



INSTYTUT RYBACTWA
ŚRÓDLĄDOWEGO
IM. STANISŁAWA SAKOWICZA
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

NATIONAL INLAND
FISHERIES
RESEARCH INSTITUTE

Zakład Ichtiologii Hydrobiologii i Ekologii Wód IRS-PIB

Autoreferat

pracy doktorskiej przedstawionej w formie spójnych tematycznie publikacji naukowych pod
wspólnym tytułem:

**WPLYW NATURALNYCH PREPARATÓW ZAWIERAJĄCYCH ENZYMY
OWOCOWE NA ORGANIZM STERLETA (*Acipenser ruthenus*)**

Mgr inż. Grzegorz Wiszniewski

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. zw. dr hab. wet. Andrzeja K. Siwickiego
Promotor pomocniczy
dr inż. Sylwia Jarmołowicz

1. Wstęp

Proces intensyfikacji akwakultury, obserwowany na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat, wpłynął w znaczący sposób na wzrost zapotrzebowania na paszę, a także na nowo zdefiniował kryteria jakościowe dotyczące optymalnego i racjonalnego żywienia ryb, stanowiącego podstawę efektywności hodowli. Dostępność i maksymalne wykorzystanie składników w podawanym pokarmie, zwłaszcza białka ma ogromne znaczenie. Odpowiednio zbilansowana pasza wpływa na tempo wzrostu i stan kondycyjny, a dodatek naturalnych czy syntetycznych immunostymulatorów pozwala na poprawę wydolności układu odpornościowego ryb podchowiwanych w dużych zagęszczeniach, szczególnie w hodowlach prowadzonych w systemie zamkniętych obiegów recyrkulacyjnych (RAS). Enzymy egzogenne mają istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu pokarmowego ryb, zarówno stadiów larwalnych jak i juwenilnych. O ile w środowisku naturalnym dostęp do enzymów zapewniony jest w różnorodnym pokarmie naturalnym, tak podczas hodowli w obiegach zamkniętych wskazana jest ich suplementacja. Dodanie egzogennych enzymów do paszy ryb może poprawić wykorzystanie zawartych w niej składników pokarmowych, zmniejszając w ten sposób ich straty. Udowodniono, że egzogenne enzymy poprawiają wartość odżywczą paszy i zmniejszają zanieczyszczenie środowiska. Dodatek enzymów egzogennych do paszy otwiera możliwości stosowania alternatywnych źródeł białka w żywieniu ryb, z wykorzystaniem różnorodnych (w tym nowych, nie stosowanych wcześniej) surowców. Przy komponowaniu paszy z wysoką zawartością składników roślinnych, dodanie enzymu może znacząco wpłynąć na poprawę wykorzystanie białka roślinnego przez ryby.

W trakcie intensywnego chowu w systemach recyrkulacyjnych (RAS), organizm ryb jest bardziej podatny na choroby wirusowe, bakteryjne i grzybicze oraz inwazje pasożytnicze. Stosowanie antybiotykoterapii powoduje selekcję w kierunku rozwoju opornych bakterii, zarówno w organizmie ryb jak i w całym środowisku wodnym. Może to prowadzić do zmniejszenia skuteczności kuracji. W takiej sytuacji profilaktyka chorób infekcyjnych powinna być oparta na ograniczeniu możliwości kontaktu z patogenami oraz na modulacji/stymulacji nieswoistej, zarówno humoralnej jak i komórkowej odporności ryb.

W żywieniu zwierząt coraz powszechniej stosuje się immunomodulatory zawierające roślinne substancje aktywne, szczególnie te, które wspomagają nieswoiste mechanizmy obronne i odporność przeciwwzakaźną u zwierząt i człowieka. Suplementacja pokarmu substancjami aktywnymi to skuteczna metoda wspierania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej ryb. Wiąże się ona z wykorzystaniem funkcjonalnych składników, które zastępując konwencjonalne środki lecznicze, stosowane w akwakulturze, mogą łagodzić szkodliwe skutki ich oddziaływania na ekosystem, a szczególnie na wzrost lekooporności patogenów czy ich patogenności. Substancje te, ograniczają lub wręcz niwelują zjawisko immunosupresji pojawiające się w momencie oddziaływania niekorzystnych warunków środowiskowych, ksenobiotyków czy czynników stresogennych na organizm ryb. Jest to element nowatorskiej i proekologicznej metody hodowli ryb. Wraz z pojawieniem się probiotyków,

