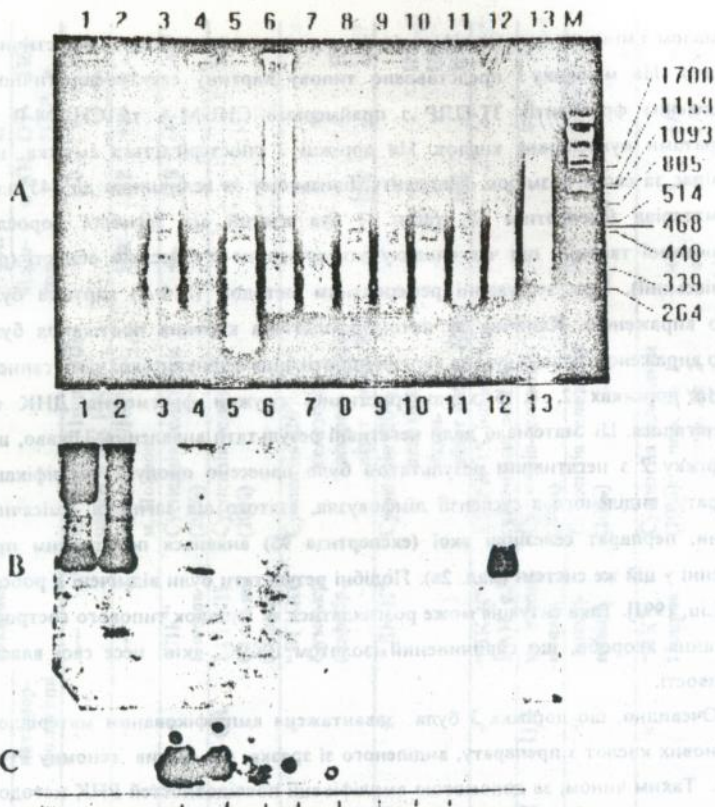
Таб. 1. Перелік зразків інфекційних матеріалів, використаних в роботі. Подано короткі характеристики та результати тестувань різними методами. Позначення: + - позитивний результат; - - негативний результат; +/- - неявно виражений результат; +/- - розподілення смужок на гель-електрофорезі, що відрізнялось від позитивного контролю та повторювалось на деяких зразках; СВ - слабковиражені ознаки; НВ - не визначали; НД - немає даних. Інші пояснення - в тексті.

персоналом з мінімальною кваліфікацією для широкомасштабних діагностичних процедур. На малюнку 1 представлено типову картину електрофоретичного розподілення фрагментів ЗТ-ПЛР з праймерами CHUM-A та CHUM-B та препаратами нуклеїнових кислот. На доріжці 3 спостерігається смужка, що відповідає за своїм розміром фрагменту, близькому за величиною до 845 п.н.. Цей матеріал (експертиза 67, табл. 1) був взятий від загиблої дорослої вакцинованої тварини під час спалаху захворювання в Одеській області (р-п Долинівський). При тестуванні референтним методом (МФА) картина була неявно вираженою. Клінічна та патоморфологічна картина протікання була сильно вираженою та нагадувала картину протікання африканської чуми свиней.

На доріжках 2, 4, 5 характеристичної смужки фрагментів ДНК не спостерігалось. Ці матеріали дали негативні результати виявлення. Цікаво, що на доріжку 2 з негативним результатом було нанесено продукт ампліфікації препарату, виділеного з суспензії лімфовузла, взятого від загиблої 7-місячної тварини, препарат селезінки якої (експертиза 95) виявився позитивним при виявленні у цій же системі (мал. 2а). Подібні результати були відмічені в роботі [S. T. Liu, 1991]. Така ситуація може розглядатися як випадок типового гострого протікання хвороби, що спричинений ізолятом ВКЧС, який несе свої власні особливості.

Очевидно, що доріжка 3 була завантажена ампліфікованим матеріалом нуклеїнових кислот з препарату, виділеного зі зразка, що містив генному РНК ВКЧС. Таким чином, за допомогою ампліфікації послідовностей РНК методом двохстадійної зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції вдалося показати, що цей спалах, вірогідно, був викликаний сильновірулентним ізолятом ВКЧС.

