

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 591.1

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА “СУБТИЛИС-С” НА СОДЕРЖАНИЕ
ЛАКТОФЕРРИНА В КРОВИ И ЭПИДЕРМАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ
КОРМЯЩИХ ДИСКУСОВ

© 2023 г. Г. И. Пронина*, @, О. В. Саная*, А. О. Ревякин**

*Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия
им. К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550 Россия

**Испытательный центр “Фармоборона”, ул. Гагарина, 46А, Королев, Московская обл., 141074 Россия
@E-mail: gidrobiont4@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

После доработки 21.11.2021 г.

Принята к публикации 04.12.2021 г.

Пробиотики модулируют иммунный ответ, вытесняют патогенные микроорганизмы из ЖКТ, увеличивают выживаемость личинок. Объектом исследования выбраны дискусы, выкармливающие потомство эпидермальным секретом схожим по набору компонентов с молоком млекопитающих. Лактоферрин обнаружен в крови и кожном секрете дискусов, он обладает антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противопаразитарной активностью. Добавление пробиотика “Субтилис-С” в рацион кормящих дискусов увеличивает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете родителей, а также способствует лучшей выживаемости личинок и мальков рыб.

Ключевые слова: пробиотики, иммунитет, рыба дискус, лактоферрин, эпидермальный секрет

DOI: 10.31857/S1026347023010109, **EDN:** IMUBSB

Одной из проблем аквакультуры является наличие патогенных микроорганизмов, распространение которых усиливается при интенсивных формах культивирования. В связи с этим важной задачей является поиск путей сохранения здоровья объектов аквакультуры и усиление иммунитета производителей и потомства.

Для усиления иммунитета целесообразно использовать пробиотики, модулирующие клеточный и гуморальный иммунный ответ (Possemiers *et al.*, 2011).

Пробиотические бактерии не представляют угрозы для экосистемы, улучшают иммунную систему организмов и являются антагонистами патогенных бактерий. Отмечено, что применение пробиотиков при нанесении на корма: коловраток, артемий и био пленку, состоящую из смеси диатомовых водорослей с преобладанием *Navicula phyllepta* (K., 1844) и бактерий семейства *Rhodobacteraceae*, выделенных из (V., 1833) способствует выживанию личинок (Sayes *et al.*, 2018).

Стимуляция врожденной иммунной системы личинок обыкновенного снука *Centropomus undecimalis* (B., 1792) пробиотиками рода *Bacillus* sp. обеспечивает быструю активацию антигенов, что улучшает выживаемость и устойчивость к патогенам. Большое значение в усилении врожденного

иммунитета имеет регуляция ферментов, которые позволяют организму справляться с клеточным стрессом (Tarnecki *et al.*, 2019).

В желудочно-кишечном тракте рыб содержится большое количество микроорганизмов, которые за долгую историю эволюции сформировали динамичную микроэкосистему. Бактериальные сообщества кишечника играют важную роль в иммунной защите и усвоении питательных веществ хозяина (Chevalier *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2019). В нормальных условиях существует динамический баланс между бактериями и рыбой, что позволяет поддерживать физиологическую функцию кишечного тракта рыбы (Vaperejее, Ray, 2017). Выживание кишечной микробиоты зависит от обеспечения организма рыб собственным питанием или от разложения источников пищи в кишечнике. Между тем, кишечная микробиота может выделять различные пищеварительные ферменты и синтезировать питательные вещества, такие как поливитамины. Эти продукты играют важную роль в переваривании, усвоении, росте и развитии рыбы (Zhang *et al.*, 2021).

Дискусы выбраны в качестве объекта исследований, так как они представляют интерес в эволюционном плане как модель передачи иммунных свойств от родителей потомству. Подобный

способ сохранения потомства путем вскармливания родителями секретом собственного тела, известен только у млекопитающих. Потомство дискуссов, выращенное без вскармливания родителями, проявляет крайне низкую жизнестойкость (Sato *et al.*, 2018).

