

УДК 639.09:615.2

Г.М. Ткаченко<sup>1</sup>, Й. Грудневская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии и охраны окружающей среды, Поморская Академия в Слупске, ул. Арцишевского 22b, 76-200, Слупск, Польша

<sup>2</sup>Институт пресноводного рыбного хозяйства им. Станислава Саковича, Рутки, 83-330, Жуково, Польша

### МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КУМЖИ (*SALMO TRUTTA M. FARIO*), ИММУНИЗИРОВАННОЙ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ АЭРОМОНОЗА

Целью данного исследования была оценка активности метаболических ферментов (аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы) и метаболитов (молочная и пировиноградная кислоты) в мышечной ткани кумжи (*Salmo trutta m. fario*), вакцинированной иммерсионной вакциной против аэромоноза, состоящей из инактивированных штаммов *Aeromonas salmonicida* и *A. hydrophila*. Иммунизация рыб в наших исследованиях стимулирует активность аминотрансфераз и лактатдегидрогеназы, что свидетельствует об изменениях в процессах катаболизма белков. Под влиянием вакцинации также интенсифицируются функции энергообеспечения с преобладанием аэробного метаболизма. На основе сопоставления содержания лактата и пирувата в мышечной ткани вакцинированной группы рыб высказано предположение о мобилизации тканевого дыхания, сопряженного с окислительным фосфорилированием. Использование ряда изученных маркеров окислительного стресса и метаболических реакций остается перспективным для оценки состояния организма рыб при различных методах иммунизации.

**Ключевые слова:** кумжа (*Salmo trutta m. fario*), *Aeromonas spp.*, вакцинация, окислительный стресс, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа, лактат, пируват, метаболизм.

H.M. Tkachenko<sup>1</sup>, J. Grudniewska<sup>2</sup>

### METABOLIC ALTERATIONS IN THE MUSCLE TISSUE OF BROWN TROUT (*SALMO TRUTTA M. FARIO*) IMMUNIZED WITH A VACCINE AGAINST *AEROMONAS SPP*

The purpose of this study was to assess the activity of enzymes (transaminases, lactate dehydrogenase) and metabolites (lactic and pyruvic acids) in the muscle tissue of brown trout (*Salmo trutta m. fario*) vaccinated against furunculosis caused by *Aeromonas spp.* Immunization of fish stimulated the activity of aminotransferases and lactate dehydrogenase. Estimation of the intensity of metabolism suggests that it is associated with an alterations in the processes of the protein catabolism in the muscle tissue. The intensification of energy support reactions with a predominance of aerobic metabolism in vaccinated fish was noted. It was suggested the mobilization of tissue respiration coupled with the oxidative phosphorylation in the muscle tissue of vaccinated fish. Perspective is the use of the markers of oxidative stress and metabolic reactions to assess the health condition under different methods of fish immunization.

**Key words:** brown trout (*Salmo trutta m. fario*), *Aeromonas spp.*, vaccination, oxidative stress, aminotransferase, lactate dehydrogenase, lactate, pyruvate, metabolism.

#### Введение

Аэромоноз (син. бактериальная геморрагическая септицемия, аэромоноз, краснуха, краснухоподобное заболевание) – заболевание, вызываемое этиологическим агентом – подвижными аэромонадами – представителями семейства *Enterobacteriaceae*, которые являются условно-патогенными для рыб и находятся с ними в постоянном контакте [6]. Представители родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* входят в состав нормальной микрофлоры

воды. Бактерии рода *Aeromonas* – нормальные обитатели кишечника рыб, *Pseudomonas* – в значительном количестве вносятся в прудовую экосистему с обсеменёнными гранулированными комбикормами [1].

Аэромоноз является частью общемировой экологической проблемы, опосредованно связанной с деятельностью человека, всевозрастающим использованием в пище пресноводных рыб и других гидробионтов, контаминированных этим возбудителем. У поражённой рыбы резко снижаются вкусовые качества, товарный вид, питательная ценность, что приводит к ее порче, и тем самым наносится большой экономический ущерб. Нередко поражённая рыба и рыбопродукты, содержащие возбудитель аэромоноза, является источником серьёзных заболеваний человека и животных [3].

Неблагоприятный гидрохимический режим, использование химических дезинфектантов, богатые условно-патогенными микроорганизмами комбикорма, большое количество ручных манипуляций (хендлинг) и т.д. способствуют реализации патогенного потенциала данных микроорганизмов за счет снижения антибактериальной резистентности в переуплотнённых популяциях рыб, которые часто находятся в неблагоприятных условиях окружающей среды, возникающих из-за изменчивости существующих биотехнологий культивирования рыб [1].

