

MARIA PRZYBYLSKA-WOJTYSZYN, MAŁGORZATA ŁOZIŃSKA-GABSKA

Zmiany aktywności aminotransferaz asparaginianowej i alaninowej w narządach wewnętrznych karpia w przebiegu erythrodermatitis

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologicznego Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Cybulskiego 30, 50-205 Wrocław

Summary

Changes in the activity of aspartate (AsAT) and alanine (AlAT) aminotransferases in internal organs of carp (*Cyprinus carpio* L.) in the course of erythrodermatitis

The activity of aspartate (AsAT) and alanine (AlAT) aminotransferases was examined in liver, head kidney, excretory kidney and spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.) with erythrodermatitis. In all the organs studied except liver a general decrease in the activity of both aminotransferases was found as compared with their activity in tissues of healthy fish. This may reflect a disfunction of those organs as a result of a long-lasting effect of the pathogenic factor.

Posocznica zarpi (infection dropsy of carp), jak się okazało w toku wieloletnich badań i dyskusji, jest chorobą o ostrym i chronicznym przebiegu, o różnej etiologii. Ostłą, wysiękową jej postać zwaną wiosenną wiramią (spring viremia of carp — SVC) wywołuje wirus *Rhabdovirus carpio* przenoszony przez kontakt ryb chorych ze zdrowymi (1, 2, 3, 7, 9, 12, 27, 28) i przez zarażoną wodę. Postać zaś przewlekłą o etiologii dotychczas dyskutowanej* nazwano *erythrodermatitis* — CE (7, 13, 27). Choroba ta występuje we wszystkich krajach, gdzie prowadzona jest hodowla karpia (głównie K₁ i K₂). Ponadto chorują na nią karasie, leszcze, szczupaki (17, 33). Występuje w różnych okresach roku, przy czym najszybciej przebiega jesienią przy stosunkowo małej śmiertelności. W pozostałych porach roku przebieg jest wolniejszy, lecz duża śmiertelność (6, 7, 27, 28, 31). Na jej przebieg mają wpływ czynniki środowiskowe, kondycja ryb, towarzysząca flora bakteryjna, w której główną rolę odgrywa gatunek *Aeromonas*.

Objawy *erythrodermatitis* dotyczą głównie skóry, gdzie w początkowym stadium występują wybroczyny, przekrwienia, mniej lub bardziej rozległe owrzodzenia. Niekiedy w cięższych przypadkach CE towarzyszą obrzęki, wysadzenie gałek ocznych, rozcięcie powłok brzusznych, postrzępienie płetw (6, 7, 26, 30, 31). W końcowych stadiach choroby zmiany uogólniają się i oprócz skóry występują w innych narządach, a czynnik etiologiczny pojawia się w nerkach i krwi.

Pomimo wieloletnich badań i dyskusji na temat posocznicy karpia w piśmiennictwie ichtiopatologicznym zupełnie brak informacji o zachowaniu się enzymów w tkankach i surowicy ryb chorych na ostrą i przewlekłą jej postać.

* W 1975 r. Bootsma i Blonmaert (7) wyizolowali z owrzodzonych osobników bakterie, którą zaliczyli do *Aeromonas salmonicida* i uczynili odpowiedzialną za *erythrodermatitis*. Schäperclaus (31) zaś uważa, że czynnikiem wywołującym chroniczną postać posocznicy jest *Aeromonas punctata*. Według zaś najnowszych (1982 r.) badań specyficznym czynnikiem CE jest niewielka, nie posiadająca jeszcze nazwy gramujemna bakteria występująca między naskórkiem a skórą właściwą wrażliwa na działanie chloramfenikolu (6). Zdaniem autorów ta nowa bakteria ma działanie inicjujące, a działanie *Aeromonas* jest wtórne. W uzupełnieniu należy dodać, że już w 1970 r. Jara i Szerow (16) badali skuteczność jednorazowych dootrzewnowych iniekcji chloromycetyny w zwalczaniu posocznicy karpia.

Celowe więc było podjęcie badań nad określeniem aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AsAT) i alaninowej (AlAT), enzymów tak ważnych dla przemiany materii, głównie białek i aminokwasów, których zmienny skład, szczególnie w surowicy, jest wczesnym wskaźnikiem zaburzeń ustrojowych, zaś aktywność wyżej wspomnianych enzymów w narządach wewnętrznych pomaga określić stopień intensywności choroby.