Розбіжності результатів на доріжках 4, 5 (експертизи 89, 96 відповідно) з результатами виявлення референтними методами (див. табл. 1) можна віднести за рахунок наявності серед польових ізолятів атипичних форм вірусу. Відомо, що для МФА використовуються поліклональні антитіла супроти вакцинних штамів ВКЧС. У випадку сильно варіабельного вірусу, яким є ВКЧС, активності таких антитіл може бути недостатньо для ефективного пізнання. Крім того, можливі варіанти вірусу, при яких праймери можуть бути недостатньо комплементарні геномній РНК вірусу, що може привести до хибнонегативних результатів. При проведенні процедур виявлення ВКЧС методом ЗТ-ПЛР нами було помічено, що деякі зразки результуються в нетиповому розподіленні фрагментів



Мал. 2. А) Електрофореграма в 1% агарозі та буфері 0,5X TBE рестриктивних фрагментів рекомбінантних плазмід та продуктів ЗТ-ПЛР. 1 - фрагменти гідролізу ендонуклеазами рестрикції *SacI* та *EcoRI* рекомбінантної плазмиди рUC18-776; 2 - 13 - продукти ЗТ-ПЛР з праймерами CHUM-A та CHUM-B та препаратами нуклеїнових кислот із слідуєчих зразків: 2 - експертиза 95; 3, 10 - експертиза 104; 4, 6 - вакцинний препарат ЛК; 5 - патматеріал від тварини 2 експертизи 107; 7, 8, 9 - патматеріали експертизи 107 від тварин 3, 2, 1 відповідно; 11 - експертиза 103; 12 - 41-й пасаж ВКЧС шт. Ші-Минь на культурі клітин РК-15; 13 - експертиза 98. М - маркер величини фрагментів ДНК (гідроліз ДНК фагу лямбда рестриктазою *PstI*, розміри фрагментів вказані праворуч).

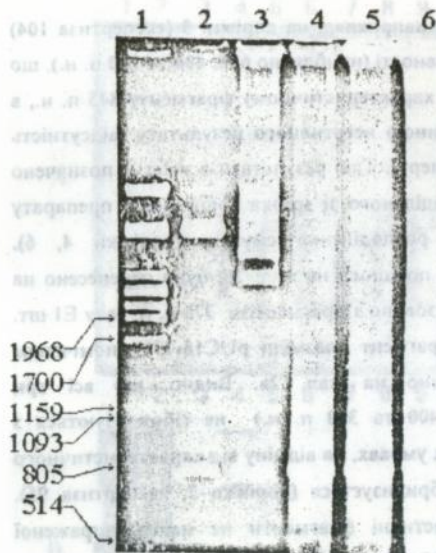
В) Гібридизація по Саузерну з матеріалом, перенесеним з гелю А та DIG-міченим фрагментом 776 п. о. плазмиди рUC18-776, гідролізованої *SacI* та *EcoRI*.

С) Контрольні дот-нанесення для прослідковування специфічності та чутливості методів гібридизації та детекції. Пояснення - в тексті.

ни електрофореграмах (мал. 2а). Так, наприклад, на доріжці 3 (експертиза 104) відмічалися три смужки різної інтенсивності (приблизно 650, 400 та 300 п. н.), що не відповідають за своїми розмірами характеристичному фрагменту 845 п. н., в той же час не будучи типовою картиною негативного результату (відсутність будь-яких смужок на фоні легкого шмеру). Такі результати в табл. I позначено як "+/-". Ампліфікація матеріалу, виділеного зі зразка вакцинного препарату ЛК, результувалася в аналогічне розподілення смужок (доріжки 4, 6). Електрофоретичні фрагменти з гелю, поданого на мал. 2а, було перенесено на нітронцелюлозну мембрану та згібридизовано з фрагментом 776 п. н. гену Е1 шт. Ші-Минь вірусу КЧС (SacI-EcoRI фрагмент плазміди рUC18-776), поміченим DIG. Результати гібридизації подано на мал. 2в. Видно, що всі три нехарактеристичні фрагменти (650, 400 та 300 п. н.) не гібридизуються з фрагментом гену Е1 ВКЧС у жорстких умовах, на відміну від характеристичного фрагменту 845 п. н., який добре гібридується (доріжка 2, експертиза 95). Можно заключити, що нехарактеристичні фрагменти не мають вираженої гомології до фрагменту гену Е1 ВКЧС. На мал. 2с приведені контрольні дотнашення для прослідковування специфічності та чутливості методів гібридизації та детекції. В верхньому рядку нанесено розбавлення контрольного міченого зонду (контроль детекції), в другому - п'ятикратні розбавлення контрольної мішені (рUC18-776), починаючи з 1 нг. Видно, що чутливість методу була на рівні одиниць пікограмів, що достатньо для виявлення навіть незначної гомології.

