

УДК 578: 597.2/.5

## ВМІСТ КАТЕПСИНУ В У ПЕЧІНЦІ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) В ДИНАМІЦІ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

М. І. Майстренко, Л. П. Драган, Ю. П. Рудь  
dragan\_l@ukr.net

Інститут рибного господарства НААН, вул. Обухівська, 135, м. Київ, 03164, Україна

*Біохімічні аспекти патогенезу вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі (IPNV), збудником якого є вірус роду Aquabirnavirus родини Birnaviridae, в тканинах райдужної форелі практично не вивчені. Наявні в науковій літературі дані свідчать про те, що у риб, як і у теплокровних тварин, розвиток багатьох інфекційних захворювань супроводжується активацією протеолітичних процесів. Вважають, що пошкодження лізосом і частковий вихід протеолітичних ферментів у цитозоль є найбільш ранньою подією в інфікованих клітинах.*

*Відомо, що печінка це орган де постійно відбуваються активні процеси регенерації пошкоджених гепатоцитів, які тісно пов'язані з активацією біохімічних реакцій у лізосомах. Враховуючи той факт, що в клітинах печінки відбувається знешкодження та біоаккумуляція різноманітних ксенобіотиків, у тому числі і вірусів, метою роботи було вивчити активність катепсину В у печінці цьоголіток райдужної форелі, уражених вірусом інфекційного панкреатичного некрозу.*

*Проведені експериментальні дослідження показали, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу сприяє активації катепсину В у гомогенатах печінки райдужної форелі, що призводить до розпаду білків у інфікованих клітинах. Деградація білків обумовлена посиленням автолітичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази, однією з яких є катепсин В. Активація катепсину В виникає внаслідок пошкодження цілісності лізосомальної мембрани з подальшим порушенням компартменталізації ферментів, що призводить до вивільнення та зміни у функціонуванні тіолзалежних протеїназ. Аналізи отриманих результатів підтверджують участь ферментів лізосом у розвитку реакції організму на дію вірусу інфекційного панкреатичного некрозу райдужної форелі.*

**Ключові слова:** IPNV, КАТЕПСИН В, ПЕЧІНКА, РАЙДУЖНА ФОРЕЛЬ

## CATHEPSIN B MAINTENANCE IN THE LIVER OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) THROUGHOUT VIRUS INFECTION

М. І. Maistrenko, L. P. Dragan, Yu. P. Rud  
dragan\_l@ukr.net

Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences,  
Obukhivska St., 135, Kiev, 03164, Ukraine

*Biochemical aspects of pathogenicity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) that is the a causative agent of disease in rainbow trout (Aquabirnavirus of Birnaviridae family), in organism of rainbow trout practically not studied. Presented scientific literature data testify that for fishes, as well as for warm-blooded animals, development of many infectious diseases is accompanied by activating of proteolytic processes. Consider that destruction of lysosomes and partial exit of proteolytic enzymes in cytozole are the most early event in infected cells. In the liver of animals cells constantly there are processes of regenerations of the damaged hepatocytes, attended with activating of biochemical reactions in lysosomes.*

*Taking into account circumstance that there are active processes of rendering and bioaccumulation of different xenobiotics harmless in the liver cells, including viruses, the aim of work was to study activity of cathepsin B in a liver underyearling of rainbow trout, infected by the infectious pancreatic necrosis virus.*

*Undertaken experimental studies showed that the infectious pancreatic necrosis virus assists activating of cathepsin B in the liver tissues of rainbow trout resulting in disintegration of proteins in the infected cells. Degradation of proteins is conditioned by strengthening of autolytic processes and lysosomal proteinases is engaged in that. One of them is a cathepsin B. Activating of cathepsin B arises up because of damage of integrity of lysosomal membrane with subsequent violation of compartmentalization of enzymes, that results in freeing and change of functioning of the lysosomal enzymes in development of return reaction of organism on the action of infectious pancreatic necrosis virus of rainbow trout.*

**Keywords:** IPNV, CATHEPSIN B, LIVER, RAINBOW TROUT

## **СОДЕРЖАНИЕ КАТЕПСИНА В В ПЕЧЕНИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) В ДИНАМИКЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