В мировой практике накоплен значительный опыт по повышению антибактериальной резистентности рыб, сохранению поголовья и поддержанию высоких темпов роста при помощи иммунопрофилактики, которая в данной ситуации остается эффективным методом борьбы с болезнями рыб бактериальной этиологии [8]. Данные литературы в большинстве случаев характеризуют реакцию иммунной системы на введение той или иной вакцины и уровень вызываемой ею защиты [1]. Иммуногенные антигены подвижных аэромонад приводят к формированию иммунной памяти, стимулируя определённое число лимфоцитов, имеющих специфические рецепторы к данному антигену и пролиферации клона лимфоцитов с дифференциацией дочерних клеток, чьи функции меняются в зависимости от принадлежности к определённой популяции [8]. У рыб скопления лимфоцитов находятся в тимусе, головной и туловищной почках, селезёнке и стенке кишечника.

Не менее важным, на наш взгляд, является изучение биохимических реакций рыб при вакцинации на фоне стрессовых факторов, связанных с искусственным выращиванием рыбы. Поэтому целью данного исследования была оценка активности метаболических ферментов (аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы) и метаболитов (молочная и пировиноградная кислоты) в мышечной ткани кумжи (*Salmo trutta m. fario*), вакцинированной иммерсионной вакциной против аэромоноза.

### **Объекты и методы исследований**

Эксперимент проводили в Отделе исследований лососевых рыб Института пресноводного рыбного хозяйства (Жуково, Польша). Все биохимические анализы осуществляли на кафедре зоологии и физиологии животных Института биологии и охраны окружающей среды Поморского университета в Слупске (Польша). Кумжа была разделена на две группы (контрольную и вакцинированную). Рыбу иммунизировали вакциной против аэромоноза, состоящей из инактивированных штаммов *Aeromonas salmonicida* и *A. hydrophila* в концентрации  $1 \times 10^{10}$  колониеобразующих единиц (КОЕ). Иммерсионный раствор содержал 1 л вакцины на 10 л воды. Погружение рыбы в этот раствор длилось от 60 до 120 с. Через месяц после иммунизации рыбу отбирали из бассейнов для дальнейших исследований. Мышечная ткань была выделена после декапитации рыб. Буфер изоляции ткани содержал 100 мМ Трис-НСl (рН 7,2). Гомогенаты центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Белок в пробах определяли методом Брэдфорд (1976) [7]. Метаболические изменения оценивали по активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) [12], лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [13] и содержанию молочной и пировиноградной кислот [9].

Полученные результаты анализировали с помощью пакета программы STATISTICA 8.0 (StatSoft, Poland).

### Результаты и их обсуждение

Одним из критериев оценки биохимического статуса животных является определение активности аминотрансфераз, в частности, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, несущих информацию о состоянии белкового обмена у животных и функционального состояния печени [5]. Аминотрансферазы, занимающие важное место среди биокатализаторов, играют ключевую роль в обмене веществ, объединяя в единое целое белковый, углеводный, жировой обмен и цикл трикарбоновых кислот. Учитывая исключительную роль аминотрансфераз в обмене основных метаболитов клетки, активность этих ферментов используют в качестве биохимического индикатора физиологического статуса и клинического индикатора стрессового состояния, вызванного заболеванием, терапией или интоксикацией у ряда организмов, в том числе и у рыб [5]. В наших исследованиях вакцинация против аэромоноза сопровождается активацией аминотрансфераз (АлАТ – в 6 раз, АсАТ – в 13,3 раза,  $p=0,000$ ) и лактатдегидрогеназы (в 6,9 раз,  $p=0,000$ ) (рис. 1), что, несомненно, связано с увеличением процессов катаболизма белков мышечной ткани [2].

