

DOI 10.7251/VETJSR2301023Z

UDK 637.56'81:597.552.512

Оригинални научни рад

**ЗНАЧАЈ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И Ц-РЕАКТИВНОГ ПРОТЕИНА КАО  
МОГУЋИХ БИОМАРКЕРА У ДИЈАГНОСТИЦИ МИКСОБОЛИЈАЗЕ  
ИЗАЗВАНЕ СА *Myxobolus cerebralis* КОД КАЛИФОРНИЈСКЕ  
ПАСТРМКЕ (*Oncorhynchus mykiss*)**

**Dimitrinka ZAPRYANOVA<sup>1\*</sup>, Cigdem URKU<sup>2</sup>, Galin NIKOLOV<sup>3</sup>,  
Alexander ATANASOFF<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Универзитет Тракија, Факултет ветеринарске медицине, Стара Загора, Бугарска

<sup>2</sup>Универзитет у Истанбулу, Факултет наука о водама, Истанбул, Турска

<sup>3</sup>Универзитет Тракија, Пољопривредни факултет, Стара Загора, Бугарска

\*Коресподентни аутор: Dimitrinka Zapryanova, zapryanowa@abv.bg

**Сажетак**

*Myxobolus cerebralis* је узрочник једне од најопаснијих болести (вртичавост) код салмонида. Припада подфилуму Мухозоа за који је најпријемчивија калифорнијска пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*). Протеини акутне фазе, као есенцијалне компоненте нормалне хомеостазе, потпуно су изучени и користе се као дијагностички и прогностички маркер за процену инфекције и запаљинских процеса код људи и животиња. Када је у питању патологија риба, значај и функција протеина акутне фазе још увек није у потпуности утврђена. Додатно, с обзиром да је, због недостатка специфичних дијагностичких тестова, паразитске инфекције теже дијагностиковати од бактеријских и вирусних, промена концентрације неких од протеина акутне фазе би се могла користити као алтернативни биомаркер за миксоболијазу. Да би се разумео дијагностички значај протеина акутне фазе код риба и да би се разликовале њихове вредности код различитих типова поремећаја неопходна су даља истраживања. У овој студији испитана је промена вредности церулоплазмине и Ц-реактивног протеина након инфламације изазване природном инфекцијом са *Myxobolus cerebralis* код калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*). Мерења су спроводена биохемијским и ензимским имуносорбентним тестом. Материјал за испитивање је укључивао болесне калифорнијске пастрмке са стопом морталитета од 45%. У будућности, протеини акутне фазе имају реални потенцијал да буду широко коришћени у дијагностиковању различитих болести код риба, јер промена њихове вредности може допринети бољој

дијагностици и лечењу, поготово када се промене јављају у току болести. Концентрација Ц-реактивног протеина код пастрмке може да послужи као индикатор здравственог стања. Потребна су додатна истраживања у циљу бољег разумевања дијагностичког значаја протеина акутне фазе код риба и тумачења различитих вредности концентрација код различитих поремећаја.

**Кључне ријечи:** Ц-реактивни протеин, церулоплазмин, *Myxobolus cerebralis*, калифорнијска пастрмка.

## УВОД

*Myxobolus cerebralis* је паразит миксоспоридија присутан код салмонида, и то узгајаних и дивљих популација, а код којих узрокује вртичавост (енг: Whirling disease; скр: WD). Болест, која се јавља код рибе млађи, доводи до деформитета скелета и неуролошких поремећаја. Развојни циклус *M. cerebralis* карактерише животни циклус кроз два домаћина, бескичмењака олигохету *Tubifex tubifex* и кичмењака рибу из групе салмонида. Триактиномиксон споре *Myxobolus cerebralis* могу да продру у крајњег домаћина кроз кожу, шкрге, усну шупљину и пераја (Markiw, 1989; El-Matbouli и сар., 1995). Након везивања актиноспоре, спороплазме улазе у епителне ћелије рибе и почињу да се размножавају. Два дана након тога, ћелије секундарне спороплазме мигрирају у поткожно ткиво, затим у ћелије периферног нервног система и за неколико недеља стижу до ткива хрскавице (Sipos и сар., 2018). Потврдна дијагноза се заснива или на хистологији или на молекуларним методама, при чему је одобрена само једна утврђена PCR техника.