*М. И. Майстренко, Л. П. Драган, Ю. П. Рудь*  
dragan\_l@ukr.net

Институт рыбного хозяйства НААН, ул. Обуховская, 135, г. Киев, 03164, Украина

*Биохимические аспекты патогенеза вируса инфекционного панкреатического некроза (IPNV), возбудителем которого является вирус рода Aquabirnavirus семейства Birnaviridae, в тканях радужной форели практически не изучены. Имеющиеся в научной литературе данные свидетельствуют о том, что у рыб, как и у теплокровных животных, развитие многих инфекционных заболеваний сопровождается активацией протеолитических процессов. Считают, что разрушение лизосом и частичный выход протеолитических ферментов в цитозоль является наиболее ранним событием в пораженных клетках.*

*Известно, что печень это орган где постоянно происходят активные процессы регенерации поврежденных гепатоцитов, которые тесно связаны с активацией биохимических реакций в лизосомах. Учитывая тот факт, что в клетках печени происходит обезвреживание и биоаккумуляция различных ксенобиотиков, в том числе и вирусов, целью работы было изучить активность катепсина В в печени сеголеток радужной форели, пораженных вирусом инфекционного панкреатического некроза.*

*Проведенные экспериментальные исследования показали, что вирус инфекционного панкреатического некроза способствует активации катепсина В в гомогенатах печени радужной форели, приводящей к распаду белков в инфицированных клетках. Дегградация белков обусловлена усилением аутолитических процессов, в которые вовлечены лизосомальные протеиназы одной из которых является катепсин В. Активация катепсина В возникает вследствие повреждения целостности лизосомальной мембраны с последующим нарушением компартментализации ферментов, что приводит к высвобождению и изменению функционирования тиолзависимых протеиназ. Анализ полученных результатов подтверждает участие ферментов лизосом в развитии ответной реакции организма на действие вируса инфекционного панкреатического некроза радужной форели.*

**Ключевые слова:** IPNV, КАТЕПСИН В, ПЕЧЕНЬ, РАДУЖНАЯ ФОРЕЛЬ

Біохімічні аспекти патогенезу вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV), збудником якого є вірус роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae*, в інфікованих тканинах радужної форелі практично не вивчені. Цей вірус вражає

мальків і цьоголіток лососевих риб. Клінічні ознаки хвороби характеризуються значними змінами в печінці, селезінці та в інших паренхіматозних органах, а також швидким її розвитком і високою смертністю інфікованих риб. Найвні в

науковій літературі дані свідчать про те, що у риб, як і у теплокровних тварин, розвиток багатьох захворювань супроводжується активацією протеолітичних процесів. Вони виникають внаслідок пошкодження внутрішньоклітинних мембран у тканинах інфікованих тварин та підвищення активності лізосомальних ферментів [1].

Актуальним є питання участі цистеїнових протеїназ у реалізації різних програм клітинної загибелі — апоптозу, некрозу, апонекрозу [2].

Припускають існування зв'язку між способом клітинної смерті та інтенсивністю лізосомальних пошкоджень, яке може призвести до обмеженого вивільнення лізосомальних ферментів у цитоплазму [3, 4]. Вважають, що подібна лізосомальна пермеабілізація і частковий вихід протеолітичних ферментів у цитозоль є більш ранньою і превалюючою подією, а не частиною більш пізніх ефекторних стадій клітинної загибелі [1].

Таким чином, за дії вірусів можуть створюватись умови для часткового виходу катепсинів із лізосом з активацією подальшого розпаду білкових структур, що призводить до порушення чисельних метаболічних процесів у клітині [3, 5, 6]. Враховуючи, що рН цитозольного середовища клітин наближене до нейтрального, а за дії IPNV відбувається його закиснення [7], то доцільно було визначити особливості активаційного каскаду катепсинів у цих умовах, а саме катепсину В (КФ 3.4.22.1), оскільки йому належить провідна роль у різних моделях програмованої клітинної загибелі і він є найбільш стабільним ферментом при фізіологічних рН за дії різних чинників [8].

Враховуючи той факт, що в печінці постійно відбуваються активні процеси знешкодження та біоаккумуляції різноманітних ксенобіотиків, у тому числі і вірусної інфекції [9], а також процесів регенерації пошкоджених гепатоцитів, що також пов'язано з активацією біохімічних реакцій у лізосомах [7], метою роботи було вивчити активність катепсину В у печінці цьоголіток райдужної форелі, уражених

вірусом інфекційного панкреатичного некрозу.

