



Maciej Rożyński¹, Krystyna Demska-Zakęś², Dorota Fopp-Bayat²

¹Zakład Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

²Katedra Ichtiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Profil biochemiczny krwi triploidalnego jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii* Br.)

Wstęp

Jesiotr syberyjski (*Acipenser baerii* Br.) należy do rodziny ryb jesiotrowatych, które niewątpliwie można zaliczyć do jednych z najstarszych występujących na Ziemi kręgowców. Szczątki przedstawicieli tej rodziny znajdujemy w pokładach datowanych na eocen (środkowy paleogen), a uważa się, że występowały już w czasach środkowego triasu, około 200 mln lat przed naszą erą (Berg 1948, Suvorov 1954, McEnroe i Cech 1985, Grande i Bemis 1991).

W obliczu nieracjonalnej gospodarki rybackiej oraz nadmiernych połowów czy kłusownictwa, a także z roku na rok rozwijającej się zabudowy hydrotechnicznej, jesiotra syberyjskiego możemy obecnie zaliczyć do gatunków zagrożonych wyginięciem. Sytuacja ta, podobnie jak w przypadku wielu gatunków organizmów wodnych, przyczyniła się niewątpliwie do rozwoju akwakultury tego gatunku (Kolman 1997). Obecnie jesiotr syberyjski należy do najczęściej hodowanych jesiotrów, a jego produkcja z akwakultury w 2014 roku wyniosła 347 ton i z roku na rok (poza pojedynczymi przypadkami) można zauważyć tendencję wzrostową (Anonymous 2016).

W celu zwiększenia różnorodności, unowocześnienia oraz powiększenia produkcji akwakultury opracowuje się nowe technologie i systemy podchowu, które łącznie możemy określić mianem biotechnologii. Do jednych z najpopularniejszych i najlepiej rokujących biotechnologii możemy zaliczyć triploidyzację. Największą i najbardziej pożądaną cechą u ryb triploidalnych jest bezpłodność, w przypadku samic całkowita, natomiast u samców połowiczna (Solomon 2003). W związku z brakiem wytwarzania materiału rozrodczego przez triploidalne samice, ryby te charakteryzują się szybszymi przyrostami masy ciała, co pozwala w krótszym czasie osiągnąć wielkość konsumpcyjną (Foresti 2000). Ponadto ryby triploidalne

cechują się w wielu przypadkach wyższą odpornością na choroby oraz mniejszą agresywnością (Parsons i in. 1986, Carter i in. 1994, Garner i in. 2008, Maxime 2008).

Jednak pomimo popularności tej biotechnologii nie są jeszcze poznane aspekty zmian zachodzących u ryb w wyniku zwiększenia ploidalności. Z tego powodu bardzo istotne jest prowadzenie badań i doświadczeń pozwalających na ich poznanie. Do markerów najczęściej wykorzystywanych w badaniach doświadczalnych, oprócz wskaźników hematologicznych i gazometrycznych, można zaliczyć wskaźniki biochemiczne oznaczane w odwirowanym osoczu lub surowicy krwi. Wskaźniki te pozwalają monitorować stan oraz funkcje prawie wszystkich narządów, gruczołów i układów, a także stan odżywienia, nawodnienia czy postęp choroby. Oznaczenie poziomu stężenia, a w przypadku enzymów aktywności poszczególnych składowych osocza dostarcza wielu wartościowych informacji i wskazówek pomagających ocenić stan fizjologiczny i zdrowotny organizmu, a następnie postawić właściwą diagnozę (Akrami i in. 2013). W przypadku triploidalnego jesiotra syberyjskiego problematyka ta jest jeszcze poznana w stosunkowo niewielkim stopniu. Dlatego celem badań było określenie wpływu triploidytacji na wskaźniki biochemiczne tego gatunku: glukozy, trójglicerydów, białka całkowitego, albumin, globulin całkowitych, kreatyniny, amoniaku, wapnia, magnezu oraz fosfatazy alkalicznej, kinazy kreatynowej i dehydrogenazy mleczanowej.

