

## ВПЛИВ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ НА АКТИВНІСТЬ АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН РИБ

Л. П. Драган

Інститут рибного господарства НААН

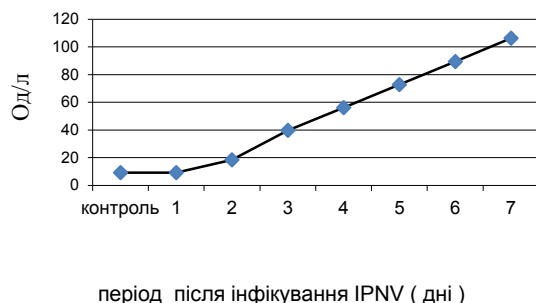
*Визначення активності аспартаатамінонтрансферази в культурі клітин риб виявило значне підвищення активності цього ферменту під впливом IPNV порівняно з контролем (не інфіковані клітини). За результатами проведених досліджень, найбільш інформативним є тест на визначення активності аспартаатамінонтрансферази. Зважаючи на простоту виконання аналізу визначення активності ферменту може стати ефективним експрес-методом виявлення IPNV в рибних господарствах.*

Вірусні інфекції гідробіонтів, що виникають у процесі інтенсивного розвитку аквакультури, завдають великої шкоди цій галузі. Значного збитку виробництву риби завдає вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV). Природним господарем вірусу IPNV є лососеві риби. Механізм передачі вірусної інфекції вертикальний і горизонтальний, переносники вірусу (вектори) не встановлені. Вірус поширений по всьому світу, він може викликати епізоотії, результатом яких є величезні втрати в інкубаторах мальків лососевих риб. IPNV викликає некротичні ураження підшлункової залози, а також накопичується в інших органах, таких як печінка, нирки, гонади, кишечник і мозок за відсутності некрозу. Дорослі риби, інфіковані IPNV, стають довічними носіями вірусу без явних виражених ознак захворювання [1].

Біологічні властивості IPNV, особливо його вплив на ферментативні процеси в інфікованих клітинах риб, вивчені недостатньо. Тому метою даної роботи було вивчення впливу цього вірусу на активність аспартаатамінонтрансферази (AcAT) в клітинах риб, як найбільш чутливого ферменту при багатьох патологічних станах організму. Відомо також, що активність цього ферменту служить одним з показників ураження печінки, як у людей, так і у тварин [2].

**Матеріали і методи.** При роботі *in vitro* з вірусом інфекційного панкреатичного некрозу використовували культури клітин RTG2 (trout rainbow gonad tissue) — культура, отримана з тканин гонад райдужної форелі, культивується при температурі 4-24 °С. Ця культура клітин риб є високочутливою до інфікування IPNV. Клітини культивували на середовищі MEM з 10 % інактивованою ембріональною телячою сироваткою (ETC) з додаванням антибіотика гентаміцину (80 мкг/см<sup>3</sup>). Клітини вирощували у вигляді моношарових культур в пластикових флаконах за температури 22 °С з інтервалом субкультивування 6-7 днів. Перед внесенням вірусу зливали середовище, а моношар клітин промивали розчином Хенкса для видалення залишків сироватки. Інкубацію з вірусом проводили протягом двох годин при кімнатній температурі. Потім вірус зливали, а клітини двічі промивали розчином Хенкса і додавали середовище, що містить 2% ETC. Проводили щоденну перевірку стану вмісту дослідних і контрольних флаконів з метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) IPNV на клітини. Стан культури клітин вивчали під мікроскопом за морфологічними ознаками [3]. Вірус IPNV був ізольований від райдужної форелі *Oncorhynchus mykiss* з річки Сірет, Чернівецької області [4]. Активність AcAT визначали загальноприйнятим колориметричним методом [5].

**Результати й обговорення.** Визначення активності АсАТ в клітинах риб виявило значне підвищення активності цього ферменту під впливом IPNV порівняно з контролем (не інфіковані клітини). Так, вже на другу добу після інфікування клітин вірусом IPNV спостерігалось підвищення активності АсАТ з 9,24 Од/л до 18,48 Од/л (рис).



*Рис.* Активність аспаратамінотрансферази в клітинах форелі, інфікованих вірусом панкреатичного некрозу

На сьомий день після інфікування активність АсАТ досягала 106,31 Од/л, тобто більш ніж в одинадцять раз порівняно з контролем. Активність цього ферменту в неінфікованих клітинах практично не змінювалась протягом всього періоду експериментального дослідження.