## Матеріали і методи

Для досліджень використовували цьоголіток райдужної форелі. Досліди зі штучного інфікування риб проводились в лабораторних умовах в ємностях об'ємом 40 дм<sup>3</sup> при температурі води 9 °С. Зараження IPNV проводили методом внутрішньочеревної ін'єкції. За джерело вірусу використовували вірусомісну культуральну рідину, інфіковані культури клітин RTG-2, з ознаками яскраво вираженого ЦПД (90 % ураження моношару). Вірусомісну культуральну рідину попередньо очищали від зруйнованих клітин і вводили риbam у дозі 0,5 мл. Щоденно проводили реєстрацію поведінки риб, а при розвитку захворювання аналізували клінічні, патологоанатомічні зміни і добову смертність. Для біохімічних аналізів використовували 10 % гомогенат печінки. Відбір матеріалу проводили в три етапи: 3-, 12- і 22-й день після інфікування вірусом. Активність катепсину В визначали згідно з методом [10] і виражали в нмолях п-нітроаніліну (п-НА), відщепленого від БАПНА за хвилину інкубації при 37 °С. Отримані результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерних програм «Statistica» для Windows.

## Результати й обговорення

Проведені експериментальні дослідження показали, що вірус інфекційного панкреатичного некрозу сприяє активації катепсину В у печінці райдужної форелі за весь період дослідження (рис.).

Згідно з представленими результатами, активність ферменту змінюється залежно від періоду після інфікування. Так, рівень активності катепсину В у гепатоцитах риб на 3-й день після інфекційного ураження IPNV зростав у 1,7 раза порівняно з контролем.

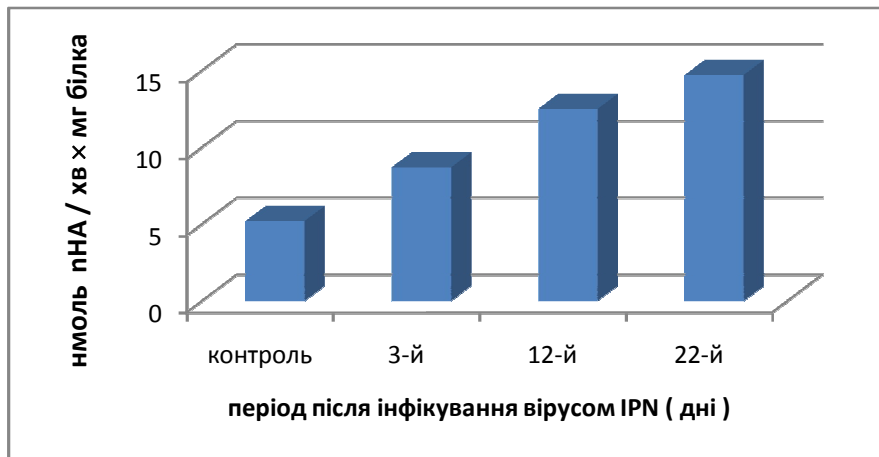


Рис. Активність катепсину В у печінці радужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*,) ураженої вірусом інфекційного панкреатичного некрозу.

Примітка: достовірно відносно до контролю;  $P \leq 0,05$

На 12-й день після ураження рівень активності ферменту підвищився у 2,4 раза відносно контрольного показника. А на кінець досліджуваного періоду захворювання радужної форелі (22-й день після інфікування) активність катепсину В зростала відносно контрольного значення у 2,8 раза.

Підвищення активності катепсину В у печінці за ураження IPNV можна пояснити порушенням мембранної проникності лізосом і вивільненням катепсинів, а також послабленням дії інгібіторів білкової та небілкової природи, що узгоджується з наведеними вище літературними даними [11, 12].

Відповідно до сучасних уявлень лізосомальні цистеїнові протеїнази розглядаються як позитивні медіатори, що задіяні в реалізації як початкових, так і кінцевих етапів клітинної загибелі, однак роль конкретних механізмів та зв'язок з іншими клітинними шляхами програмованої загибелі залишається до кінця не з'ясованим. Серією експериментальних досліджень було встановлено, що лізосомальні протеїнази можуть бути стабільними та зберігати активність при фізіологічних значеннях рН впродовж кількох годин після надходження до цитоплазми, що і обумовлює їх деструктивний потенціал під час розвитку клітинної загибелі [13]. Ряд авторів

постулює участь катепсинів в активації безпосередніх виконавців загибелі клітин — ефекторних каспаз [5, 6, 11, 13]. Експерименти, проведені *in vitro*, показали, що дія катепсину В направлена переважно на каспази-8, -9 і -3 [14]. Окрім того, катепсин В бере участь у розвитку загибелі, індукованої TNF $\alpha$ , у гепатоцитах миші, кардіоміоцитах, фібробластах або клітинах фібросаркоми, де каспази були заблоковані [15–17]. Це дозволяє припустити, що механізм дії катепсину В може відбуватися незалежно від каспаз.