Materiał i metody

Materiał badawczy

Zaplemniona ikra jesiotra syberyjskiego została poddana działaniu udaru cieplnego (37°C przez 2 min) w Gospodarstwie Rybackim Wąsosze (centralna Polska), w wyniku czego uzyskano osobniki triploidalne (Fopp-

-Bayat i in. 2007). Następnie triploidalny i diploidalny narybek (część ikry niepoddanej szokowi termicznemu) (łącznie 100 osobników o średniej masie ciała 3,5 g i długości całkowitej (Lt) 3,0 cm) został sprowadzony do laboratorium Katedry Ichtiologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Ryby zostały obsadzone w czterech 80 l zbiornikach (3,2 osobnika l⁻¹), wchodzących w skład systemu recykulacyjnego (RAS), z zachowaniem podziału na osobniki triploidalne (n = 9) i diploidalne (grupa kontrolna) (n = 9). Ryby żywiono paszą B40 o granulacji 2 mm (Skretting, Norwegia). Przez cały okres podchowu (7 miesięcy) dawka paszy wynosiła 4% biomasy. Parametry jakości wody podczas podchowu były mierzone przynajmniej raz w tygodniu (na odpływie z basenów podchowowych). Średnia temperatura wody wynosiła 17,3 ± 1,5°C, pH 8,0-8,5, twardość ogólna wody 665 ± 2 ppm, a średnia konduktancja 729 ± 9 µS.

Procedury badawcze

Po zakończeniu podchowu wszystkie osobniki z obu grup zmierzono (długość całkowita Lt ± 0,1 cm) i zważono (masa ciała ± 0,1 g). Następnie od każdego osobnika pobrano próbkę krwi (ok. 2 ml) z żyły ogonowej za pomocą heparynizowanych strzykawek. W celu wykonania oznaczeń biochemicznych pobrane próbki krwi zostały odwirowane z prędkością 4000 rpm przez 3 minuty. W osoczu oznaczono zawartość: glukozy (GLU), trójglicerydów (TRIG), białka całkowitego (TP), albumin (ALB), globulin całkowitych (GLOB), kreatyniny (CREA), amoniaku (NH₃), wapnia (Ca), magnezu (Mg) oraz określono aktywność trzech enzymów: fosfatazy alkalicznej (ALKP), kinazy kreatynowej (CK) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Oznaczenia te wykonano za pomocą analizatora biochemicznego VetTest® Chemistry Analyzer (Idexx Laboratories Inc., USA).

Weryfikacja ploidalności

W celu weryfikacji ploidalności wykonano test polegający na zmierzeniu średnicy jąder kolejnych piętnastu erytrocytów (Życzyński i Duszewska 1994, Boroń 1995). Pomiar przeprowadzono za pomocą mikroskopu LEICA DM 3000 (Niemcy) z systemem wizualizacji, analizy i archiwizacji obrazu (Leica Application Suite, Niemcy).

Analiza statystyczna

Dla wszystkich oznaczanych parametrów wyznaczono wartość średnią oraz odchylenie standardowe. Do oszacowania istotności różnic oznaczanych wskaźników, zastosowano test U Manna-Whitneya (test nieparametryczny dla dwóch niezależnych prób). Różnice przyjmowane były jako istotne dla p ≤ 0,05.

Wyniki i dyskusja

Średnia długość całkowita jesiotrów triploidalnych wynosiła 22,3 ± 2,9 cm, a średnia masa ciała 75,3 ± 40,7 g. Natomiast w grupie osobników diploidalnych wartości te wynosiły odpowiednio 21,7 ± 3,3 cm i 72,1 ± 31,2 g. Różnice międzygrupowe były nieistotne statystycznie (p > 0,05).