Materiał i metody

Kroczi karpia (K₂) użyte do badań przeprowadzonych jesienią (listopad) otrzymano z Pracowni Chorób Ryb Zakładu Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu ze stwierdzoną przewlekłą postacią posocznicy (*erythrodermatitis* — CE).

Karpie ważące od 150—300 g, o całkowitej długości ciała (lt) od 17—21 cm przetrzymywano w akwariach, w wodzie wodociągowej odstanej, napowietrzanej, o temp. 13°C—15°C bez dokarmiania. Uwzględniając rytmikę dobową badanych enzymów (20), badania wykonywano zawsze o tej samej porze dnia (9 rano). Po ośmieszeniu ryb, pobierano w wyniku sekcji (zawsze z tego samego miejsca) skrawki wątroby (wątrobotrzustki), nerki główowej, nerki tułowiowej (*mesonephros*) i śledziony, dokonując jednocześnie obserwacji zmian anatomopatologicznych. Skrawki pobranej tkanki perfundowano *in situ* natychmiast w oziębionym do 0°C 0,9% NaCl. Następnie wycinki tkanek osuszano na bibule filtracyjnej, ważono i homogenizowano dokładnie w szklanym homogenizerze typu Potter — Elvehjema w 3 ml 0,25 M roztworze sacharozy w temperaturze 0°C. Homogenaty wirowano w temp. 0°C przez 20 min. przy 5000 g. W uzyskanym nadsącu oznaczano aktywność obu aminotransferaz metodą Umbreita w modyfikacji Niewiarowskiego i Czupryny (26) oraz poziom białek metodą Lowry'ego i wsp. (23) przy zastosowaniu albuminy bydlęcej jako standardu. Jednocześnie badano aktywność AsAT i AlAT w odpowiednich narządach ryb kontrolnych (zdrowych). Aktywność enzymów wyrażano w µg powstającego kwasu pirogronowego, a poszczególne wartości przeliczano na mg oznaczanego jednocześnie białka (8). Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono w oparciu o test t — Studenta.

Wyniki i omówienie

We wszystkich badanych prócz wątroby tkankach chorych karpia, tj. w nerce główowej, nerce wydalinowej i śledzionie generalnie stwierdzono obniżenie aktywności aminotransferazy asparaginianowej, jak i aminotransferazy alaninowej w porównaniu z aktywnością osiąganą przez te enzymy w tkankach ryb zdrowych, a odnotowany spadek aktywności AlAT w nerce główowej i tułowiowej był statystycznie istotny (tab. 1). Ryby, jak wiadomo, pozbawione są węzłów chłonnych, ich rolę przejmują nerka główowa, która jest narządem limfocytotwórczym. W nerce główowej *Lepomis macrochirus*, troci, pstrąga tęczowego stwierdzono obecność komórek produkujących przeciwciała (1, 2), a jak wynika z prac De Kinkelich i Scherrer (cyt. 31) u karpia i pstrąga tęczowego, u których wywołano eksperymentalnie posocznice, stwierdzono syntezę swoistego interferonu (badania dotyczą głównie SVC).

Tab. 1. Zmiany aktywności aminotransferazy asparaginianowej i aminotransferazy alaninowej w narządach wewnętrznych karpia w przebiegu *erythrodermatitis* (wartości średnie)

Ryby badane	AspAT				AlAT			
	wątroba	nerka głowowa	nerka tułowiowa	śledzioną	wątroba	nerka głowowa	nerka tułowiowa	śledzioną
Karpie kontrolne	349,1	119,2	406,1	81,2	523,9	22,9	374,8	13,8
Karpie z <i>erythrodermatitis</i>	360,1	118,3	383,2	67,01	588,2	15,8*	205,3**	8,3

Objaśnienia: * istotność przy $p \leq 0,05$, ** istotność przy $p \leq 0,001$.