Проте, у сучасній науковій літературі більш поширеною є модель, згідно з якою вивільнення лізосомальних протеїназ викликає мітохондріальну дисфункцію та надходження до цитоплазми проапоптотичних білків у результаті прямої та опосередкованої дії катепсинів [3, 18]. Дослідження Zhao M. et al. [6] показали, що додавання очищених катепсинів В і D до мітохондрій *in vitro* призводить до значного зростання ступеня генерування мітохондріями активних кисневих метаболітів. Встановлено [19], що катепсин В індукує мінімальний вихід цитохрому с, в той час як інкубація ізольованих мітохондрій з катепсином В за присутності цитоплазматичних екстрактів супроводжується значним вивільненням цитохрому с та розвитком характерних морфологічних ознак програмованої

клітинної загибелі. Ретельні і перспективні дослідження Stoka et al. [13] дали можливість запропонувати механізм опосередкованого катепсинами розвитку програмованої клітинної загибелі. В основі цього механізму є безпосереднє розщеплення катепсинами молекули проапоптотичного білка Bid, який ініціює загибель клітин за мітохондріальним шляхом. Як відомо, деградація Bid може здійснюватися також за участі каспази-8 та гранзиму В, але локуси розривання при цьому відмінні від сайту, що розпізнається катепсинами.

Отже, на початкових етапах загибелі клітин катепсини можуть діяти як самостійні медіатори, викликаючи активацію залежного від мітохондрій шляху індукції клітинної загибелі.

До цього часу залишаються невідомими механізми виходу протеолітичних ферментів із лізосом у відповідь на дію різноманітних індукторів клітинної загибелі, одним із яких є IPNV. Показано, що пермеабілізація мембран лізосом відбувається майже відразу після дії індукторів клітинної загибелі внаслідок сукупного впливу ряду факторів, зокрема накопичення у клітинах вільних радикалів і подальшої активації за їх участі процесів пероксидного окиснення ліпідів та активації фосфоліпази [9]. Підвищення проникності мембран також може бути пов'язано з внутрішньолізосомальними чинниками, наприклад, з акумуляцією всередині лізосом сфінгозину — речовини, що володіє вираженими лізосомотропними властивостями і подібно до детергентів викликає порушення цілісності лізосом [20].

Слід відмітити, що ступінь пошкодження лізосомальних мембран є одним із факторів, які визначають спрямованість клітинної загибелі шляхом апоптозу чи некрозу. Так, при незначних пошкодженнях лізосом спостерігається апоптотична загибель, в той час як при значному порушенні цілісності мембран, обумовленому, зокрема розвитком у клітинах оксидативного стресу відбувається надмірне надходження у

цитоплазму лізосомальних гідролітичних ферментів та індукція некрозу [2].

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу стимулює некротичні зміни у панкреатичній залозі форелі. Експериментальні дослідження свідчать про те, що смерть IPNV інфікованих клітин ініціюється апоптозом [21]. Апоптоз вважається фізіологічним процесом, який відбувається в процесі ембріогенезу, старіння і регресії пухлин. Вірусні інфекції також можуть слугувати тригерними механізмами апоптозу. Більшість катепсинів здатні ініціювати та посилювати апоптоз. Таким чином, на сьогодні найбільш ймовірною, на наш погляд, є модель лізосомальної теорії програмованої загибелі клітин під впливом IPNV, яка деталізується шляхом доповнення, розширення і отримання нових експериментальних підтверджень. У результаті дії як поза-, так і внутрішньолізосомальних факторів відбувається порушення цілісності лізосомальних мембран і гідролітичні ферменти, які вивільнилися з лізосом можуть: по-перше, прямо атакувати мітохондрії з подальшим надходженням проапоптотичних факторів (у тому числі і цитохром с, AIF та інші) у цитоплазму. У цьому процесі суттєва роль належить білку Bid, який після протеолізу запускає каскад мітохондріально-опосередкованої клітинної загибелі, і по-друге — активує літичні ферменти (наприклад, фосфоліпазу A<sub>2</sub>), дія яких спрямована на дестабілізацію мітохондріальних і лізосомальних мембран.