Niniejsza praca, jako jedna z nielicznych omawia zmiany w profilu biochemicznym wywołane indukcją triploidii u ryb jesiotrowatych. Opierając się na uzyskanych wynikach badań, można stwierdzić, że zwiększenie ploidalności jesiotra syberyjskiego nie powoduje występowania niekorzystnych zmian fizjologicznych. W przeciwieństwie do wskaźników hematologicznych i gazometrycznych (Rożyński i in. 2015), w wartościach analizowanych wskaźników biochemicznych nie stwierdzono międzygrupowych różnic istotnych statystycznie (p > 0,05) (tab. 1). Należy jednak zauważyć, że pomimo braku istotności, w przypadku części wskaźników różnice pomiędzy dwiema badanymi grupami były dość znaczne. Największe zmiany występowały w oznaczeniach aktywności wszystkich trzech enzymów oraz stężenia kreatyniny i amoniaku. U triploidalnych jesiotrów aktywność kinazy kreatynowej, fosfatazy alkalicznej i dehydrogenazy mleczanowej były odpowiednio o 9,53 µkat l⁻¹ (95%), 0,84 µkat l⁻¹ (38,36%) i 3 µkat l⁻¹ (17%) niższe niż u ryb diploidalnych (tab. 1).

TABELA 1

Wpływ triploidyzacji na wskaźniki biochemiczne osocza jesiotra syberyjskiego (średnia ± odchylenie standardowe; zakres)

Wskaźnik	Grupa kontrolna (n = 9)	Grupa triploidalna (n = 9)
Glukoza (GLU) (g l ⁻¹)	1,00 ± 0,20 0,75 - 1,31	1,04 ± 0,38 0,65 - 1,91
Trójglicerydy (TRIG) (g l ⁻¹)	1,27 ± 0,78 0,38 - 2,74	1,23 ± 0,41 0,73 - 2,19
Białko całkowite (TP) (g l ⁻¹)	10,75 ± 7,38 0,00 - 18,00	10,00 ± 4,12 4,00 - 16,00
Globuliny (GLOB) (g l ⁻¹)	10,75 ± 7,38 0,00 - 18,00	10,00 ± 4,12 4,00 - 16,00
Kreatynina (CREA) (mg l ⁻¹)	4,13 ± 1,46 2,00 - 6,00	3,56 ± 1,33 2,00 - 6,00
Amoniak (NH ₃) (mmol l ⁻¹)	0,51 ± 0,11 0,38 - 0,68	0,42 ± 0,16 0,17 - 0,64
Fosfataza alkaliczna (ALKP) (µkat l ⁻¹)	2,19 ± 1,58 0,62 - 4,38	1,35 ± 0,71 0,52 - 2,65
Kinaza kreatynowa (CK) (µkat l ⁻¹)	9,53 ± 15,11 0,00 - 33,93	0,48 ± 0,56 0,00 - 1,35
Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) (µkat l ⁻¹)	18,24 ± 8,52 5,45 - 26,92	15,15 ± 13,30 4,53 - 46,67
Wapń (Ca) (mg l ⁻¹)	51,50 ± 18,65 19,00 - 70,00	48,00 ± 9,97 36,00 - 67,00
Magnez (Mg) (mg l ⁻¹)	11,50 ± 3,37 3,80 - 15,10	12,69 ± 3,00 9,10 - 18,00

Pomimo tak dużych różnic nie były one jednak istotne statystycznie ze względu na duże, pokrywające się zakresy oznaczeń tych parametrów w obydwu grupach. Barker i in. (1983) oraz Sezaki i in. (1988) badając aktywność enzymów