Таким чином, за результатами цих дослідів можна припустити, що в деяких зразках патматеріалів (експертиза 103, 104, 107), що були взяті під час спалахів з атипичним протіканням, викликаними слабовірулентними формами вірусу КЧС, присутня форма вірусу, яка знаходиться також в зразку вакцинного препарату ЛК супроти чуми свиней.

Серед ідентифікованих структурних білків ВКЧС - капсидного р14 (С), глікопротеїдів gp44/48 (Е2), gp33 (Е3), і gp55 (Е1) найбільш імуногенним є Е1: використання його рекомбінантного аналогу (експресованого в еукаріотах) як субодиночної вакцини, навіть без трансмембранної області, було достатнім для формування у тварин протективної імунної відповіді. Віруснейтралізуючі антитіла формуються головним чином до Е1 і в меншій мірі до Е2. Експресовані в Е. солі як "злиті" білки, Е1 та Е3 ВКЧС виявилися активними в ІФА з МКА до



Мал. 3. Електрофореграма рестриктивних фрагментів рекомбінантних плазмід та продуктів П.П.Р. 1 - маркер величини фрагментів ДНК (гідроліз ДНК фалу дямбда рестриктазою PstI, розміри фрагментів вказані зліва); 2 - фрагменти гідролізу ендонуклеазами рестрикції BamHI та EcoRI рекомбінантної плазмиди pUC18-776; 3 - фрагменти гідролізу ендонуклеазами рестрикції BamHI та EcoRI рекомбінантної плазмиди pGX-786; 4 - продукт ЗТ-П.П.Р з праймерами CHUM-A та CHUM-B та РНК ВКЧС польового ізоляту, гідролізованій ендонуклеазами рестрикції Sacl та EcoRI; 5 - той же продукт, гідролізованій тільки Sacl; 6 - той же продукт, без обробки рестриктазами.

ВКЧС, в т. ч. з такими, що мали віруснейтралізуючу активність [P.A. van Rijn, 1994]. Одною з наших задач було отримання фрагменту поверхневого білку E1 ВКЧС в *E. coli*. Оскільки послідовність геномної РНК шт. Ши-Минь ще не було визначено, як вихідну матрицю для розрахунків було використано послідовність ВКЧС шт. Brescia, оскільки картування геномної області, що кодує структурні білки цього штаму, було виконане з синтезом відповідних пептидів і перевіркою специфічності отриманих на них антисироваток з нативними афінно очищеними вірусними білками [R. J. Moogmann, 1990]. Виходячи з послідовності РНК цього штаму, нами були підібрані та синтезовані праймери CHUM-A та CHUM-B, що фланкують фрагмент гену білку E1 з сайтами пізнавання ендонуклеаз рестрикції Sacl (з 5'-кінця фрагменту, позиція 2668 на РНК шт. Brescia) та EcoRI (з 3'-кінця фрагменту, позиція 3448). На мал. 3, доріжка 6, показано фрагмент ЗТ-П.П.Р з праймерами CHUM-A та CHUM-B та віріонною РНК вірусу КЧС, що була виділена зі зразка патматеріалу (експертиза 95). Розмір фрагменту співпадає з розрахунковим значенням в 845 п.н.. Після обробки цього фрагменту ендонуклеазою рестрикції Sacl розмір його зменшується до 819 п.н. (доріжка 5). Обробка EcoRI не приводить до подальшого зменшення розміру до 776 п.н. (доріжка 4), так як наявність нуклеотидних замін в РНК польового ізоляту по відношенню до РНК штаму