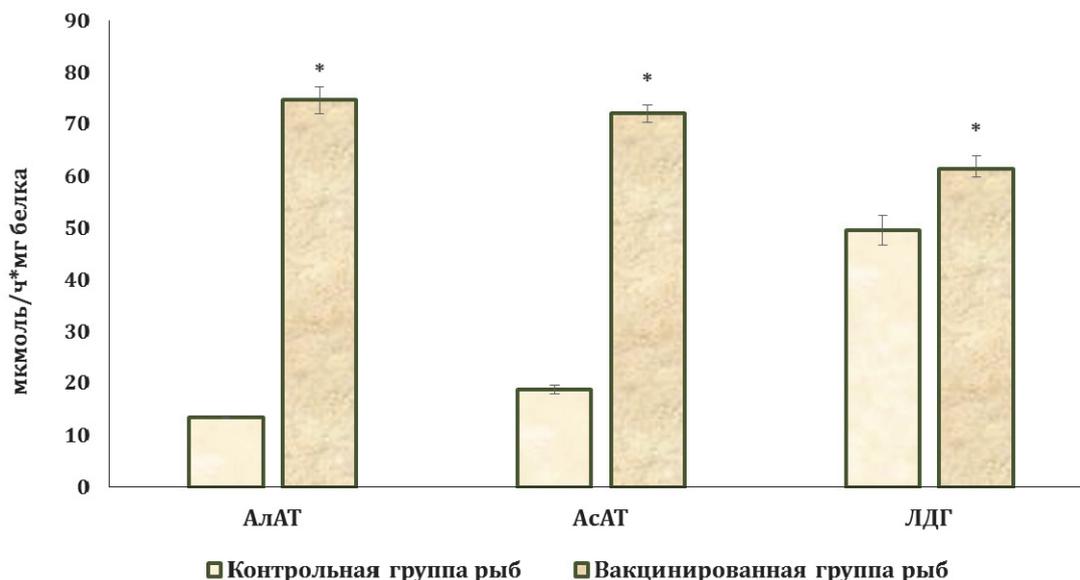


Рис. 1. Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в мышечной ткани кумжи, иммунизированной иммерсионной вакциной против аэромоноза:

\* – изменения статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) между показателями, полученными в контрольной и вакцинированной группах рыб

Fig. 1. The activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) in the muscle tissue of trout immunized by immersion vaccine against aeromonosis:

\* – changes are statistically significant ( $p < 0,05$ ) between the mean obtained in control and vaccinated groups

Как показали данные литературы, патология печени сопровождается постепенным уменьшением активности АсАТ в соответствии со степенью деструкции и жирового перерождения ее клеток [5]. Так, в мозаичной печени активность АсАТ уменьшается на 18 %, в анемичной – на 22, а в анемично-рыхлой – на 75 %, что соответствует степени разрушения клеточных мембран и миграции фермента в сыворотку крови [4]. В мозаичной и анемич-

ной печени активность АлАТ, так же, как и АсАТ, сохраняет тенденцию к уменьшению, в то время как в анемично-рыхлой печени происходит резкое увеличение активности этого фермента (на 34 % по сравнению с нормой). Резкое изменение активности АлАТ и АсАТ в анемично-рыхлой печени, по сравнению с нормальной, связано с изменением молекулярных форм этих ферментов [5].

Взаимопревращение пирувата в лактат и обратно совершается в организме непрерывно. Интенсивность данной реакции зависит от каталитической активности ферментативных систем, обеспечивающих разнообразные превращения пирувата. Одним из таких ферментов является лактатдегидрогеназа (ЛДГ, 1.1.1.27) – гликолитический фермент, обратимо катализирующий окисление лактата в пируват [10]. Снижение уровня молочной и увеличение уровня пировиноградной кислоты сопровождается повышением каталитической активности лактатдегидрогеназы, которая и катализирует взаимодействие лактата и пирувата со сдвигом данной реакции вправо, в сторону образования пировиноградной кислоты [11].

В наших исследованиях на уровень показателей, характеризующих состояние углеводного обмена в организме рыб, существенное влияние оказывает иммерсионная вакцинация против аэромоноза (рис. 2). Вакцинация активно влияет на обменные процессы в мышечной ткани кумжи. Если учесть, что в опытной группе рыб также возрастает активность аминотрансфераз, которые увеличивают пул аминокислот и/или пирувата, то можно говорить о мобилизации энергетических ресурсов для интенсификации метаболизма, особенно аэробного звена, в мышечной ткани вакцинированных рыб.

Содержание молочной и пировиноградной кислот в мышечной ткани кумжи, иммунизированной иммерсионной вакциной против аэромоноза, представлено на рис. 2.