w osoczu krwi ryb triploidalnych również nie odnotowali różnic istotnych statystycznie w ich poziomach u ryb o różnej ploidalności. Enzymy, z komórek ustroju, do krwi przedostają się w dwojaki sposób: po pierwsze, przenikają przez otaczające je komórki, błony komórkowe; po drugie, są uwalniane w trakcie rozpadu komórek podczas apoptozy lub w wyniku ich uszkodzenia. U triploidalnych osobników jesiotra syberyjskiego wszystkie komórki budujące tkanki ustroju triploidów charakteryzują się większymi rozmiarami oraz jednoczesnym, proporcjonalnym zredukowaniem ich liczebności. Skutkuje to obniżeniem całkowitej powierzchni błon komórkowych, co negatywnie wpływa na poziom przenikania enzymów i może powodować tym samym ich mniejszą aktywność, obserwowaną u jesiotra syberyjskiego. Według Folmara (1993) aktywność kinazy kreatynowej w osoczu krwi ryb mieści się w przedziale od 9,8 do 60 $\mu\text{kat l}^{-1}$. U triploidalnych jesiotrów aktywność tego enzymu wynosiła maksymalnie 1,35 $\mu\text{kat l}^{-1}$. Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że u triploidalnego jesiotra syberyjskiego możliwe jest wystąpienie zaburzeń pracy mięśni szkieletowych. Natomiast aktywność fosfatazy alkalicznej u jesiotrów z obu badanych grup mieściła się w zakresie oszacowanym przez Folmara (1993) (od 0,15 do 5,1 $\mu\text{kat l}^{-1}$).

W oznaczeniach profilu biochemicznego triploidalnego jesiotra w porównaniu z grupą kontrolną, oprócz mniejszej aktywności enzymów, niższe były również stężenia amoniaku (0,42 wobec 0,51 mmol l^{-1}) i kreatyniny (3,56 wobec 4,13 mmol l^{-1}) w osoczu krwi obwodowej. Jednak również i w tym przypadku różnice te nie były istotne statystycznie. Stężenie amoniaku u triploidalnego jesiotra w porównaniu z grupą kontrolną zmalało średnio o około 17,5%, natomiast stężenie kreatyniny o niecałe 14%. Wyniki te świadczą o niezaburzonej pracy wątroby oraz skrzeli, a także o prawidłowym funkcjonowaniu nerek jesiotrów poddanych zabiegowi triploidyzacji. Podobnie Oliva-Teles i Kaushik (1987, 1990) prowadząc badania nad triploidalnymi i diploidalnymi pstrągami tęczowymi (*Oncorhynchus mykiss* (Walb.)), zaobserwowali brak istotnych różnic w stężeniu amoniaku we krwi oraz w jego wydalaniu. Także Fauconneau (1986, 1989) w badaniach prowadzonych nad triploidalnym pstrągiem tęczowym zauważył, że zachodzące w jego komórkach przemiany aminokwasów, które są głównym źródłem amoniaku w ustroju, przebiegają prawidłowo. W obu badanych grupach jesiotra syberyjskiego, stwierdzono prawie identyczne stężenie białka całkowitego w osoczu krwi. Podobne spostrzeżenia poczynili Wiley i Wike (1986) u amura (*Ctenopharyngodon idella* (Val.)), Henken i in. (1987) u suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus* (Bur.)) oraz Oliva-Teles i Kaushik (1990) u pstrąga tęczowego. Według Folmara (1993) stężenie albumin w osoczu krwi ryb powinno mieścić się w granicach od 20 do 35 g l^{-1} . W niniejszych badaniach poziom tego związku w osoczu