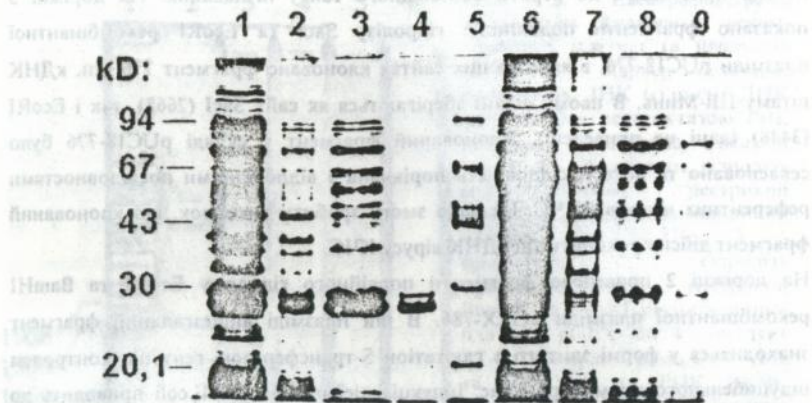
Brescia призводить до втрати відповідного сайту пізнавання. На доріжці 3 показано фрагменти подвійного гідролізу SacI та EcoRI рекомбінантної плазмиди pUC18-776, в якій по цих сайтах клоновано фрагмент 776 п.н. кДНК штаму Ші-Минь. В цьому штамі зберігаються як сайт SacI (2668), так і EcoRI (3448) (дані не приведені). Клонований фрагмент у складі pUC18-776 було секвеновано та його послідовність порівняна з відповідними послідовностями референтних штамів ВКЧС. Це дало змогу зробити висновок, що клонований фрагмент дійсно походить від кДНК вірусу КЧС.

На доріжці 2 приведено фрагменти подвійного гідролізу EcoRI та BamHI рекомбінантної плазмиди pGEX-786. В цій плазміді вищезгаданий фрагмент знаходиться у формі злитого з глютаціон S-трансферазою гену під контролем індукбельного промотора pTac. Індукція цієї плазмиди в E.coli приводить до синтезу злитого білку розміром близько 59 кД (рис.2), в якому 27,5 кД походить від глютаціон S-трансферази та 31 кД являє собою рекомбінантно відтворену внутрішню частину білку E1 (gp51-55) ВКЧС штаму Ші-Минь.

Рекомбінантний білок 59 кД знаходиться головним чином у нерозчинній фракції (доріжки 6, 7, 8, 9), на відміну від контрольної індукції вихідної плазмиди pGEX-2T (доріжки 1, 2, 3, 4), де синтезований білок 27 кД знаходиться як у нерозчинній фракції (осад), так і в розчинній (супернатант). Білок 59 кД розчиняється в 8 М розчині хлористого гуанідину, але випадає в осад при діалізі супроти низькосольових буферних розчинів (дані не приведені).

На послідовності геномної РНК штаму Brescia білок E1 кодується нуклеотидними залишками 2428-3535 [R. J. Moormann, 1990], розрахункова маса неглікозильованого білку - близько 44 кД; тобто, нами було відтворено значну частину (близько 70 %) білку E1. N-кінець відтвореного фрагменту містить попередньо картований консервативний антигенний домен А [A. van Rijn, 1996]. С-кінець відтвореного фрагменту безпосередньо межує з гідрофобним трансмембранним доменом (кодується нуклеотидами 3454-3507 на РНК штаму Brescia) [[R. J. Moormann, 1990].

Експресія в E.coli супроводжується утворенням неглікозильованої форми вірусного білку, що може накладати певні обмеження на його антигенні та імуногенні властивості. Зменшення імуногенної активності у неглікозильованих білків може бути викликано зниженням їх резистентності до протеолізу і швидкою деградацією *in vivo*. В білковій інженерії запропоновано правило,



Мал. 4. Електрофореграма білкового ДСН-електрофорезу препаратів індукованих культур *E.coli* JM109, що несуть експресуючі вектори pGEX-2T або pGEX-786. 1, 2 - різні кількості препарату осаду після озвучення індукованої культури JM109[pGEX-2T]; 3, 4 - різні кількості препарату супернатанту після озвучення індукованої культури JM109[pGEX-2T]; 5 - маркер молекулярних вагів білкових продуктів (LMW Kit фірми Pharmacia), розміри вказані зліва; 6, 7 - різні кількості препарату осаду після озвучення індукованої культури JM109[pGEX-786]; 8, 9 - різні кількості препарату супернатанту після озвучення індукованої культури JM109[pGEX-786];

згідно якого амінокислота на N-кінці білку визначає час його деградації *in vivo*. В нашому випадку рекомбінантний білок E1, експресований з вектора pGEX-786, після відщеплення тромбіном від носія глутатіон S-трансферази, несе на амінокінці залишок глютамінової кислоти, яка може подовжувати час деградації, порівняно з багатьма іншими залишками. Для подальшого підвищення стабільності існують методи, які дозволяють маскувати центри протеолізу на білку. Іншим важливим стабілізуючим фактором білкової молекули є насиченість її дисульфідними зв'язками. Кількість і позиції цистеїнових залишків, що формують ці зв'язки, взагалі відносяться до розряду консервативних характеристик вірусних глікопротеїнів. Для E1 вірусу КЧС показано [P. A. van Rijn, 1996], що його амінокінцева частина несе структурно незалежні дві антигенні субодиниці, на одній з яких знаходиться висококонсервативний домен А, а на іншій - неконсервативні В та С.