Некоторые полезные компоненты эпидермального секрета дискусса, которые передаются личинкам, впоследствии малькам, аналогичны компонентам молока млекопитающих: иммуноглобулины, лектины, гормоны, ионы, аминокислоты и антитела. Многие из этих компонентов (пролактин, иммуноглобулины и специфические белки) значительно увеличиваются в каждом секрете во время размножения (Chong *et al.*, 2005; Khong *et al.*, 2009; Sylvain, Derome, 2017). Нами было сделано предположение, что по аналогии с молоком млекопитающих в эпидермальном секрете кормящих дискуссов может содержаться лактоферрин, обладающий иммунными свойствами и являющийся ключевым фактором врожденного иммунитета млекопитающих (Legrand, Mazurier, 2010).

Лактоферрин осуществляет антимикробное действие двумя разными механизмами: захватывает свободное железо, необходимое для роста бактерий и разрушает липополисахариды мембран бактериальных клеток с помощью образовавшихся пероксидов под действием ионов трехвалентного железа лактоферрина (Bennett, Kokocinski, 2005). В присутствии лактоферрина активнее размножаются бактерии с низкой потребностью в железе, такие как *Lactobacillus* sp. и *Bifidobacteria* sp, полезные для хозяина (Sherman *et al.*, 2004; Giansanti *et al.*, 2016).

Фунгицидное действие лактоферрина заключается в лизисе оболочки грибов (Fernandes, Carter, 2017). Противопаразитарная активность лактоферрина связана с нарушением усвоения железа некоторыми паразитами (Giansanti *et al.*, 2013).

Лактоферрин проявляет мощную противовирусную активность в отношении широкого ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Установлено, что лактоферрин связывает гемагглютинин вируса, предотвращая взаимодействие с клеткой; блокирует апоптоз, способствующий распространению вируса на поздних стадиях инфекции через взаимодействие с каспазой-3; блокирует сборку вируса (Зорина, 2020).

Показано, что лактоферрин способен как повышать, так и подавлять эндогенный воспалительный ответ. Лактоферрин действует на В-лимфоциты, которые являются хорошо известными презентаторами антигенов, обеспечивая их последующее взаимодействие с Т-клетками, что усиливает ответ антител, способствуя созреванию предшественников Т-клеток в компетентные Т-хелперы и диффе-

ренцировке незрелых В-клеток в эффективные антигенпрезентирующие клетки (Actor *et al.*, 2009; Legrand, Mazurier, 2010; Turin *et al.*, 2014).

Выявлено, что добавление в корм леща лактоферрина в дозе 100 мг/кг в течение одной недели активирует врожденный клеточный иммунитет, вызывая респираторный взрыв и естественную цитотоксическую активность фагоцитов (Esteban *et al.*, 2005).

Исследований по содержанию лактоферрина в эпидермальном секрете дискуссов в доступной литературе нами не найдено.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение влияния вскармливания пробиотика “Субтилис-С” кормящим парам дискуссов на содержание лактоферрина в их крови и эпидермальном секрете, а также на выживаемость личинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись кормящие дискуссы *Symphysodon haraldi* (S, 1960) в возрасте 1.5–2 г. и их потомство в личиночной стадии в период вскармливания эпидермальным секретом.

Родительские пары дискуссов содержали в 100-литровых аквариумах с аэрацией и фильтрацией по принципу аэрлифта, в нем рыбы нерестились на вертикальный субстрат и выкармливали личинку до перехода на самостоятельное питание в возрасте двух недель (рис. 1). Условия среды в аквариумах были на оптимальном уровне для нереста, выкармливания потомства, роста личинок и мальков дискуссов. Температура воды составляла $29 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 6.0–6.2; фотопериод по 12 ч света и темноты, жесткость 1–2 ммоль/л.