krwi był zdecydowanie niższy, wartości tego parametru w obu grupach wynosiły 0,00 g l^{-1} . Zerowa wartość oznaczeń tego parametru może być najprawdopodobniej wynikiem zbyt małej czułości testu na obecność albumin we krwi jesiotra. Folmar (1993) określił prawidłowy poziom stężenia wapnia i magnezu u zdrowych ryb. Dla wapnia zakres prawidłowego stężenia w osoczu krwi wynosi od 80,16 do 645,26 mg l^{-1} . W obu grupach poziom stężenia tego pierwiastka w osoczu był o połowę niższy niż minimalna wartość oszacowana przez Folmara (1993) (48,00 mg l^{-1} – ryby triploidalne przy 51,00 mg l^{-1} – ryby diploidalne). Jednak szkielet ryb jesiotrowatych jest w znacznej mierze zbudowany z chrząstki, z tego powodu poziom wapnia, który jest głównym pierwiastkiem tworzącym tkankę kostną, w ich organizmie może być niższy niż u ryb kostnoszkieletowych. Prawidłowe stężenie magnezu w osoczu ryb określone przez Folmara (1993) powinno mieścić się w przedziale od 26,74 do 223,61 mg l^{-1} . Natomiast stężenie tego pierwiastka w osoczu krwi badanych jesiotrów w obu grupach, podobnie jak stężenia wapnia, było o połowę niższe niż minimalna wartość tego wskaźnika określona przez Folmara (1993) (12,69 mg l^{-1} – ryby triploidalne przy 11,50 mg l^{-1} – ryby diploidalne). Folmar jednak nie podaje, jakie wartości parametr ten powinien osiągać u jesiotra. Ponieważ w obu grupach wartość tego pierwiastka była do siebie bardzo zbliżona można stwierdzić, że gospodarka tym pierwiastkiem w organizmie triploidalnego jesiotra przebiega prawidłowo. Najmniejsze oznaczone różnice międzygrupowe dotyczyły trójglicerydów i glukozy. Stężenie trójglicerydów w osoczu jesiotrów triploidalnych było niższe o 0,04 g l^{-1} (3%), natomiast stężenie glukozy było wyższe o około 0,04 g l^{-1} (4%) w porównaniu z grupą kontrolną. Świadczy to o prawidłowym metabolizmie lipidów i glukozy oraz o niezaburzonym funkcjonowaniu wątroby u osobników triploidalnych. Podobny pogląd prezentuje Fauconneau (1986, 1989), który zauważył, że u pstrąga tęczowego z potrójnym zestawem chromosomów przemiany metaboliczne glukozy, nie różnią się w sposób istotny od metabolizmu tego cukru w organizmie diploidalnego pstrąga tęczowego.

Podsumowując, triploidyzacja jesiotra syberyjskiego nie indukuje u niego negatywnych, groźnych zmian w procesach fizjologicznych zachodzących w organizmie. Aczkolwiek zaznaczyć należy, że niskie wartości aktywności kinazy kreatynowej mogą świadczyć o zaburzeniach pracy mięśni szkieletowych ryb o zwiększonej ploidalności.

Podziękowania

Powyższe badania zostały zrealizowane jako część tematu statutowego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie nr 18.610.003-300 oraz w ramach tematu statutowego Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie nr S-028.