Одговор протеина акутне фазе је много више и детаљније проучен код виших у односу на ниже кичмењаке. Протеини акутне фазе (ПАФ) су супстанце које се синтетишу током акутног одговора на инфекцију, запаљински процес, стрес или оштећење ткива (Сергón и сар., 2005; Petersen и сар., 2004). ПАФ, чија се концентрација у крви повећава за најмање 25% током инфламаторних процеса, називају се „позитивним“ ПАФ, док се „негативним“ ПАФ сматрају они чија се концентрације смањује у сличном односу (Gabay и Kushner, 1999). Даље, концентрација „позитивних“ ПАФ (као што су Ц-реактивни протеин и церулоплазмин) се повећава, док се ниво „негативних“ ПАФ (као што је албумин) смањује. Изразито позитивни ПАФ су они код којих се концентрације повећавају за 100-1000 пута у року од 1-2 дана, док су умерено позитивни ПАФ они код којих се концентрације повећава 5-10 пута, а незнатно позитивни су они ПАФ код којих се концентрација повећава између 50 и 100% (Роу и

сар., 2017). Такође, као одговор на инфламаторне стимулусе, концентрација негативних ПАФ, који се називају и акутни бустери, се смањује вероватно као резултат привремене повећане доступности слободних хормона који се везују за ове протеине (Ingenbleek и Young, 1994).

Производња и функција ПАФ се разликује код различитих врста животиња. Код риба, као и код сисара, хепатоцити су главни извор ПАФ (Güleç и Cengizler, 2012). Концентрације петраксина, којима припада Ц-реактивни протеин (ЦРП), после одговора акутне фазе код риба благо, расту или опадају (Ellis, 2001). ЦРП је најзначајнији ПАФ код кичмењака, укључујући кошљорибе у које спада и калифорнијска пастрмка (*Onchorhynchus mykiss*), а учествује у аглутинацији бактерија, активацији комплемента, активацији макрофага, инхибира раст неких бактерија и појачава фагоцитозу бактерија (Tirziu, 2009). Такође, Kodama и сар. (1999) указују да код калифорнијске пастрмке ЦРП појачава имуностимулативну активност ћелија бубрега, доводећи до појачане фагоцитне и хемокинетичке активности.

Церулоплазмин (Цп) је протеин акутне фазе чија се концентрација повећава као одговор на инфекцију, запаљински процес или друге факторе који оштећују ткиво. Главни извор су хепатоцити, али је могућа и синтеза на местима оштећења ткива (Szcubiał и сар., 2012). Има способност да смањи оксидацију липида, уклања супероксида и ослобађа јона бакра, а такође врши оксидацију  $Fe_2^+$  у  $Fe_3^+$  (Targyal и сар., 2009). Промене у концентрацији Цп код пастрмке могу бити од значаја за рано откривање миксоболијазе изазване *Myxobolus cerebralis* и заједно са резултатима о концентрацији ЦРП могу се користити као параметри за рану дијагностику, која се може успоставити пре предузимања одговарајуће терапије. Стога је циљ овог истраживања да се сагледају промене у концентрацијама ЦРП и церулоплазмине код калифорнијске пастрмке (*Onchorhynchus mykiss*) током природне инфекције изазване *Myxobolus cerebralis*, као и могућност њиховог коришћења као маркера за миксоболијазе.

## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Оболела калифорнијска пастрмка (5-10 g) добијена је из рибњака у близини Пловдива, у Бугарској, где је забележен морталитет од 45%. Узорци крви су узети са репа на задњој страни аналне пераје потпуно одечене помоћу сечива скалпела. Биохемијски параметри су одређивани на потпуно аутоматском уређају за биохемијске анализе у ветерини Mindray BS-120 (Mindray Bio-Medical Electronics, Кина), коришћењем стандардних лабораторијских