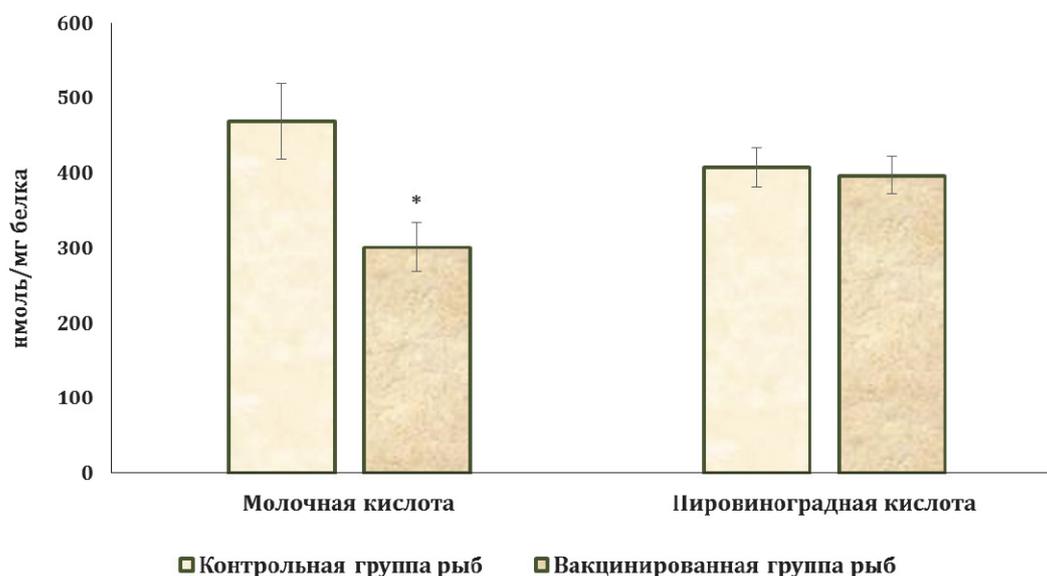


Рис. 2. Содержание молочной и пировиноградной кислот в мышечной ткани кумжи, иммунизированной иммерсионной вакциной против аэромоноза:

\* – изменения статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) между показателями, полученными в контрольной и вакцинированной группах рыб

Fig. 2. Content of lactic and pyruvic acids in the muscle tissue of trout immunized by immersion vaccine against aeromonosis:

\* – changes are statistically significant ( $p < 0,05$ ) between the mean obtained in control and vaccinated groups

На фоне вакцинации против аэромоноза в мышечной ткани рыб изменяются условия протекания энергообеспечения мышечной ткани со сдвигом аэробного звена энергообес-

печени. Реакции тканевого дыхания сопряжены с окислительным фосфорилированием на уровне дыхательной цепи, что позволяет улавливать значительную долю свободной потенциальной энергии окисления углеводов и аккумулировать её в форме высокоэнергетических фосфатов. Вместе с фосфорилированием на субстратном уровне также в виде высокоэнергетических фосфатов улавливается свободная энергия сгорания глюкозы на путях гликолиза. В наших исследованиях активация процессов аэробного метаболизма в мышечной ткани при вакцинации рыб сопровождается снижением значения коэффициента лактат/пируват от 1,15 (контрольная группа рыб) до 0,76 (вакцинированная группа рыб). Как показали полученные нами данные, именно высокий уровень аэробного метаболизма является вероятной причиной генерации активных форм кислорода (АФК) в результате окислительного фосфорилирования и увеличения содержания маркеров перекисного окисления липидов и окислительно модифицированных белков.

Наши предыдущие исследования также показывают изменения в маркерах антиоксидантной защиты (снижение активности глутатионзависимых ферментов и каталазы) у вакцинированной форели. Корреляции между кетоновыми производными окислительно модифицированных белков, активности каталазы и глутатионпероксидазы подтверждают предположение, что карбонильные производные окислительно модифицированных белков могут ингибировать ферментную антиоксидантную защиту [15]. Наше исследование также подтвердило изменения в антиоксидантной защите и реакциях окислительного стресса с более высокой степенью тяжести в печени по сравнению с другими тканями. Наши данные также свидетельствуют о том, что вакцинация против фурункулеза индуцировала перекисное окисление липидов в жаберной и печеночной тканях форели. Однако мышечная и мозговая ткани способны восстанавливать свой про-и антиоксидантный баланс после вакцинации [17].