Принципове значення для збереження антигенних властивостей ЕІ мають цистеїнові залишки Cys-792 (нумерація подана у відповідності з нумерацією на загальному поліпротеїні-попереднику штаму Brescia), що утворює дисульфідний місток з Cys-856, і Cys-818 з Cys-828, які беруть участь в формуванні доменів А і D. В експресованому нами білку позиції цих амінокислотних залишків збережені, але питання відносно правильного згортання поліпептидного ланцюга і утворення дисульфідних зв'язків між цими цистеїновими залишками потребує подальшого вивчення.

Відомо, що для правильного згортання поліпептиду *in vivo* часто необхідне глікозилювання, але внесок олігосахаридних ланцюгів в оформлення антигенної унікальності глікопротеїнів ВКЧС ще не визначений. Для білку ЕІ ВКЧС було показано [E. Weiland, 1990], що більшість моноклональних антитіл, отриманих до ЕІ референтного штаму Alfort ВКЧС і нейтралізуючих вірус в стандартних серологічних реакціях, реагувала з бактеріальним злитим з глутатіон S-трансферазою фрагментом білку ЕІ.

Отримані нами результати являють собою початковий етап роботи по вивченню антигенних і імуногенних властивостей білків ВКЧС. Рекombінантний білок та антитіла до нього будуть використані для розробки систем виявлення пестивірусів серологічними методами; при вивченні антигенної різноманітності ЕІ у штамів ВКЧС різного походження (вірулентних, вакцинних та польових ізолятів); вивченні механізмів, що визначають формування резистентності до КЧС у вакцинованих тварин, у яких відсутні віруснейтралізуючі антитіла.

Нами було клоновано фрагмент гену ЕІ (gp51-55) штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней довжиною 776 нт та визначено його первинну нуклеотидну послідовність (мал. 5). Визначена послідовність починається з сайту пізнавання ендонуклеази рестрикції SacI (що на гомологічній послідовності геномної РНК шт. Brescia локалізується в позиції 2668) та закінчується за 8 нт від сайту пізнавання EcoRI (на РНК шт. Brescia - 3448), праймера у зв'язку з близькістю місця затравлювання до сайту EcoRI.

Визначену послідовність фрагменту гену ЕІ штаму Ші-Минь, довжиною 772 нт, використали для пошуку гомологічних послідовностей, що зареєстровані в банках послідовностей. В результаті пошуку було отримано 51 послідовність пестивірусів різної довжини і ступеню гомології з заданим фрагментом. З отриманого масиву для наступного молекулярно-генетичного аналізу були

Ідентифікаційний код (accession)	Банк послідовностей	Штам чи ізолят ВКЧС	Характеристика	Позиція ділянки порівняння в послідовності	Гомологія з Shi-Min
	GenBank	Shi-Min	вірулентний	1 - 772	100 %
X96550	EMBL	CAP	вірулентний	2681 - 3452	96.8 %
X71780	EMBL	Weybridge	вірулентний	709 - 1480	95.6 %
X87939	EMBL	Alfort-187	дв	2681 - 3452	95.3 %
Z46258	EMBL	Chinese	лапінізований	2681 - 3452	93.3 %
A16790	EMBL	Meyers G.	дв	2671 - 3442	82.8 %
Z22525	EMBL	Muyldermans, G.	дв	2667 - 3438	95.5 %
J45478	GenBank	Glentorf	слабковірулентний	2661 - 3432	96.9 %
M31768	GenBank	Brescia	сильновірулентний	2668 - 3439	91.5 %
U45477	GenBank	Riems	вакциний	2681 - 3452	93.3 %
J04358	GenBank	Alfort	сильновірулентний	2671 - 3442	82.2 %
U43924	GenBank	Taiwan p97	дв	241 - 1012	83.7 %
L49347	GenBank	p97	дв	2574 - 3345	83.6 %
D49532	DDBJ	ALD (Ishikawa, 1995)	польовий ізолят	2681 - 3452	95.1 %
D49533	DDBJ	GPE(-)	вакциний	2681 - 3452	94.9 %