комплета које је испоручио Biolabo SAS (Француска). Метода одређивања церулоплазмينا заснива се на мерењу активности оксидазе коју церулоплазмин (Цп) показује са п-фенилендиамином (ППД). Обојени оксидациони производ настаје оксидацијом ППД помоћу Цп применом Ревинове методе описане од стране Bestuјева и Kolb. Комплет за ELISA ЦПП високе осетљивости за рибе (енг: Fish high sensitivity C-Reactive Protein; скр: hs-CRP) је претходно обложен специфичним hs-CRP антителима. У бунарчиће за узорке додато је 10 µl узорака разблаженог у 40 µl пуфера за разблаживање, затим су узорци инкубирани на 37°C током 30 минута и 5 пута испрани раствором за испирање. 50 µl ЦПП - коњугованог реагенса је додато у сваки бунарчић и плоче су инкубиране 30 минута на 37°C. Невезани коњугат је испран и 50 µl раствора хромогена А и 50 µl раствора хромогена Б је додато у сваки бунарчић, а затим инкубиран на 37°C током 15 минута. Ензимска реакција је заустављена додавањем 50 µl стоп раствора у сваки бунарчић. Оптичка густина је мерена на 450 nm. Статистичка анализа резултата је спроведена коришћењем једносмерне анализе варијансе (ANOVA). Добијени резултати су обрађени помоћу софтвера Statistica v.6.1 (StatSoft Inc.) и представљени као средња вредност и стандардна грешка средње вредности (Средња вредност±Стандардна грешка). Статистичка значајност параметара одређена је LSD Posthoc тестом при вредности  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Инфекције миксозоама разликују се по начину инфекције, путу којим паразит стиже до циљног ткива, самом циљном ткиву и симптомима болести код пацијента. У одређеним случајевима, као што је код инфекције са *M. cerebralis*, када паразит мигрира кроз заштићене путеве, одговор специфичног антитела је одложен (Holzer и сар., 2021), а такође се претпоставља да домаћин вероватно не може да одговори на инфекцију све док паразит не изазове довољно оштећења хрскавичном ткиву када бива изложен одбрамбеним механизмима домаћина. Рибе испољавају имунску реакцију против унутрашњих и спољашњих агенаса, а која укључује активацију како урођеног тако и стеченог имунитета (Gruys и сар., 2005). Урођени имунски систем код риба се активира као одговор на инфламаторне стимулусе активацијом фагоцита, стимулисањем активности белих крвних зрнаца и променом концентрације протеина акутне фазе (Roy и сар., 2017).

Ц-реактивни протеин је део урођеног имунског одговора и има кључну улогу у аглутинацији страних микроорганизама, везивању за фосфатидилхолин

на површини микроорганизма, активацији фагоцитозе и класичне каскадне реакције комплемента (Nag и сар., 2004). Резултати Liu и сар. (2004) указују да се синтеза ЦРП код калифорнијске пастрмке детектује углавном у хепатоцитима, макрофагима бубрега, лимфоцитима слезине и лимфоцитима периферне крви. За разлику од људи и сисара, код риба су концентрације ЦРП релативно високе. Код риба се пентраксини обично налазе у вишим концентрацијама у серуму, а различити су код различитих врста риба (Ellis, 2001), па су те вредности код ораде (*Pagrus auratus*) - 54  $\mu\text{g/ml}$  (Cook и сар., 2003), рибе листа (*Pleuronectes plates*) – 55  $\mu\text{g/ml}$  (Pathak и Agrawal, 2019), морског пса (*Mustelus canis*) – 400  $\mu\text{g/ml}$  (Robey и сар., 1983), листа (*Cynoglossus semilaevis*) – 7,6  $\mu\text{g/ml}$  (Li и сар., 2013). Физиолошки распон концентрације ЦРП у серуму калифорнијске пастрмке је 30-88  $\mu\text{g/ml}$  (Liu и сар., 2004; Kodama и сар., 2004; Pathak и Agrawal, 2019). У нашем истраживању, као одговор на инвазију паразита, ниво ЦРП код оболелих риба ( $481 \pm 5,11 \mu\text{g/ml}$ ) је био виши него код здравих ( $36,6 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ ). Ови подаци су у складу са ранијим литературним подацима, где се ниво ЦРП значајно повећао недељу дана након инвазије, а затим се смањило на вредности испод физиолошких (Hoole и сар., 2003; Roy и сар., 2017). Saheb и сар. (2020) су саопштили да се концентрација ЦРП повећава зависно од типа паразитске инфекције протозоама, а та вредност се може користити као неспецифичан индикатор код клиничког испитивања.