Опытной группе (7 пар, $n = 14$) в корм добавляли пробиотик “Субтилис-С” из расчета 1 г/кг корма. Контрольная группа дискуссов (7 пар, $n = 14$) получала корм без пробиотика. Кормление дискуссов осуществляли личинками хирономид *Chironomus plumosus* (L., 1758) в дозе 2.5% от массы тела 1 раз в сутки. Кормление начинали сразу после отсаживания пар в отдельные нерестовые аквариумы. Длительность эксперимента составила 3 мес.

Выживаемость личинок определяли у каждой пары дискуссов методом подсчета в момент выклева личинок и после снятия с родителей самостоятельно питающихся мальков.

Пробы эпидермального секрета у кормящих самцов и самок дискуссов получали *in vivo* спонжем (рис. 2а), затем выдавливали в шприц (Chong *et al.*, 2006).

Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены прижизненно (рис. 2б) с гепарином на льду, затем переносили в пробирку.

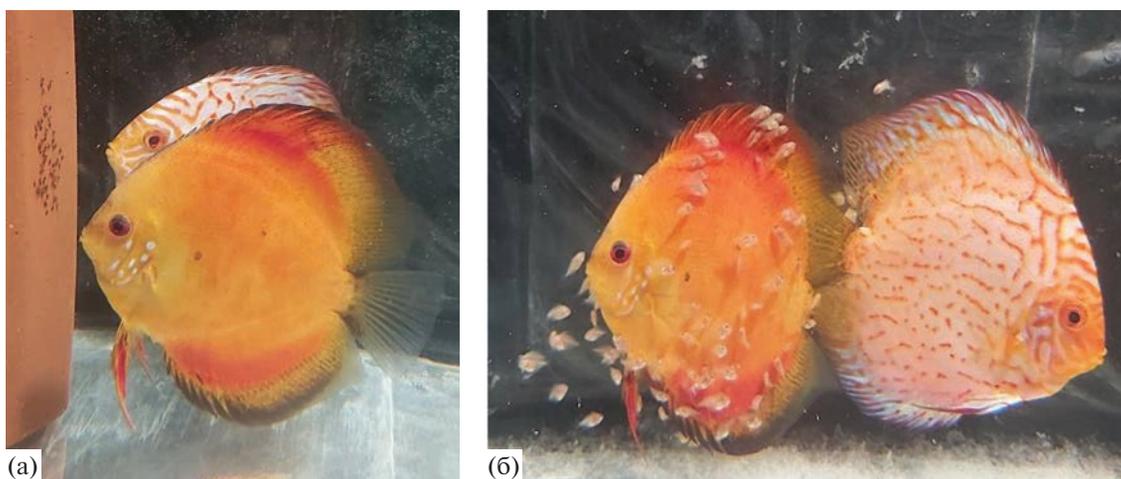


Рис. 1. Дискусы и их потомство. (а) – прикрепленная предличинка на столбе, (б) – кормящая малька пара дискусов.