Важливо зазначити, що визначна роль в регуляції подій у печінці райдужної форелі, ураженої IPNV, належить також аденозинтрифосфату (АТФ), оскільки масивна втрата АТФ або пригнічення його синтезу в клітині призводить до набухання мітохондрій, порушенням плазматичної мембрани, виходом вмісту клітини в навколишнє середовище і розвитком запальної реакції [4]. Різка втрата клітиною енергії в результаті блокування мітохондріального дихання та/або гліколітичного утворення АТФ з

подальшим зниженням пулу цитозольного АТФ є одним з механізмів некрозу.

Проведенні дослідження та аналіз отриманих результатів підтверджують участь лізосомальних ферментів у розвитку відповідної реакції організму на дію IPNV, укладається в логіку того, що ступінь впливу на організм вірусів залежить від ефективності захисних і відновлювальних клітинних механізмів, до яких можна віднести систему внутрішньоклітинного протеолізу.

### Висновки

Розпад білків, викликаний вірусною інфекцією, обумовлений посиленням автолітичних процесів, до яких залучені лізосомальні протеїнази, однією з яких є катепсин В. Пошкодження цілісності лізосомальної мембрани під впливом IPNV призводить до вивільнення та зміни у функціонуванні тіолзалежних протеїназ.

**Перспективи подальших досліджень.** Необхідно деталізувати механізми дії вірусу інфекційного панкреатичного некрозу на біохімічні процеси, що призводять до загибелі клітин.

1. Berti P. J., Storer A. C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.*, 1995, Vol. 246, P. 273–283.

2. Fehrenbacher N., Jäättelä M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, P. 2993–2995.

3. Brunk U. T., Neuzil J., Eaton J. W. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Report*, 2001, Vol. 6, P. 91–97.

4. Nishimura Y., Kawabata T., Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Biochem. Biophys.*, 1988, Vol. 261, P. 64–71.

5. Isahara K., Ohsawa Y., Kanamori S. et al. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*, 1999, Vol. 91, P. 233–249.

6. Zhao M. and Salvesen G. S. Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a noncanonical specificity. *Biochem. J.*, 1997, Vol. 324, P. 361–364.

7. Moore M. N. Molecular and cellular pathology: summary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1992, 91, P. 117–119.

8. Turk B., Turk D., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys.*, 2000, Acta 1477, P. 98–111.

9. Livingstone D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 2001, 42, № 8, P. 656–666.

10. Schaternikov V. A. Unificirovannye klinicheskie laboratornie metodi issledovaniya [Standardized clinical laboratory methods]. *Lab. Delo — Laboratory work*, 1976, № 12, pp.748–752 (in Ukrainian).

11. Roberg K., Kagedal K., Olinger K. Mikroinjection of cathepsin D induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am. J. Pathol.*, 2002, Vol. 161, P. 89–96.

12. Salvesen G. S. A lysosomal protease enters the death scene. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, P. 3149–3157.

13. Stoka V., Turk B., Schendel S. et al. Lysosomal Protease Pathways to Apoptosis Cleavage of Bid, not Pro-Caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, P. 3149–3157.

14. Bröker L. E., Huisman C., Span S. W. et al. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non small lung cancer cells. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, P. 27–30.

15. Forghsgaard L., Wissing D., Mauch D. et al. Cathepsin B act as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *Cell Biol.*, 2001, Vol. 153, № 5, P. 999–1010.

16. Ostefeld M. S., Fehrenbacher N., Hoyer-Hansen M. et al. Effective tumor cell death by  $\sigma$ -2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, P. 8975–8983.

17. Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D. *J. Cell. Biol.*, 2001, Vol. 153, N 5, P. 999–1010.

18. Boya P., Andreau K., Poncet D., et al. Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, P. 1323–1334.

19. Guicciardi M. E., Leist M., Gores G. J. Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 2004, Vol. 23, P. 2881–2890.

20. Kagedal K., Zhao M., Svensson I., Brunk U. T. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *J. Biochem.*, 2001, Vol. 359, P. 335–343.

21. Wang W-L., Hong J. R., Lin G-H., Lin W., Wu J. L. Stage-specific expression of TNF regulates Bad/Bid-mediated apoptosis and secondary necrosis in birnavirus-infected fish cells. *Plos one*, 2011, Vol. 6, Issue 2, e 16740.