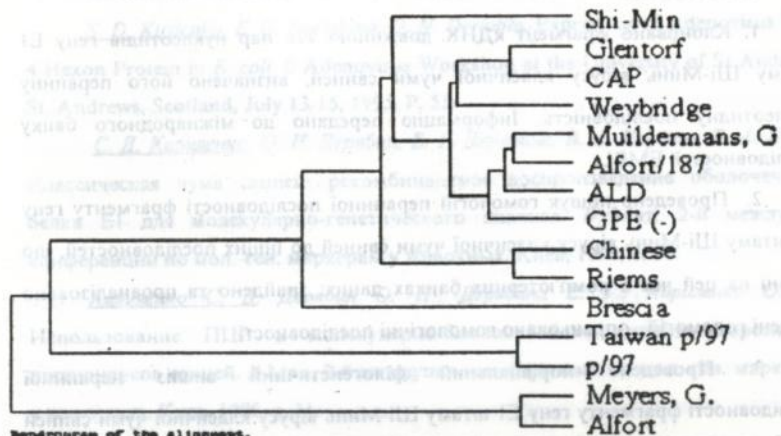
Таблиця 2. Штами та ізоляти ВКЧС, послідовності яких були використані при побудові консенсусу 1 та дендрограми. дв - дані відсутні.

підібрані дві групи послідовностей: перша складалася з 14 штамів і ізолятів ВКЧС (таб. 2), вони містили відрізок послідовності, гомологічний фрагменту 772 нт шт. Ші-Минь цілком; консенсус за результатами порівняння послідовностей в цій групі подано на мал. 5 (con1). До другої були додатково занесені послідовності (неповні) штамів LPC, ALD та ізоляту A19 ВКЧС, а також послідовності інших представників групи пестивірусів: 5 послідовностей вірусу вірусної діареї ВРХ (в тому числі референтні штами NADL, Oregon C24V, Singer, а також ізоляти BVD-BD31, FB1.91/1) та 2 послідовності вірусу прикордонної хвороби овечь (штам Clover lane (X818), ізолят L83/84); консенсус для цієї групи подано як con2.

Результати множинного порівняння нуклеотидних послідовностей наведено на мал. 5. На послідовності підкресленням виділено фрагмент, гомологічний послідовності шт. Brescia, що кодує пептид, антисироватка на який реагувала в імуноблотингу з нативним глікопротеїдом gp51-55 з інфікованої ВКЧС культури клітин [R. J. Moogmann, 1990]. Виділенням позначено положення триплетів, що кодують залишки цистеїну, які беруть участь у формуванні просторової структури поверхневого глікопротеїну E1 ВКЧС в тій його частині, що охоплює попередньо картований висококонсервативний антигенний домен А [P. A. van Rijn, 1996]. Ці залишки цистеїну зберігають консервативність в приведеному порівнянні послідовностей різних штамів та ізолятів ВКЧС, а також в порівнянні цих же послідовностей з послідовностями 5 штамів вірусу діареї ВРХ та 2 штамів вірусу прикордонної хвороби овець.

Результати проведеного аналізу дозволяють розрахувати пари праймерів, які б максимально відповідали консенсусу 1 і були б специфічними для будь-якого штаму чи ізоляту ВКЧС. Ступінь гомології по гену E1 зі штамом Ші-Минь в цій групі становить від 82,8% до 96,9% (шт. Alfort і шт. Glentorf, відповідно). Консенсус 2 дає можливість розрахувати праймери, які були б загальними для усіх представників роду Pestivirus. Гомологія зі штамом Ші-Минь в цій групі складає 65,2-66,2% для ВВД ВРХ і 68,8-69,0% для ВПХО. Подібні розрахунки доречні при проведенні діагностичних досліджень КЧС і диференціації ВКЧС від інших пестівірусів з використанням ЗТ-ПЛР.