Мозговая ткань вакцинированной форели имела более низкий уровень альдегидных и кетоновых производных окислительно модифицированных белков, а также перекисного окисления липидов [16]. Глутатион-зависимые ферменты и активность каталазы оставались очень чувствительными ферментами к окислительному стрессу, вызванному иммунизацией у вакцинированной форели. Корреляция между про- и антиокислительными маркерами подтвердили предположение, что окислительный стресс может активировать антиоксидантную защиту для улучшения адаптивных механизмов во время иммунизации у рыб [14, 16].

### **Выводы**

Полученные данные по состоянию мышечной ткани в результате иммунизации свидетельствуют об активации белкового обмена на фоне снижения содержания молочной кислоты в результате вакцинации. По факту снижения содержания лактата в мышечной ткани можно предполагать ингибирование анаэробного метаболизма. В пользу этого свидетельствует наблюдаемая тенденция к увеличению активности трансаминаз.

Таким образом, имеются основания предположить об активации аэробного метаболизма в мышечной ткани вакцинированных рыб. Оценка показателей интенсивности метаболизма свидетельствует также о том, что они связаны с изменением процессов катаболизма белков. Таким образом, использование ряда изученных маркеров метаболических реакций остается перспективным для оценки состояния организма рыб при различных методах иммунизации.

*This study was supported by grant of the Pomeranian University for Young Scientists.*

## Список литературы

1. Гаврилин К.В. Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа (*Cyprinus carpio* L.): автореф. дис. ... канд. биол. наук, 03.00.10, 03.00.07 – Микробиология. М., 2004.
2. Евгеньева Т.П. Морфология мышечной ткани русского осетра р. Волги // Осетровое хозяйство: сб. тр. Астрахань, 1989. С. 89–90.
3. Неретин М.В. Ветеринарно-санитарная экспертиза карповых рыб при аэромонозе: дис. ... канд. вет. наук, 16.00.06 – Ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза. М., 2007. 144 с.
4. Савкин Н.А. Диагностическое значение определения активности некоторых сывороточных ферментов при заболевании печени у животных: дис. ... канд. биол. наук. Л., 1971. 270 с.
5. Самсонова М.В. Аланин- и аспартатаминотрансферазы как индикаторы физиологического состояния рыб: дис. ... канд. биол. наук, 03.00.04 – Биохимия. М., 2002.
6. Austin B.I., Austin D.A. Bacterial fish pathogens // Second ed., New York: Ellis Horwood, 1993. 384 p.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. 72. P. 248–254.
8. Ellis A.E. Fish vaccination. New York, Academic press. 1988. 255 p.
9. Herasimov I., Plaksina O. Non-enzymatic determination of lactate and pyruvate concentrations in blood sample // Laboratorna Diagnostyka. 2000. N 2. P. 46–48 (in Ukrainian).
10. Lott J.A., Nemensanzky E. Lactate dehydrogenase // In: Lott J.A., Wolf P.L., eds. Clinical Enzymology, a Case oriented Approach, 1987. P. 213–244.
11. Moss D.W., Henderson A.R. Enzymes // In: Burtis C.A., Ashwood E.R., eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, Saunders Co., 1986. P. 735–896.
12. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for determination of serum oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases // Am. J. Clin. Pathology. 1957. 28. P. 56–63.
13. Sevela M., Tovarek J. A method for estimation of lactic dehydrogenase in body liquids // J. Czech Physiol. 1959. 98. P. 844–848.
14. Tkachenko G.M., Grudniewska J. Oxidative stress biomarkers in gills of brown trout (*Salmo trutta m. fario*) vaccinated against furunculosis // Scientific Medical Bulletin. 2015. 2(2). P. 83–89.
15. Tkachenko G.M., Grudniewska J., Kurhaluk N.N. Effects of vaccination against furunculosis on oxidative stress biomarkers and antioxidant defense in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Scientific Journal «Kaliningrad State Technical University News» (Научный журнал «Известия КГТУ»). 2015. 36. P. 11–22.
16. Tkachenko H., Grudniewska J. The alterations in the oxidative stress biomarkers in the brain tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against furunculosis // Trudy VNIRO (Труды ВНИРО). 2016. 162. P. 161–171.
17. Tkachenko H., Kurhaluk N., Grudniewska J., Andriichuk A. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis // Fish Physiol. Biochem. 40(4). P. 1289–1300.

**Сведения об авторах:** Ткаченко Галина Михайловна, кандидат биологических наук, доцент, докторант, e-mail: tkachenko@apsl.edu.pl, biology.apsl@gmail.com;

Грудневска Йоанна, кандидат биологических наук, докторант, e-mail: jgrudniewska@infish.com.pl.