prebiotyków, synbiotyków i roślinnych substancji aktywnych, obserwuje się wzrost zainteresowania tego typu preparatami, szczególnie pochodzenia naturalnego. Suplementacja pasz wyżej wymienionymi dodatkami stała się powszechnie stosowanym elementem immunoprofilaktyki w żywieniu ryb. Wśród wielu substancji naturalnych, na szczególną uwagę zasługują preparaty roślinne, zwłaszcza enzymy owocowe, które posiadają szerokie spektrum możliwości. Wykazują one działanie stymulujące na układ odpornościowy, zwiększają potencjał obronny organizmu, a jednocześnie poprawiają funkcjonowanie układu pokarmowego.

Niniejsza dysertacja doktorska została przeprowadzona w cyklu trzech doświadczeń, w których wykorzystano enzymy owocowe, należące do grupy proteaz cysteinowych: bromelainę (Eksperyment 1), papainę (Eksperyment 2) i aktynidynę (Eksperyment 3). Są to substancje pochodzące odpowiednio z ananasa, papai i kiwi. Ich właściwości są od dziesięcioleci przedmiotem badań w wielu dziedzinach, zwłaszcza w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej oraz przemyśle spożywczym.

Wpływ ww. enzymów na procesy fizjologiczne organizmów wodnych nie był do tej pory dostatecznie zbadany. Jednakże wieloletnie badania nad ich właściwościami pozwalają sądzić, iż mogą to być skuteczne środki, wspierające organizm ryb. Dlatego celem niniejszej dysertacji była ocena wpływu dodatku 1% i 2% bromelainy, papainy oraz aktynidyny w paszy na tempo wzrostu, histologię wątroby i przewodu pokarmowego, aktywność wybranych enzymów trawiennych oraz wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej sterleta (*Acipenser ruthenus*).

2. Materiał i metody

2.1. Warunki podchowu

Eksperymentalny podchów jesiotrów prowadzono w Zakładzie Ichtiologii Hydrobiologii i Ekologii Wód Instytutu Rybactwa Śródlądowego – Państwowego Instytutu Badawczego (IRS - PIB) w Olsztynie. Układ doświadczalny stanowiły trzy oddzielne obiegi recyrkulacyjne (RAS), składające się z trzech basenów o pojemności 280 dm³. Do badań wybrano sterlety, które po umieszczeniu w basenach były poddane 7-dniowej aklimatyzacji. Doświadczenie składało się z trzech wariantów żywieniowych (2 grupy doświadczalne i grupa kontrolna) w trzech powtórzeniach (n=3). W celu zapewnienia optymalnych warunków podchowu, w trakcie doświadczenia monitorowano właściwości fizykochemiczne wody tj. temperaturę, zawartość tlenu, azotu amonowego i pH. Czas trwania każdego eksperymentu wynosił 56 dni.

2.2. Przygotowanie paszy doświadczalnej

Komercyjną paszę Nutra T-2.0 (Skretting, France) o składzie podstawowym białko 54%, tłuszcz 18% i granulacji 1,9 mm suplementowano bromelainą (Sigma-Aldrich, USA) (Eksperyment 1), papainą (Sigma-Aldrich, USA) (Eksperyment 2) i aktynidyną (KiwiEnzyme.com Ltd., New Zeland) (Eksperyment 3). We wszystkich doświadczeniach dawka enzymu owocowego wynosiła

odpowiednio 1g i 2g 100 g paszy⁻¹. Kontrolę (grupa C) stanowiły ryby żywione wyłącznie paszą bazową, bez dodatku enzymu. Pasze eksperymentalne przechowywano w lodówce w temperaturze 4 °C. Dzienną dawkę pokarmową ustalano raz w tygodniu na podstawie biomasy ryb i tabel żywieniowych producenta paszy. Ryby żywiono za pomocą karmników automatycznych (SDK AFF04, SDK Polska) 12 razy na dobę.