Враховуючи, що в першій групі зібрані ізоляти та штами ВКЧС, які виділені в різних регіонах світу та в різний час, відрізняються між собою по ступеню вірулентності, а частина з них пов'язана між собою родинними взаємозв'язками, було проведено аналіз по визначенню генетичної відстані по E1 (gp51-55) між ними і штамом Ші-Минь. По результатах аналізу побудовано філогенетичне (еволюційне) дерево (мал. 6). Аналіз дендрограми свідчить про близькість (по гену E1) штаму Ші-Минь до групи західно-європейських штамів ВКЧС (найбільша - з помірновірулентним штамом Glentorf) і велику генетичну відстань з сильновірулентним штамом Alfort, який використовується при діагностиці КЧС в референс-центрах МЕБ та наукових лабораторіях якості міжнародного референтного штаму ВКЧС. Позиція, яку займає штам Alfort на еволюційному дереві, вказує на те, що він знаходиться набагато ближче до спільного для всіх штамів ВКЧС предка, ніж всі інші використані в аналізі



Мал. 6. Філогенетичне дерево, побудоване шляхом множинного порівняння послідовностей фрагменту гену E1 (gp 51-55) різних штамів ВКЧС. Довжина гілок пропорційна запропонованій еволюційній дивергенції гілок (послідовностей), що в свою чергу пропорційна середньому числу відмінностей на один нуклеотидний залишок. Точки дихотомічного ділення відповідають точкам еволюційної дивергенції.

ізоляти та штами ВКЧС. Характер дендрограми дає підстави припускати, що для цього штаму характерна мала швидкість антигенного дрейфу порівняно з іншими штамами ВКЧС. Це знаходить підтвердження в результатах повідомлення [14]: серед моноклональних антитіл, отриманих до E1 штаму Alfort, виявлені антитіла, що були специфічними тільки для цього штаму. Проведення порівняльного епітопного картування глікопротеїну E1 різних штамів та ізолятів дозволить ідентифікувати, які мутації нуклеотидної послідовності дали внесок в створення чи руйнування конкретних антигенних детермінант, та визначити характер антигенного дрейфу для штамів, віддалених один від одного на філогенетичному дереві.

Якщо розглядати використання протягом десятиліть штаму Ші-Минь для оцінки і відбору вакцин як свосвідний селекційний тиск на формування популяції вірусу в Україні, то особливої актуальності набуває виділення місцевих ізолятів ВКЧС з різною вірулентністю, їх молекулярно-генетичний аналіз, епізоотичне картування регіонів по КЧС та оцінка еволюційних тенденцій в популяціях ВКЧС в Україні. Результати проведеної роботи створюють необхідні передумови для ефективного виконання таких досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Клоновано фрагмент кДНК довжиною 776 пар нуклеотидів гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней, визначено його первинну нуклеотидну послідовність. Інформацію передано до міжнародного банку послідовностей EMBL.

2. Проведено пошук гомологій первинної послідовності фрагменту гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней до інших послідовностей, що наявні на цей час в комп'ютерних банках даних; знайдено та проаналізовано ступені гомологій, опрацьовано гомологічні послідовності.

3. Проведено порівняльний філогенетичний аналіз первинної послідовності фрагменту гену Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней та гомологічних послідовностей інших штамів цього вірусу; визначено місце, яке займає штам Ші-Минь на дендрограмі в порівнянні з іншими штамми.

4. Розроблено генно-інженерну систему отримання фрагменту білку Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней в *E. coli*.

5. Досліджено фізико-хімічних властивості отриманого рекомбінантного білку. Проведено попередні дослідження по вивченню його імунологічних властивостей з метою подальшого вивчення та використання як неінфекційного антигену для серологічних діагностиків та рекомбінантних вакцин. Результати проведених досліджень лягли в основу теми державного планового завдання.

6. Розроблено систему виявлення скремних ізолятів вірусу класичної чуми свиней на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції. Результати направлено до референтного центру міжнародного епізоотологічного бюро (Пулави, Польща).

7. Розроблено систему порівняльного виявлення вірулентних та вакцинних штамів вірусу класичної чуми свиней із застосуванням технології молекулярної гібридизації на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції. Результати проведених досліджень лягли в основу теми державного планового завдання.

За матеріалами дисертації опубліковано такі роботи:

S. D. Kirilenko, E. G. Deriabina, O. N. Deriabina. Expression of Adenovirus Type 4 Hexon Protein in *E. coli*. // Adenovirus Workshop at the University of St Andrews. St. Andrews, Scotland, July 13-15, 1995, P. 55.

С. Д. Кириленко, О. Н. Дерябин, Е. Г. Дерябина, В. А. Кордюм, В. А. Бусол. Классическая чума свиней: рекомбинантное воспроизведение оболочечного белка Е1 для молекулярно-генетического анализа. // Мат. 2-й междунар. конференции по мол.-ген. маркерам у животных. Киев, 1996, с. 58.