У нашем испитивању утврђен је ефекат *M. cerebralis* не само на ЦРП већ и на вредности Цп. Као и код сисара, главна улога Цп код риба је транспорт бакра у крви (Sieroslawska и сар., 2012). Улога Цп је слична улози интерферона и трансферина; инхибира развој бактерија тако што им одузима неке хранљиве материје, тј. јоне бакра. Примећено је да вредност Цп, као протеина акутне фазе, расте под утицајем различитих штетних фактора. Концентрација Цп здраве калифорнијске пастрмке у нашем раду (11-36  $\text{mg/dL}$ ) била је близу оних утврђених у ранијим радовима 13,43-15,48  $\text{mg}/\%$  (Ispir и Dorucu, 2005; Yonag и сар., 2010) док је вишеструко повећање ( $145,39 \pm 23,17 \text{ mg/L}$ ) утврђено код пастрмке заражене са *M. cerebralis*. Неки аутори су приметили значајно повећање активности Цп након интоксикације шарана и млађи сибирске јесетре заражене ларвом *Diplostomum sp*, као и код сибирске јесетре након давања епин-раствора (Kolman, 2001; Sieroslawska и сар., 2012). Инфекција са *A. hydrophila* код тилапија довела је до значајног пораста нивоа Цп у крви (Charlie-Silva и сар., 2019), као и инфекција калифорнијске пастрмке патогенима (Perrier и сар., 1974) и европске јегуље (*Anguilla anguilla*) нематодом (Terech-Majewska и сар., 2015). Слично, у овој студији је забележено повећање концентрације Цп код пастрмке инфициране са *M. cerebralis*. У студији коју су

спровели Kumar и сар. (2017) утврђено је да је промена нивоа Цп повезана са степеном инфекције и његово повећање је највероватније последица одговора на инвазију паразита која утиче на јетру да синтетише позитивне ПАФ-ове како би одржали стабилну унутрашњу средину. Такође, може се претпоставити да Цп има антипаразитску улогу код риба, а што може бити предмет даљег истраживања.

## ЗАКЉУЧАК

Протеини акутне фазе имају у будућности реални потенцијал да постану широко коришћени у дијагностици различитих болести код риба, јер процена њихових концентрација може помоћи бољој дијагнози и лечењу, посебно када се јављају током трајања болести. Мерење концентрације ЦРП код пастрмке може се користити као биоиндикатор здравственог стања ове врсте.

## Захвалница

Овај рад је подржан фондовима Trakia University (број пројекта НП4-21).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

## ЛИТЕРАТУРА

- Cerón J. J., Eckersall P. D., Martínez-Subiela S. (2005): Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2):85-99.
- Charlie-Silva I., Klein A., Gomes J. M. M., Prado E. J. R., Moraes A. C., Eto S. F., Fernandes D. C., Fagliari J. J., Corrêa Junior J. D., Lima C., Lopes-Ferreira M., Conceição K., Manrique W. G., Belo M. A. A. (2019): Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. *Sci. Rep.*, 9:4776.
- Cook M. T., Hayball P. J., Birdseye L., Bagley C., Nowak B. F., Hayball J. D. (2003): Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae*) serum. *Dev Comp Immunol*, 27(6-7):579-588.
- Ellis A. E. (2001): Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:827-839.
- El-Matbouli M., Hoffmann R. W., Mandok C. (1995): Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *J. Fish Biol.*, 46:919-935.
-