Аналогічний ефект був отриманий іншими дослідниками [2]. Такі зміни активності аспаратамінотрансферази можуть бути пояснені тим, що 15% ферменту знаходиться у цитоплазмі гепатоцитів (цитоплазматична форма) і 85% припадає на мітохондріальну (мітохондріальна форма), тобто підвищення активності АсАТ було обумовлено мітохондріальною формою. Так як мітохондрії є основними органелами, в яких відбувається метаболічне перетворення енергетичних субстратів (глюкози, жирних кислот, амінокислот) для утворення макроергічних сполук — АТФ, то збільшення активності ферменту АсАТ вказує на превалюючі процеси переамінування, тобто переважними субстратами стають амінокислоти. Тому зростання активності АсАТ свідчить про дисфункцію на рівні мітохондрій клітин.

Відомо, що АсАТ є представником класу трансаміназ і каталізує перенесення амінної групи з молекули глутамінової кислоти. Цей фермент зазнає значних змін при різних ураженнях печінки, в тому числі і при вірусних. Наприклад, при вірусних гепатитах активність АсАТ збільшується до 30 раз [2]. У медицині визначення її активності кваліфікується як «печінковий тест». Печінка риб, як центральний орган метаболізму, характеризується високою інтенсивністю процесів обміну. Вона раніше інших органів реагує на дію зовнішніх і внутрішніх несприятливих факторів, що відбивається на її функціональному стані. Поряд з активними реакціями біосинтезу і катаболізму, необхідно також відзначити те, що в печінці постійно протікають активні процеси знешкодження і біоаккумуляції широкого ряду ксенобіотиків, в тому числі і вірусів [6].

## ВИСНОВКИ

Для оцінки фізіолого-біохімічного статусу риб та середовища їх знаходження в якості індикаторів може бути використаний тест на активність амінотрансфераз. У цьому відношенні, за результатами проведених нами досліджень, найбільш інформативною є аспаратамінотрансфераза. Зважаючи на простоту виконання аналізу визначення її активності може стати ефективним експрес-методом виявлення вірусу інфекційного панкреатичного некрозу в рибних господарствах.

**Перспективи подальших досліджень.** Вплив вірусу інфекційного панкреатичного некрозу на активність інших ферментів в культурі клітин риб.

## **INFLUENCE OF INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS ON AST ACTIVITY IN THE FISH TISSUE CULTURES**

*L. P. Dragan*

Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

### **S U M M A R Y**

Determination of activity AST in the tissue cultures of fishes educated by the considerable increase of activity of this enzyme under influence of IPNV as compared to control (not infected cells). On the results of ours experiments most informing test is AST. In the trout farms because of simplicity of implementation, determination of it activity can become the effective express-method of IPNV detections.

## **ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА НА АКТИВНОСТЬ АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РЫБ**

*Л. П. Драган*

Институт рыбного хозяйства НААН

### **А Н Н О Т А Ц И Я**

Определение активности аспартатаминотрансферазы в культуре клеток рыб выявило значительное повышение активности этого фермента под влиянием IPNV по сравнению с контролем (не инфицированные клетки). По результатам проведенных исследований, наиболее информативным является тест на определение активности аспартатаминотрансферазы. Учитывая простоту выполнения анализа определения активности фермента может стать эффективным экспресс-методом выявления IPNV в рыбных хозяйствах.

### **Л І Т Е Р А Т У Р А**

1. *Rodriguez Saint-Jean S., J. J. Borrego, S. I. Perez-Prieto.* Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods // *Adv. Virus Res.* — 2003. — P. 113–165.
2. *Shulman G. E., Love R. M.* The Biochemical Ecology of marine Fishes.-*Advances in Marine Biology*. 1999. — San Diego. Acan. Press,— p. 36–351.
3. *Reed L.* A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. Reed, H., Muench // *The American journal of clinical hypnosis.* — 1938. — V. 27. — P. 493–497.
4. *Rud Yu., Buchatski L. P.* Detection of IPNV in the western Ukraine. AQUA, Prague, Czech Republic, September 1–5, 2012. Abstract book. — P. 166.
5. *Анализы. Полный справочник / под ред. М. Б. Герасиной.* — М. : Изд-во Эксмо, 2006. — 768 с.
6. *Livingstone D.R.* Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms // *Mar. Pollut. Bull.* — 2001. — 42, № 8. — P. 656–666.