2.3. Wskaźniki hodowlane

Pomiary masy (W; ± 0.01 g) i długości całkowitej ryb (TL; ± 0.1 cm) wykonano na początku i na końcu eksperymentu. Co siedem dni wykonywano pomiary biomasy ryb w celu określenia dawki paszy. Po wykonaniu pomiarów określano podstawowe wskaźniki wzrostu oraz wykorzystania paszy: dobowy przyrost masy ciała (DGR, g d⁻¹), względny przyrost masy ciała (SGR, % d⁻¹), współczynnik kondycji ryb (CF), współczynnik pokarmowy pasz (FCR), współczynnik wydajności wzrostowej białka (PER). Na zakończenie eksperymentu pobierano trzewia oraz wątrobę w celu określenia współczynnika wątrobowosomatycznego (HSI, %) i trzewiowosomatycznego (VSI, %).

2.4. Analiza aktywności enzymów trawiennych

W celu wykazania wpływu badanego suplementu na aktywność enzymatyczną, z każdej grupy badawczej, pobierano wycinki jelita przedniego i tylnego. Próby umieszczano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C. Materiał przeznaczony do analiz aktywności enzymów homogenizowano w buforach, a następnie odwirowywano w temperaturze 4°C przez 15 min przy 15000×g. Analizowano następujące enzymy endogenne: fosfatazę alkaliczną (ALP), fosfatazę kwaśną (ACP), aminopeptydazę leucynową (LAP), amylazę, lipazę i tripsynę. Wszystkie analizy enzymów przeprowadzono w trzech powtórzeniach (n=3).

2.5. Analiza histologiczna wybranych tkanek

W dniu zakończenia eksperymentu do analiz pobrano wątrobę oraz środkowy odcinek przewodu pokarmowego. Tkanki utrwalano w płynie Bouina, odwadniano w etanolu, prześwietlano w ksylenie i zatapiano w bloczki parafinowe, które następnie krojono mikrotomem rotacyjnym na skrawki o grubości 5 µm. Preparaty zostały wybarwione hematoksyliną i eozyną (HiE). Obserwacje mikroskopowe przekrojów wątroby i jelita oraz pomiary histomorfometryczne były wykonywane przy pomocy mikroskopu świetlnego (Olympus Cx31, Japan lub Nikon ECLIPSE 90i, Japan). Do obserwacji i pomiarów strukturalnych użyto programu komputerowego MultiScanBase (Computer Scanning System Ltd., Warsaw, Poland) lub NIS-Elements AR (Nikon Corporation, Japan). U każdego osobnika przeprowadzono następujące pomiary: w wątrobie - wielkość hepatocytów i ich jąder, w jelicie - grubość mięśniówki, wysokość fałdów jelitowych, wysokość enterocytów, wysokość przestrzeni nadjądrowej, wielkość jąder enterocytów (µm). Pomiary histologiczne obejmowały 50 komórek i jąder analizowanych tkanek, pobranych od każdego osobnika.

2.6. Wskaźniki immunologiczne

2.6.1. Nieswoista odpowiedź humoralna

Na zakończenie eksperymentu od 10 osobników z każdego wariantu doświadczalnego pobrano krew z żyły ogonowej. Po jej odwirowaniu (5000 g, 10 min) określano wybrane parametry odporności humoralnej w plazmie krwi. Analizowano poziom białka całkowitego, poziom całkowitych immunoglobulin (Ig), aktywność lizozymu i zawartość ceruloplazminy Cp (IU).

2.6.2. Nieswoista odpowiedź komórkowa

Na zakończenie eksperymentu w celu wyizolowania komórek immunokompetentnych, od ryb z każdego wariantu pobierano do analizy śledzionę. Badania immunologiczne wykonano w Zakładzie Ichtiopatologii i Ochrony Zdrowia Ryb IRS-PIB. Określano aktywność metaboliczną makrofagów metodą spektrofotometryczną po stymulacji komórek PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Sigma). Makrofagi izolowano ze śledziony po odwirowaniu komórek w gradiencie Gradisol G (Polfa). Aktywność fagocytarną makrofagów PKA (Potential Killing Activity) określono metodą spektrofotometryczną po stymulacji komórek przez *Aeromonas hydrophila*. Aktywność proliferacyjną limfocytów określono na podstawie odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T stymulowanych konkanawaliną a (ConA, Sigma) i limfocytów B stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) przy pomocy testu MTT.

3. Wyniki i dyskusja

W trakcie przeprowadzonych doświadczeń, ryby żywione paszą z dodatkiem enzymów owocowych osiągnęły istotnie wyższe przyrosty masy ciała w porównaniu do grupy kontrolnej. Suplementacja paszy enzymami w dawkach 10 lub 20 g kg paszy⁻¹ korzystnie wpłynęła na wartości wskaźników FCR, PER oraz SGR w porównaniu z grupą kontrolną C. Poprawa wartości współczynnika pokarmowego i wydajności wzrostowej białka, odnotowane na zakończenie doświadczeń mogą wskazywać na proteolityczne właściwości zastosowanych enzymów. Proteazy cysteinowe zawarte w bromelainie i papainie mają istotny wpływ na hydrolizę białek do peptydów krótkołańcuchowych, co zwiększa strawność pokarmu. Z kolei aktynidyna została zidentyfikowana jako enzym, wspierający proces hydrolizy wielu rodzajów białek, w tym glutenu. W świetle uzyskanych wyników badań do niniejszej dysertacji oraz dostępnej literatury można stwierdzić, iż suplementacja paszy komercyjnej zaproponowanymi enzymami owocowymi istotnie przełożyła się na tempo wzrostu sterleta.

Przeprowadzone eksperymenty z dodatkiem bromelainy i papainy w paszy wykazały, iż enzymy te istotnie wpływają na aktywność lipazy w jelicie sterleta. Podobnych rezultatów spodziewano się także w odniesieniu do trzeciego, analizowanego enzymu roślinnego – aktynidyny. Jednak badania aktywności lipazy po ekspozycji na aktynidynę wykazały, iż lipaza przedniego

i tylnego odcinka jelita jest mało wrażliwa lub całkowicie odporna na jej działanie. W doświadczeniu z zastosowaniem bromelainy odnotowano wyraźny spadek aktywności trypsyny w przednim odcinku jelita sterleta. Zaobserwowano tutaj także wyraźną zależność pomiędzy spadkiem aktywności trypsyny a wzrostem poziomu lipazy. Takiej zależności nie stwierdzono po zastosowaniu papainy i aktynidyny. W obu tych przypadkach odnotowano spadek aktywności enzymów trawiennych w przednim odcinku jelita sterleta, oraz wzrost aktywności trypsyny i lipazy w tylnym odcinku jelita. W literaturze brakuje szczegółowych doniesień na temat oddziaływania enzymów owocowych na enzymy trawienne ryb. Jednakże analiza uzyskanych wyników do niniejszej dysertacji pozwala stwierdzić, iż zastosowane owocowe enzymy egzogenne mają wpływ na proces przyswajania składników pokarmowych. Mogą w sposób bezpośredni wspomagać trawienie białek lub pośrednio wpływać na poziom wydzielanych enzymów endogennych.

W doświadczeniach z suplementacją paszy bromelainą i papainą odnotowano wzrost powierzchni absorpcyjnej enterocytów w grupach doświadczalnych. Wyższa powierzchnia absorpcyjna enterocytów, przekłada się na poprawę wchłaniania i wykorzystania składników pokarmowych, co także mogło wpłynąć na wyższe przyrosty masy ciała ryb w analizowanych grupach. Pomimo, iż aktynidyna należy do tej samej grupy proteaz cysteinowych co bromelaina i papaina, posiada prawdopodobnie inny mechanizm oddziaływania na komórki nabłonkowe jelit. W przypadku tego enzymu, przeprowadzone analizy histologiczne nie wykazały istotnych różnic w pomiarach morfometrycznych przewodu pokarmowego. Suplementacja bromelainy, papainy i aktynidyny nie wpłynęła istotnie na wielkość powierzchni hepatocytów. Także w obrazie makroskopowym i mikroskopowym, komórki wątrobowe nie odbiegały od normy.

Przeprowadzone doświadczenia do dysertacji doktorskiej wykazały, iż bromelaina, papaina i aktynidyna stymulują układ odpornościowy sterletów. Enzymy te podawane *per os* istotnie wpłynęły na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne sterleta. Dodatek bromelainy w dawce 2% w paszy aktywował niespecyficzne parametry odporności humoralnej sterleta. Ta sama dawka bromelainy indukowała odpowiedź proliferacyjną limfocytów T. Podwyższony poziom frakcji białkowej, pośrednio wskazuje na indukowany przez bromelainę, wzrost stężenia immunoglobulin we krwi sterleta. Zaobserwowano również wzrost aktywności lizozymu po stymulacji bromelainą, co świadczy o wzmocnieniu mechanizmów obronnych sterleta. W niniejszych badaniach, w przypadku papainy (w dawce 2%) odnotowano istotny statystycznie wzrost poziomu ceruloplazminy i aktywności proliferacyjnej limfocytów T i B, a dawka 1% enzymu w paszy ryb wpłynęła na wzrost poziomu immunoglobulin. Obie dawki papainy wpłynęły także na wzrost aktywności makrofagów śledziony stymulowanych PMA i aktywności bójczej fagocytów śledziony (PKA). Po stymulacji papainą obserwowano wzrost aktywności fagocytarnej granulocytów i makrofagów. Wyższa aktywność metaboliczna makrofagów stymulowanych PMA świadczy o tym, iż komórki fagocytujące są sprawniejsze i bardziej zdolne do efektywnego wybuchu tlenowego. Ta właściwość przekłada się na wyższą efektywność eliminacji czynnika patogennego. Stymulujące działanie enzymu ujawniło się

także w zakresie zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii. Po podawaniu sterletom aktynidyny w paszy w dawkach 1% i 2% istotnie wzrósł poziom lizozymu i immunoglobulin (Ig). Immunoglobuliny są najważniejszymi białkami swoistej odpowiedzi odpornościowej, a ich zadaniem jest ochrona organizmu przed m. in. bakteriami i wirusami. Aktywność komórek immunokompetentnych stanowi pierwszą linię obrony, dlatego ocena ich funkcji pozwala ocenić potencjalną sprawność całego układu immunologicznego. Metaboliczna aktywność makrofagów stymulowanych PMA, izolowanych ze śledziony ryb, była znacząco wyższa w grupach, którym podawano aktynidynę w paszy. Jak wspomniano, wyższe wartości aktywności makrofagów stymulowanych PMA świadczą o tym, iż komórki fagocytarne są bardziej zdolne do efektywnego wybuchu tlenowego, co oznacza sprawniejszą eliminację patogenów. W niniejszych badaniach z wykorzystaniem enzymu z kiwi wzrosła także aktywność bójcza fagocytów, pozyskanych ze śledziony. W przeciwieństwie do bromelainy i papainy, aktynidyna nie stymulowała proliferacyjnej odpowiedzi limfocytów T i B.

4. Wnioski

- Suplementacja paszy enzymami owocowymi pozyskanymi z owoców ananasa (bromelainą), papai (papainą) oraz kiwi (aktynidyną) wpłynęła na poprawę tempa wzrostu sterleta,
- Wszystkie trzy badane substancje aktywowały parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej,
 - Dodatek bromelainy istotnie podniósł poziom lizozymu, białka całkowitego i immunoglobulin oraz aktywność proliferacyjną limfocytów T i B,
 - Suplementacja papainy istotnie wpłynęła na wzrost poziomu ceruloplazminy i immunoglobulin oraz aktywność metaboliczną makrofagów oraz aktywność bójczą komórek fagocytarnych i proliferacyjną limfocytów T,
 - Aktynidyna stymulowała aktywność metaboliczną makrofagów i aktywność bójczą fagocytów oraz wpłynęła na wyższe wartości lizozymu i immunoglobulin.
- Analizowane substancje stymulowały wydzielanie wybranych enzymów trawiennych w jelicie cienkim sterleta, przez co wspomagały trawienie pokarmu.
- Bromelaina i papaina stymulowały powierzchnię absorpcyjną enterocytów, co mogło wpłynąć na poprawę wchłaniania składników odżywczych i przyspieszenie tempa wzrostu ryb.
- Zastosowane enzymy owocowe nie powodują zmian patologicznych w analizowanych narządach organizmu ryb i nie wpływają negatywnie na wybrane parametry fizyko-chemiczne wody.
- Potwierdzono wysoki potencjał bromelainy, papainy i aktynidyny jako dodatków funkcjonalnych w żywieniu ryb, a analizowane enzymy mogą być z powodzeniem suplementowane w paszy i stanowić istotny element immunoprofilaktyki nieswoistej w akwakulturze.

Grzegorz Wcisłowski