- Gabay C., Kushner I. (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 340(6):448-454.
- Gruys E., Toussaint M. J. M., Niewold T. A., Koopmans S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science B*. 6(11):1045-1056.
- Güleç A., Cengizler I. (2012): Determination of acute phase proteins after experimental *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 36(4):380-387.
- Holzer A. S., Piazzon M. C., Barrett D., Bartholomew J. L., Sitjà-Bobadilla A. (2021): To react or not to react: The dilemma of fish immune systems facing Myxozoan infections. *Front. Immunol.*, 12:734238.
- Hoole D., Lewis J., Schuwerack P., Chakravarthy C., Shrive A., Greenhough T., Cartwright J. (2003): Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: A role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology*, 126(7):S71-85.
- Ingenbleek M., Young V. (1994): Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann Rev Nutr.*, 14:495-533.
- Ispir U., Dorucu M. (2005): A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29:1169-1176.
- Kodama H., Arimitsu H., Mukamoto M., Sugimoto C. (1999): Enhancement of phagocytic and chemokinetic activities of rainbow trout head kidney cells by C-reactive protein. *Am J Vet Res.*, 60(2):240-244.
- Kodama H., Matsuoka Y., Tanaka Y., Liu Y., Iwasaki T., Watarai S. (2004): Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:589-597.
- Kolman H. (2001): The humoral effects of epin in siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Archives of Polish Fisheries*, 9(1):61-69.
- Kumar S., Raman R., Pani Prasad K., Srivastava P., Kumar S., Rajendran K. (2017): Modulation of innate immune responses and induction of oxidative stress biomarkers in Pangasianodon hypophthalmus following and experimental infection with dactylogyrid monogeneans. *Fish & Shellfish Immunology*, 63:334e343.
- Li M., Chen C., Li J., Sun L. (2013): The C-reactive protein of tongue sole *Cynoglossus semilaevis* is an acute phase protein that interacts with bacterial pathogens and stimulates the antibacterial activity of peripheral blood leukocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2):623-631
-

- Liu Y., Iwasaki T., Watarai S., Kodama H. (2004): Effect of turpentine oil on C-reactive protein production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 17(3):203-210.
- Markiw M. E. (1989): Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, 6:7-10.
- Nag K., Capote K., Panda A. K., Frederick L., Hearn S. A., Petersen N. O., Schürch S., Possmayer F. (2004): Disparate effects of two phosphatidylcholine binding proteins, C-reactive protein and surfactant protein A, on pulmonary surfactant structure and function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 287:L1145-1153.
- Pathak A., Agrawal A. (2019): Evolution of C-reactive protein. *Front. Immunol., Sec. Molecular Innate Immunity*, 10:00943.
- Perrier H., Delcroix J. P., Perrier C., Gras J. (1974): Disc electrophoresis of plasma proteins of fish. Physical and chemical characters; localization of fibrinogen, transferrin and ceruloplasmin in the plasma of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson), *Comp. Biochem. Physiol.*, 49:679-685.
- Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M. (2004): Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35(2):163-187.
- Robey F. A., Tanaka T., Liu T. Y. (1983): Isolation and characterization of two major serum proteins from the dogfish *Mustelus canis*, C-reactive protein and amyloid P component. *J Biol Chem.*, 258(6):3889-3894.
- Roy S., Kumar V., Behera B. K. (2017): Acute phase proteins and their potential role as an indicator for fish health and in diagnosis of fish diseases. *Protein & Peptide Letters*, 24:1-13.
- Saheb E. J., Kuba R., Musa I. S. (2020): The role of C-reactive protein in the infections caused by parasites (Review). *Diyala Journal of Medicine*, 19(2):157-164.
- Sieroslawska A., Rymuszka A., Velisek J., Pawlik-Skowronska B., Svobodova Z., Skowronski T. (2012): Effects of microcystin-containing cyanobacterial extract on hematological and biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol Biochem.*, 38:1159-1167.
- Sipos D., Ursu K., Dán Á., Herczeg D., Eszterbauer E. (2018): Susceptibility-related differences in the quantity of developmental stages of *Myxobolus* spp. (Myxozoa) in fish blood. *PLoS One*, 13(9):e0204437.
- Szczubiał M., Dąbrowski R., Kankofer M., Bochniarz M., Komar M. (2012): Concentration of serum amyloid A and ceruloplasmin activity in milk from cows with subclinical mastitis caused by different pathogens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2):291-296.
-



- Tapryal N., Mukhopadhyay C., Das D., Fox P. L., Mukhopadhyay C. K. (2009): Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA decay mechanism involving its 3'-untranslated region. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(3):1873-1883.
- Terech-Majewska E., Schulz P., Siwicki A. (2015): Influence of nematode *Anguillicoloides crassus* infestation on the cellular and humoral innate immunity in European eel (*Anguilla anguilla*). *Cent. Eur. J. Immunol.*, 40:127-131.
- Tîrziu E. (2009): Acute-phase proteins in immune response. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară, Timișoara*, 42(1):329-339.
- Yonar M., Sağlam N., İspir U. (2010): Effect of sulfamerazine on plasma ceruloplasmin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Science & Technology*, 5(2):79-84.

Рад примљен: 31.05.2023.

Рад прихваћен: 03.09.2023.