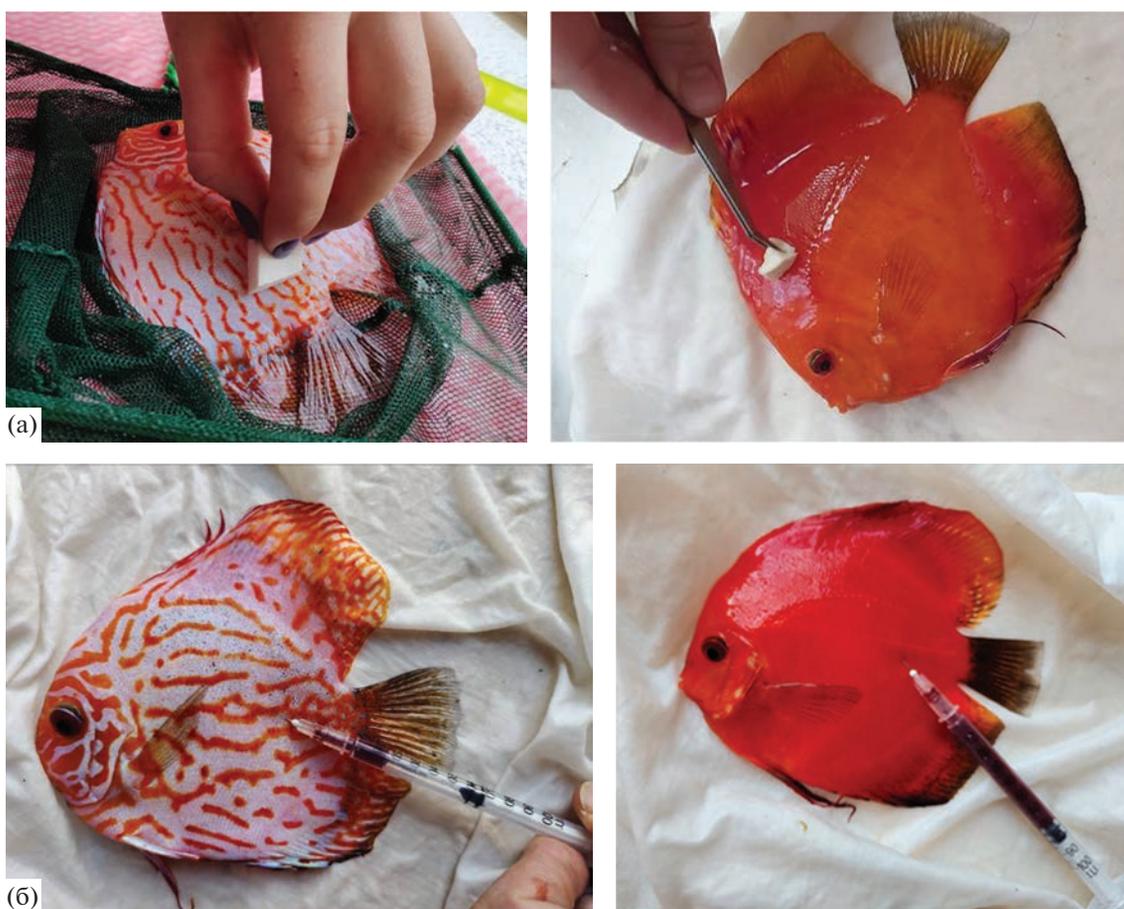


Рис. 2. Отбор проб у дискусов. (а) – получение эпидермального секрета, (б) – взятие крови из хвостовой вены.

В течение 20 мин после сбора крови отделяли плазму центрифугированием 1500 об./мин при 4°C в течение 15 мин. Затем плазму переносили в свежую полипропиленовую пробирку и центрифуги-

ровали, чтобы избежать контаминацию лейкоцитами: 1500 об. при 4°C в течение 15 мин. Готовые образцы хранили при -70°C) в полипропиленовых пробирках.

Таблица 1. Размерно-весовые показатели родительских форм дискусов в опыте

Показатели	Контроль	Опыт
Масса тела в начале эксперимента, г	83.9 ± 3.6	83.8 ± 3.2
Длина тела (l), в начале эксперимента, см	10.5 ± 0.3	11.2 ± 0.2
Масса тела в конце эксперимента, г	89.7 ± 5.4	90.5 ± 6.2
Длина тела (l), в конце эксперимента, см	11.3 ± 0.5	11.6 ± 0.4

Таблица 2. Показатели жизнестойкости потомства дискусов за 3 месяца опыта

Показатели	Контроль	Опыт
Количество уничтоженных кладок, шт	24	11
Количество уничтоженных кладок, приходящихся на одну пару	3.3	1.6
Гибель пометов, шт	6	6
Выращено и высажено пометов, шт.	8	17
Количество выращенных личинок с одного помета, шт	52.3 ± 2.9	65.1 ± 3.4*

Примечание: * – различия достоверны ($P < 0.05$) для табл. 2 и 3.

Лактоферрин в плазме крови рыб определяли “сэндвич” методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовали набор Hbt human Lactoferrin ELISA.

Образцы и стандарты инкубировали в лунках микропланшета, покрытых антителами к лактоферрину. Биотинилированные антитела (трейсер) связывались с лактоферрином человека.

Конъюгат стрептавидин – пероксидаза связывался с трейсером. Конъюгат стрептавидин – пероксидаза реагирует с субстратом тетраметилбензидин (ТМБ). Ферментативную реакцию останавливали, добавляя щавелевую кислоту.

С помощью ИФА-спектрофотометра измеряли абсорбцию при 450 нм. Концентрация лактоферрина в образцах определяли по калибровочной кривой (стандарты и образцы анализировались одновременно). Калибровочную кривую получали путем построения графика зависимости оптической плотности от соответствующих концентраций известных стандартов (log).

Обработку данных проводили методом вариационной статистики по Стьюденту. Достоверными считали различия при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По массе тела рыбы достоверно не различались между собой (табл. 1). За период опыта (3 мес.) при-

рост массы дискусов в опытной группе составил 6.7 г, в контрольной – 5.8 г.

Результаты эксперимента показали, что добавление к рациону кормящих дискусов пробиотика “Субтилис-С” повышает выживаемость личинок (табл. 2), что указывает на усиление иммунитета потомства, очевидно за счет увеличения иммунных свойств кожного секрета родителей.

В результате применения пробиотиков уменьшается процент пар дискусов, уничтожающих кладки. Это, по-видимому, связано со снижением стрессовой реакции и оптимизацией микрофлоры кишечника рыб.

В группе кормящих дискусов, получавших пробиотик, отмечено увеличение содержания лактоферрина в эпидермальном секрете и снижение его в крови (табл. 3).

Можно предположить, что по аналогии с млекопитающими пробиотик усиливает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете.

Доказано благоприятное влияние пробиотиков на свойства грудного молока. В настоящее время сформулировано представление о том, что кишечная микробиота является, в сущности “виртуальным эндокринным органом”. Целый ряд бактерий вырабатывает гормоны и гормоноподобные вещества, например, глюкагонподобный пептид-1, пептид YY, грелин, лептин, а также биологически активные вещества со свойствами

Таблица 3. Содержание лактоферрина в крови и эпидермальном секрете кормящих дискусов, нг/мл

Показатели	Контроль	Опыт
Кровь	165.8 ± 25.9	91.0 ± 4.8*
Эпидермальный секрет	71.5 ± 13.7	113.0 ± 8.8*

нейромедиаторов. Пробиотики участвуют в синтезе и всасывании витаминов К, группы В, фолиевой и никотиновой кислот. Показано, что косвенно и через еще не известные механизмы микрофлора кишечника осуществляет контроль над гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (Попова и др., 2019).

Увеличение лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов очевидно способствует усилению иммунитета и выживаемости потомства. Свойства лактоферрина позволяют организму противостоять различным негативным воздействиям. Была показана протективная роль лактоферрина в отношении последствий токсического воздействия на ранние зародыши мышей бисфенола А (БФА), который является синтетическим экотоксикантом, способным негативно влиять на репродуктивную систему млекопитающих и эмбриональное развитие даже в низких дозах (Постникова и др., 2020).

Выявлено, что экзогенный лактоферрин способен ингибировать перекисное окисление липидов путем блокирования образования свободных гидроксильных радикалов и активировать ферменты антиоксидантной системы (Sandomirsky *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).

Таким образом, обнаружение в крови и эпидермальном секрете дискусов лактоферрина подтверждает эволюционное приспособление этих рыб к сохранению своего потомства. Добавление пробиотика "Субтилис-С" в рацион кормящих дискусов увеличивает выработку лактоферрина в эпидермальном секрете родителей, что ведет к усилению иммунитета потомства. Это проявляется в лучшей выживаемости личинок и мальков рыб.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 20-316-90028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зорина В.Н. Структура и ингибирующая активность лактоферрина по отношению к вирусу гриппа // *Инфекция и иммунитет*. 2020. № 10(1). С. 49–54.
- Постникова Л.А., Нониашвили Е.М., Паткин Е.Л. Действие лактоферрина на развитие ранних зародышей мышей, при внутриутробном воздействии бисфенола А // *Сб. научных трудов Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине*. Санкт-Петербург. Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. 2020. Ч. 2. С. 171–176.
- Попова Е.Н., Орлова А.С., Пономарев А.Б., Закревский В.В., Сергеев В.Н. *Микробиота*. М.: Медиа Сфера, 2019. Глава: Возможность пробиотической коррекции нарушений микрофлоры матери для профилактики возможных осложнений у ребенка. Влияние микрофлоры матери на формирование здоровья будущего ребенка С. 140–152.
- Actor J.K., Hwang S.A., Kruzel M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator // *Curr. Pharm. Des.*, 2009. № 15. P. 1956–1973.
- Banerjee G., Ray A.K. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism // *Symbiosis*. 2017. № 72(1). P. 1–11.
- Bennett R.M., Kokocinski T. Lactoferrin content of peripheral blood cells // *Br. J. Haematol.* 2005. № 39. P. 509–521.
- Chevalier C., Stojanovic O., Colin D.J., Suarez-Zamorano N., Tarallo V., Veyrat-Durebex C., Rigo D., Fabbiano S., Stevanovic A., Hagemann S., Montet S., Seimille Y., Zamboni N., Hapfelmeier S., Trajkovski M. Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold // *Cell*. 2015. № 163(6). P. 1360–1374.
- Chong K., Joshi S., Jin L.T., Chong A. Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior // *Proteomics*. 2006. № 5. P. 2251–2258.
- Chong, K., Ying T.S., Foo J., Jin L.T., Chong A. Characterization of proteins in epidermal mucus of discus fish (*Symphysodon* spp.) during parental phase // *Aquaculture*, 2005. № 249. P. 469–476.
- Esteban M.A., Rodríguez A., Meseguer C., José A. Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilt-head seabream (*Sparus auratus* L.) // *Fish Shellfish Immunol.* 2005. № 18(2). P. 109–124.
- Fernandes K.E., Carter D.A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens // *Front Microbiol.* 2017. № 8. P.:1–6.
- Giansanti F., Leboffe L., D'Elia I., Antonini G. An update on the antifungal activities of Lactoferrin: new promising applications in diagnostic, therapeutics and biotechnology // *Anti-Infect. Agents*, 2013. № 11. P. 155–158.
- Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016. № 9(4). P. 1–15.
- Khong H.K., Kuah M.K., Jaya-Ram A., Shu-Chien A.C. Pro-lactin receptor mRNA is upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase // *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry Molecular Biology*. 2009. № 153. P. 18–28.
- Legrand D., Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity // *Biometals*. 2010. № 23. P. 365–376.
- Possemiers S., Bolca S., Verstraete W., Heyerick A. The intestinal microbiome: a separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals // *Fitoterapia*. 2011. № 82(1). P. 53–66.
- Sandomirsky B.P., Galchemko S.E., Galchenko K.S. Antioxidative properties of lactoferrin from bovine colostrums before and after its lyophilization // *Cryoletters*. 2003. V. 24. P. 275–280.
- Satoh S., Tanoue H., Mohri M. Costs and benefits of biparental mucus provisioning in discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) // *Ichthyological Res.* 2018. № 65. P. 510–514.
- Sayes C., Leyton Y., Riquelme C. *Antibiotic Use in Animals*. L.: IntechOpen, 2018. Chapter 7: Probiotic Bacteria as

- an Healthy Alternative for Fish Aquaculture. P. 115–132.
- Sherman M.P., Bennett S.H., Hwang F.F., Yu C.* Neonatal small bowel epithelia: Enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG // *Biometals*. 2004. № 17. P. 285–289.
- Sylvain F., Derome N.* Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny // *Sci. Rep.* 2017. № 7(1). P. 52–63.
- Tarnecki A.M., Wafapoor M., Phillips R.N., Rhody N.R.* