

УДК 577: [597.552.512: 639.3.043.2:577.121.7]

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ИСКУССТВЕННО ВЫРАЩИВАЕМОЙ
РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *Oncorhynchus mykiss* Walb.
ПРИ РАЗВИТИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СЕПТИЦЕМИИ:
ЭФФЕКТ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ**

**М. В. Чурова*, Л. А. Лысенко, Н. П. Канцерова, И. В. Суховская,
М. А. Родин, М. Ю. Крупнова, член-корреспондент РАН Н. Н. Немова**

Поступило 22.07.2019 г.

Исследовали влияние кормовой добавки, включающей антиоксидант дигидрохверцетин и полисахарид арабиногалактан, на активность некоторых ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах и печени искусственно выращиваемой радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walb. при развитии бактериальной инфекции. Результаты исследования указывают на повышение устойчивости форели к действию бактериальной инфекции при обогащении рациона исследуемыми биоактивными компонентами, в том числе, по-видимому, за счёт активации метаболических путей синтеза энергетических и восстановительных эквивалентов.

Ключевые слова: энергетический обмен, форель, бактериальная инфекция, дигидрохверцетин, арабиногалактан.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524892218-220>

В условиях садкового рыбоводства рыбы могут испытывать влияние разных факторов, таких как слабая проточность воды, высокая скученность, бактериальные инфекции, что влияет на их рост и развитие. Одним из решений, направленных на снижение эффекта этих факторов, может послужить обогащение кормов биологически активными добавками, способными повысить устойчивость рыб и увеличить прирост биомассы. К таким веществам относятся компоненты листовничного сырья: дигидрохверцетин (ДГК) — природный флавоноид с антиоксидантной активностью и полисахарид арабиногалактан (АГ), обладающий пребиотическим и иммуномодуляторным действием [1–3].

Для оценки влияния кормовой добавки ДГК и АГ на уровень энергетического обмена искусственно выращиваемой форели *Oncorhynchus mykiss* Walb. определяли активность ферментов цитохром с оксидазы (ЦО), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и альдолазы в органах особей, выращиваемых на стандартном и обогащённом добавкой рационе. По активности ключевых ферментов аэробного и анаэробного синтеза АТФ, путей окисления глюкозы можно судить

об энергетическом статусе и функциональной активности органов рыб: ЦО — показатель уровня аэробного обмена, ЛДГ — анаэробного гликолиза [4]; альдолаза характеризует степень использования углеводов в гликолизе [5]; Г6ФДГ — ключевой фермент пентозофосфатного пути (ПФП) [6].

Исследования проводили на форелевом хозяйстве (Республика Карелия) с июня по сентябрь 2017 г. Молодь форели (1+) выращивали в садках с плотностью посадки 2,1 кг/м³ на стандартном корме “BioMar” (Дания) — контроль; и с добавлением смеси 25 мг ДГК и 50 мг АГ на 1 кг корма — опыт, по рекомендации производителя “Аметист” (сертификат № 396-08.17, Россия). Через 1 мес. после начала эксперимента у рыб из обеих групп была выявлена бактериальная геморрагическая септицемия, возбудителем которой была ассоциация бактерий *Pseudomonas putida* и *Cytophaga psychrophila* (заключение микробиологической экспертизы № 939/22 от 23.08.2017 г., ФГБНУ ВИЭВ, Россия). Рыбы были подвергнуты стандартной антибактериальной терапии энрофлоксацином (25 мг/кг рыбы) в течение 6 сут (10–15 августа). Рыбу для анализа отбирали до начала кормления добавками 25 июня и далее каждые две недели. Образцы тканей хранили в жидком азоте до начала анализа. Средняя масса рыб в выборке составила 105,50 ± 6,81 г в начале экспе-

*Институт биологии Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск
E-mail: mchurova@yandex.ru*

римента (25.06) и $324,79 \pm 36,13$ г (контроль) и $363,59 \pm 19,40$ г (опыт) в конце.

Активность ЛДГ (1.1.1.27), ЦО (1.9.3.1), альдолазы (4.1.2.13) в белых мышцах и печени и Г6ФДГ (1.1.1.49) в печени определяли общепринятыми методами [7, 8] и выражали в мкмоль/мин/г белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению пептидной связи при длине волны 220 нм [9]. Статистический анализ проводили с использованием критериев Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

По результатам анализа активности ферментов в печени установлено, что в обеих группах инфицирование сопровождалось увеличением активностей ЦО, ЛДГ, альдолазы и Г6ФДГ по сравнению со значениями у здоровых особей в начале эксперимента и их снижением на фоне проведённой антибиотикотерапии (12.08.2017 г.; табл. 1). Такое повышение активности в период инфекции может быть обусловлено необходимостью в дополнительных энергетических и восстановительных эквивалентах для развития ответной реакции на заболевание, включая мобилизацию защитных систем клетки. При этом активность исследуемых ферментов была достоверно выше в пик развития заболевания (26.07) у экспериментальной группы рыб (табл. 1). Отмеченная более выраженная и быстро развивающаяся во времени активация данных ферментов у рыб, выращиваемых на обогащённом биодобавкой корме, свидетельствует о характерном для них более высоком уровне энергопродукции за счёт как аэробного, так и анаэробного синтеза АТФ и перераспределении

энергетических субстратов в сторону использования углеводов в обоих путях энергообмена.

Высокие значения активности Г6ФДГ в печени, вероятно, связаны с увеличением потребности в эквивалентах НАДФН, образующегося в ПФП, для восстановления глутатиона, участвующего в процессах детоксикации. Так, нашими коллегами отмечена высокая активность глутатион-S-трансферазы, фермента антиоксидантной системы, у особей из опытной группы [10]. Имеются данные о повышении активности Г6ФДГ и ЛДГ в печени карпа при бактериальной инфекции, вызванной *Aeromonas hydrophila* [6].

В мышцах различия между группами установлены только для ЦО (12.08; табл. 2). У особей, получавших обогащённый биодобавкой корм, активность ЦО была выше и не снижалась в период развития инфекции, что может указывать на отсутствие стрессового действия этого фактора на аэробный метаболизм скелетных мышц в опытной группе рыб.

В дополнение к нашим данным среди рыб, получавших добавку, отмечены более низкий процент летальности (1,7 против 4,0 в контроле к концу выростного сезона) и тенденция к более высоким темпам роста [11]. Таким образом, обогащённый биодобавкой (дигидрохверцетином и арабиногалактаном) рацион повышает у форели продукцию энергетических и восстановительных эквивалентов, необходимых для обеспечения ростовых процессов и индукции защитных клеточных систем, включая детоксикационную и антиоксидантную, что может расцениваться как физиологическая основа их повышенной устойчивости к действию инфекционного агента и развитию заболевания.

Таблица 1. Удельная активность ферментов ЦО, ЛДГ, Г6ФДГ, альдолазы (мкмоль/мин/г белка) в печени форели в зависимости от применения биодобавки в рационе ($M \pm m$)

Группы		ЦО	ЛДГ	Г6ФДГ	Альдолаза
25.06.2017 г.	Начало	$1,32 \pm 0,19$	$90,09 \pm 9,59$	$1,88 \pm 0,09$	$89,19 \pm 7,75$
14.07.2017 г.	Контроль	$3,12 \pm 0,16a$	$100,97 \pm 13,93$	$2,68 \pm 0,6a$	$156,38 \pm 3,51a$
	Опыт	$3,44 \pm 0,28a$	$173,12 \pm 13,12^*a$	$3,59 \pm 0,34a$	$269,45 \pm 10,29^*a$
26.07.2017 г.	Контроль	$4,48 \pm 0,82$	$128,84 \pm 13,85$	$2,95 \pm 0,17$	$132,03 \pm 7,86$
	Опыт	$7,88 \pm 0,50^*a$	$195,24 \pm 11,65^*$	$4,38 \pm 0,43^*a$	$200,62 \pm 10,01^*a$
12.08.2017 г.	Контроль	$6,28 \pm 0,55$	$155,44 \pm 7,51$	$4,18 \pm 0,37$	$183,22 \pm 9,25a$
	Опыт	$6,47 \pm 0,57$	$204,83 \pm 12,46^*$	$5,32 \pm 0,46$	$199,05 \pm 10,25$
28.08.2017 г.	Контроль	$5,40 \pm 0,39$	$130,57 \pm 12,40$	$2,82 \pm 0,26a$	$89,35 \pm 8,25a$
	Опыт	$5,09 \pm 0,36$	$149,29 \pm 14,93a$	$3,14 \pm 0,56a$	$94,36 \pm 8,01a$
12.09.2017 г.	Контроль	$4,57 \pm 0,24$	$155,06 \pm 19,51$	$2,76 \pm 0,19$	$69,26 \pm 7,75$
	Опыт	$4,56 \pm 0,44$	$166,65 \pm 12,65$	$3,25 \pm 0,42$	$97,55 \pm 9,75^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — различия между контрольной и опытной группами ($p < 0,05$); a — различия между значениями в текущий и предыдущий периоды для данной группы рыб ($p < 0,05$).

Таблица 2. Удельная активность ферментов ЦО, ЛДГ, альдолазы (мкмоль/мин/г белка) в мышцах форели в зависимости от применения биодобавки в рационе ($M \pm m$)

Группы		ЦО	ЛДГ	Альдолаза
25.06.2017 г.	Начало	2,02 ± 0,22	397,38 ± 37,15	1636,38 ± 274,14
14.07.2017 г.	Контроль	2,04 ± 0,18	1247,86 ± 214,19a	2110,05 ± 130,60
	Опыт	2,07 ± 0,27	1156,20 ± 231,92a	1967,89 ± 233,70
26.07.2017 г.	Контроль	1,27 ± 0,18a	1045,98 ± 120,80	3937,96 ± 531,39a
	Опыт	1,73 ± 0,25	1278,56 ± 199,39	3934,38 ± 976,48a
12.08.2017 г.	Контроль	1,28 ± 0,32	1147,61 ± 166,11	2164,50 ± 468,28a
	Опыт	2,17 ± 0,30*a	1555,73 ± 278,49a	3141,76 ± 307,16
28.08.2017 г.	Контроль	1,74 ± 0,24a	3051,1 ± 287,13a	3348,11 ± 420,02a
	Опыт	1,44 ± 0,29	2793,58 ± 198,27	3128,70 ± 508,83
12.09.2017 г.	Контроль	1,22 ± 0,15a	3168,88 ± 80,52	3476,88 ± 125,49
	Опыт	1,30 ± 0,08a	2786,77 ± 103,46a	3115,40 ± 105,75

Благодарности. Авторы выражают благодарность О.Н. Кремневу, рыбоводу хозяйства, за деятельное участие.

Источник финансирования. Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФ, проект № 17–74–20098.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Awad E., Awaad A.S., Esteban M.A. // Fish & Shellfish Immunology. 2015. P. 43–50. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.05.034.
2. Ma C., Zu Y., Li J., Li W., Liu S. // Ind. Crop. Prod. 95. 2017. P. 324–331. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.10.040
3. Weidmann A.E. // Eur. J. Pharmacol. 2012. V. 684. P. 19–26.
4. Gauthier C., Campbell P., Couture P. // Comp. Bioch. Physiol. Pt A. 2008. V. 151. P. 526–532. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.07.010.
5. Johansen K.A., Overturf K. // Comp. Bioch. Physiol. Pt B. 2006. V. 144. P. 119. 127. DOI: 10.1016/j.cbpb.2006.02.001.
6. Reddy T.K., Reddy S.J., Prasad T. // IOSR J. Pharmacy. 2013. V. 3. P. 49–55.
7. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. 272 с.
8. Smith L. // Methods in Biochem. Analysis. 1995. V. 2. P. 427–434. DOI: 10.1002/9780470110188.ch13.
9. Noble J.E., Bailey M.J.A. // Methods in Enzymology. 2009. V. 463. P. 73–95. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1.
10. Sukhovskaya I.V., Fokina N.N., Lysenko L.A., Ruokolainen T.R., Kantserova N.P. // J. Appl. Aquacult. 2019 (в печати).
11. Lysenko L., Kantserova N., Parshukov A., Sukhovskaya I. // Acta Physiologica. 2019. V. 227. Suppl. 718. P. 45. DOI: 10/1111/apha.13366.

ACTIVITY OF METABOLIC ENZYMES IN FARMED RAINBOW TROUT *Oncorhynchus mykiss* Walb. AFFECTED BY BACTERIAL SEPTICEMIA: THE EFFECT OF FEED ADDITIVES

M. V. Churova, L. A. Lysenko, N. P. Kantserova, I. V. Sukhovskaya,
M. A. Rodin, M. Yu. Krupnova, Corresponding Member of the RAS N. N. Nemova

*Institute of Biology of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation*

Received July 22, 2019

The effect of feed additive including antioxidant dihydroquercetin and polysaccharide arabinogalactan on the activity of metabolic enzymes in muscles and liver of artificially grown rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walb. affected by bacterial infection was investigated. The results of the study indicated an increase in the resistance of trout to the action of bacterial infection with the enrichment of the diet with the studied bioactive components, including, apparently, through the activation of metabolic pathways of synthesis of energy and reducing equivalents.

Keywords: energy metabolism, trout, bacterial infection, dihydroquercetin, arabinogalactan.