Jak już wspomniano we wstępie czynnik etiologiczny CE może pojawiać się w nerkach, krwi, a jak wynika z piśmiennictwa (2, 6) wirusy z grupy *Rhabdovirus* wykazują wyraźny cytotropizm do komórek układu krwiotwórczego ryb, a więc nerek i śledziony. Stwierdzone w niniejszej pracy obniżenie aktywności AsAT i AlAT w tych narządach zaangażowanych również w wydalanie i procesy obronne, byłoby wyrazem ich dysfunkcji wywołanej długotrwałym oddziaływaniem czynnika chorobotwórczego. W uzupełnieniu należy dodać, że badana jednocześnie w nerce głowowej, wydalinowej i śledzionie kwasna fosfataza wykazywała również spadek aktywności (22). Podobne zależności wykazano dla AsAT i AlAT w tych narządach u karpia zarażonych tasiecmami *Bothriocephalus gowkongensis* i *Khavia sinensis* (25).

Nerki, a szczególnie śledzioną ryb chorych na CE były powiększone i silnie przekrwione. Jak wynika z badań histopatologicznych w nerkach chorych na posocznice karpia (głównie na SVC) można zobaczyć duże, patologicznie zmienione obszary parenchymy, ropne zapalenia, zmiany nekrobiotyczne (3, 4, 13), rozbudowaną tkankę interstycjalną (13). W śledzionie zaś obserwuje się obrzękle elementy układu siateczkowo — śródbłonkowego ze skupiskami makrofagów (31). Stwierdza się znacznie ograniczoną erytropoezę (2b). Obniżeniu, podobnie jak AsAT i AlAT, ulega liczba erytrocytów i limfocytów, poziom hematokrytu (11), cukru i cholesterolu, natomiast podwyższeniu ulega poziom białka całkowitego i jego frakcji, szczególnie albumin i gammaglobulin (33, 34, 35).

Inny rozkład aktywności stwierdzono w badaniach własnych w wątrobie karpia chorych na CE, u których aktywność zarówno AsAT, jak i AlAT była wyższa w porównaniu z rybami zdrowymi (choć wzrost ten nie jest istotny statystycznie (tab. 1). Niewielki wzrost aktywności AsAT i AlAT w surowicy odnotował Shieh (32) u pstrąga w przypadku infekcji *Aeromonas salmonicida*, wielokrotnie zaś wzrastało stężenie w wątrobie aldolazy, kreatyn fosfokinazy, ornitynokarbonyl — transferazy. Ponadto wzrost aktywności obu enzymów występuje w surowicy węgorzy z ostrym zapaleniem wątroby (15). Wzrost AsAT i AlAT w surowicy, a zmniejszenie w tkankach powoduje zatrucie czterochlorkiem węgla (29), chromem (10), a także podanie ryb chronicznemu działaniu karbendazymu (17) i deltametryny (18). Przyjmuje się obecnie, że wzrost aktywności badanych aminotransferaz łączy się z chorobami przebiegającymi z uszkodzeniem i martwicą tkanek. Uważa się przy tym, że poziom aktywności AlAT jest wskaźnikiem bardziej swoistym dla uszkodzeń wątroby (14), a AsAT dla schorzeń serca i mięśni (19).

Jak wynika z danych piśmiennictwa (2, 11, 34) w przebiegu posocznicy karpia występuje znaczne zmniejszenie ilości glikogenu w wątrobie. Wydaje się, że ma

to związek ze stwierdzonym w badaniach własnych wzrostem (choć niedużym i nieistotnym statystycznie) aktywności aminotransferaz, a szczególnie AlAT zaangażowanej w proces glukogenezy jako źródła energii dostarczanej chorym rydom. Różnice w obrazie zmian aktywności aminotransferaz w wątrobie, nerce, śledzionie wydają się oczywiste zważywszy, że narządy te mają różne funkcje.

Jak się wydaje, przedstawione wyniki badań własnych wnoszą pewne nowe dane o zachowaniu się układów enzymatycznych u karpia chorych na przewlekłą postać posocznicy.