Кириленко С. Д., Дерябин О. Н., Дерябина Е. Г., Кириленко О. Л. Использование ПЦР в молекулярно-биологическом анализе корона- и пестивирусов свиней. // Мат. 2-й междунар. конференции по мол.-ген. маркерам у животных. Киев, 1996, с. 11.

Кириленко С. Д., Дерябин О. Н., Дерябина Е. Г., Кириленко О. Л. Молекулярно-генетический анализ корона- и пестивирусов свиней методами ОТ-ПЦР и гибридизации по Саузерну. // Материалы первой российско - украинской международной конференции "Проблемы сохранения редких пород домашних животных и близкородственных диких видов" Москва, Пушкино, 1996, с. 21-22.

С. Д. Кириленко, О. М. Дерябин, О. Л. Кириленко, О. Г. Дерябина, В. О. Бусол. Клонування та надекспресія фрагменту гену структурного білку Е1 штаму Ші-Минь вірусу класичної чуми свиней в *Escherichia coli*. // Біополімери і клітина. - 1996. -Т. 12; № 5. -С. 94-100.

С. Д. Кириленко, О. М. Дерябин, Б. М. Трояновський, О. О. Созинов, Г. І. Н. Порівняльний філогенетичний аналіз кодувочої частини генів структурного білку Е1 штаму Ші-Минь та інших штамів вірусу класичної чуми свиней. // Цитологія і генетика, -1997, -Т. 31, (в друці).

С. Д. Кириленко, О. Л. Кириленко, О. М. Дерябин, Ю. О. Чередирик, Г. І. Н. Порівняльне виявлення вірусу класичної чуми свиней (ВКЧС) за допомогою зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) та молекулярної гібридизації. // Біополімери і клітина. -1996. -Т. 12, № 6, (в друці).

В. И. Глазко, С. Д. Кириленко, А. А. Созинов. Межлокусные ассоциации некоторых генетико-биохимических систем у крупного рогатого скота. // Генетика, 1997, (в печати).

Кириленко С. Д. Изучение структурных особенностей отдельных штаммов и изолятов вируса классической чумы свиней.

Защищается 8 научных работ, которые содержат теоретические исследования гомологии первичных последовательностей различных штаммов и изолятов вируса классической чумы свиней (ВКЧС), а так же результаты экспериментальных исследований. Определена нуклеотидная последовательность фрагмента длиной 772 п. о. гена E1 (gp 51-55) штамма Ши-Минь вируса классической чумы свиней, проведен филогенетический анализ и множественное сравнение гомологичных фрагментов последовательности штамма Ши-Минь и других штаммов и изолятов ВКЧС. Разработан чувствительный метод быстрого выявления ВКЧС в образцах патматериалов с помощью полимеразной цепной реакции. Получен продуцент рекомбинантного белка, воспроизводящего фрагмент (31 кД) поверхностного полипротеина E1 ВКЧС. Положено начало внеднию разработанных методов в широкую ветеринарно-вирусологическую практику.

S. D. Kirilenko. Study of structural peculiarities of some strains and isolates of classical swine fever virus.

The thesis comprises 8 research publications which contain both theoretical investigations of nucleic sequence homology of various strains and isolates of classical swine fever virus (CSFV) and results of experimental investigations. The primary nucleotide sequence 772 nt in length of E1(gp51-55) gene of strain Shi-Min of CSFV has been determined; phylogenetic analysis and multiple alignment of homologue fragments of strain Shi-Min and other strains and isolates of CSFV had been carried out. The rapid and sensitive method for detection of CSFV in field samples has been developed. The strain-producent of recombinant protein that reconstructs the internal fragment (31 kD) of envelope protein E1 of CSFV has been obtained. The application of methods developed into routine veterinary virology practice has been initiated.

Ключові слова: вірус класичної чуми свиней, поверхневий поліпротеїн E1, філогенетичний аналіз, рекомбінантний білок, полімеразна ланцюгова реакція, виявлення вірус-специфічної нуклеїнової кислоти.

Зам. 102 Формат 60x84/16 Обл. - вид. арк. 1,0

Підписано до друку 14.11.96 Тираж 100

Поліграфічна дільниця ІТФ ім. М. М. Воголибова НАН України

438128

AB 36.215