Literatura

- Akrami R., Gharaei A., Karami R. 2013 – Age and sex specific variation in hematological and serum biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758) – Int. J. Aquat. Biol. 1(3): 132-137.
- Anonymous 2016 – Global Aquaculture Production 1950-2014 – www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en (dostęp 18.08.2016).
- Barker C.J., Beck M.L., Biggers C.J. 1983 – Hematologic and enzymatic analysis of *Ctenopharyngodon idella* × *Hypophthalmichthys nobilis* F1 hybrids – Comp. Biochem. Physiol. 74A: 915-918.
- Berg L.S. 1948 – Ryby presnykh vod SSSR i sopredelnykh stran – Wyd. AN SSSR, Moskwa: 467 s.
- Boroń A. 1995 – Pomiar erytrocytów ryb – prosta metoda odróżniania poliploidów – Komun. Ryb. 4: 21-23.
- Carter C.G., McCarthy I.D., Houlihan D.F., Johnstone R., Walsingham M.V., Mitchell A.I. 1994 – Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr - Can. J. Zool. 72: 609-617.
- Fauconneau B., Kaushik S.J., Blanc J.M. 1986 – Utilisation de différents substrats énergétiques chez la truite: influence de la ploïdie – Diabetes Metab. 12: 111-112.
- Fauconneau B., Kaushik S.J., Blanc J.M. 1989 – Uptake and metabolization of dissolved compounds in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) fry – Comp. Biochem. Physiol. 93A: 839-843.
- Folmar L.C. 1993 – Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects – Environ. Toxicol. Chem. 12: 337-375.
- Fopp-Bayat D., Jankun M., Woźnicki P., Kolman R. 2007 – Viability of diploid and triploid larvae of Siberian sturgeon and bester hybrids – Aquac. Res. 38: 1301-1304.
- Foresti F. 2000 – Biotechnology and fish culture – Hydrobiologia 420: 45-47.
- Garner S.R., Madison B.N., Bernier N.J., Neff B.D. 2008 – Juvenile growth and aggression in diploid and triploid Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) – J. Fish Biol. 73: 169-185.
- Grande L., Bemis W.E. 1991 – Osteology and phylogenetic relationship of fossils and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes – J. Vertebr. Paleontol. 11: 1-121.
- Henken A.M., Brunink A.M., Richter C.J.J. 1987 – Differences in growth rate and feed utilization between diploid and triploid African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) – Aquaculture 63: 233-242.
- Kolman R. 1997 – Intensywny chów ryb jesiotrowatych – Komun. Ryb. 3: 20-23.
- Maxime V. 2008 – The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish – Fish Fish. 9: 67-78.
- McEnroe M., Cech J.J. 1985 – Osmoregulation in juvenile and adult white sturgeon, *Acipenser transmontanus* – Environ. Biol. Fish. 14: 23-30.
- Oliva-Teles A., Kaushik S.J. 1987 – Metabolic utilization of diets by polyploid rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – Comp. Biochem. Physiol. 88A: 45-47.
- Oliva-Teles A., Kaushik S.J. 1990 – Growth and nutrient utilization by 0+ and 1+ triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* – J. Fish Biol. 37: 125-133.
- Parsons J.E., Busch R.A., Thorgaard G.H., Scheerer P.D. 1986 – Increased resistance of triploid rainbow trout Coho salmon hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus – Aquaculture 57: 337-343.
- Rożyński M., Demska-Zakęś K., Fopp-Bayat D. 2015 – Hematological and blood gas profiles of triploid Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) – Arch. Pol. Fish. 23: 197-203.
- Sezaki K., Watabe S., Hashimoto K. 1988 – Haematological parameters and erythrocyte enzyme activities associated with increase in ploidy status of the spinous loach, *Cobitis biwae* Jordan and Snyder – J. Fish Biol. 32: 149-150.
- Solomon D.J. 2003 – The potential for restocking using all female triploid brown trout to avoid genetic impact upon – Trout News 35: 28-31.
- Suvorov E.K. 1954 – Podstawy ichtiologii – Wyd. Nauk. PWN, Warszawa: 616-629.
- Wiley M.J., Wike L.D. 1986 – Energy balances of diploid, triploid, and hybrid grass carp – T. Am. Fish. Soc. 115: 853-863.
- Życzynski A., Duszczyńska A. 1994 – A simple, fast and reliable method of detecting efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) triploidization – Ann. Warsaw Univ. Life Sci. - SGGW, Anim. Sci. 31: 11-16.

Przyjęto po recenzji 6.10.2016 r.

BIOCHEMICAL PROFILE OF THE BLOOD OF TRIPLOID SIBERIAN STURGEON (*ACIPENSER BAERII* BR.)

Maciej Rożyński, Krystyna Demska-Zakęś, Dorota Fopp-Bayat

ABSTRACT. The aim of this study was to determine the impact triploidization has on the following biochemical indicators of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Br.): glucose, triglycerides, total protein, albumin, total globulin, creatinine, ammonia, calcium, magnesium and alkaline phosphatase, creatine kinase, and lactate dehydrogenase. The experiment was performed on juvenile specimens of the species with a mean total body length of 22.3 ± 2.9 cm and a mean body weight of 75.3 ± 40.7 g. Despite changes observed in the concentration and activity of some indicators, no statistically significant differences were noted in comparison to the control group. The greatest discrepancies were observed in creatine kinase (with activity that was 95% lower in the triploid group), which could indicate disruption in skeletal muscle function in the fish with increased ploidy.

Keywords: Siberian sturgeon, triploidization, biochemical profile