Piśmiennictwo

- Ahne W.: Arch. Virol. 48, 181, 1975.
- Ahne W.: Bull. Int. Epizoot. 87, 435, 1977.
- Ahne W.: Forsch. Vet-Med. 30, 180, 1980.
- Amlacher E.: Taschenbuch der Fischkrankheiten. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1986, 183—186.
- Antychowicz J.: Gosp. ryb. 8, 3, 1982.
- Antychowicz J., Rogulska A.: Medycyna Wet. 39, 15, 1983.
- Bootsma R., Fijan N., Blommaert L.: Vet. Arch. 47, 291, 1977.
- Enzyme Nomenclature, Recommendation of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes together with their Units and Symbols of Enzyme Kinetics. Brisbane, 1964.
- Fijan N., Matasin Z.: Vet. Arch. 50, 215, 1980.
- Fizurski A.: Wpływ chromu na zachowanie się białek i enzymów krwi ryb oraz jego akumulacja (dane niepublik.).
- Flondro T., Ropel E., Zolan Z.: Medycyna Wet. 40, 50, 1984.
- Havelka S.: FI, FIFAC 72/2C. II Symp. 28 Amsterdam 1972 Experience paper an infections dropsy of carp communication.
- Heuschmann-Brunner M.: Festschrift Bayer. Versuch., Biol. 41, 49, 1965.
- Ideo G., Franchis R., Bellobuono A., Tornaghi G.: Enzyme 12, 529, 1971.
- Inui Y.: Bull. Fresh. Fish. Res. Lab. Tokyo 19, 25, 1965.
- Jara Z., Szerow D.: Roczn. Nauk. rol. H 92, 21, 1970.
- Jara Z., Łakota S., Łozińska-Gabska M., Przybylska-Wojtyśzyn M., Wojtaszek J.: Wpływ karbendazymu na ryby. IV Zmiany aktywności aminotransferazy alaninowej (AlAT) i aminotransferazy asparaginianowej (AsAT) w wątrobie, nerce oraz surowicy karpia (*Cyprinus carpio* L.) (dane niepublik.).
- Jara Z., Łakota S., Łozińska-Gabska M., Przybylska-Wojtyśzyn M., Wojtaszek J.: Zmiany aktywności aminotransferazy alaninowej (AlAT) i aminotransferazy asparaginianowej (AsAT) w narządach wewnętrznych karpia (*Cyprinus carpio* L.) pod wpływem deltametryny w zatruciu ostrym i chronicznym (dane niepublik.).
- Jelínek I., Skřeha I., Stepan I., Petrašek I.: Sb. lek. 79, 71, 1977.
- Jungowska-Klín B., Łozińska M., Wojtaszek J.: Acta Physiol. Pol. 26, 95, 1975.
- Kocylowski B., Mięczyński T.: Choroby ryb i raków. PWRiL, Warszawa 1980.
- Kozubek Z., Poloczek-Adamowicz A.: Zmiany aktywności kwasnej fosfatazy u *Cyprinus carpio* zarażonych posocznice (dane niepublik.).
- Lowry O., Rosenbrough N., Farr A.: J. biol. Chem. 193, 265, 1951.
- Łakota S., Raszka A., Roszkowski J., Hlond S., Kozłowski T., Stefan J.: Medycyna Wet. 34, 30, 1978.
- Łozińska-Gabska M.: Wiadomości parazytol. 27, 6, 717, 1981.
- Niewiarowski S., Czupryna A.: Acta Bioch. Pol. 393, 1958.
- Prost M.: Choroby ryb PWRiL, Warszawa 1980.
- Prost M.: Medycyna Wet. 39, 520, 1983.
- Racicot L., Gaudet C., Leroy J.: Fish Biol. 7, 825, 1975.
- Robert R. I.: Fish pathology. Bailliere-Tindall, London, 1978.
- Schäperclaus W.: Fischkrankheiten. Akademie-Verlag, Berlin, 1979.
- Shieh H. S.: J. Fish. Biol. 12, 13, 1976.
- Stankiewicz E.: Gosp. ryb. 3, 19, 1985.
- Stefan J.: Roczn. Nauk. rol. 91, 403, 1969.
- Stefan J.: Gosp. ryb. 1, 15, 1970.
- Walsh A. H., Ribelin W. E.: The pathology of fishes. The University of Wisconsin Press, 515, 1972.

Adres autora: dr Maria Przybylska-Wojtyśzyn, ul. Kozanowska 89/14, 54-152 Wrocław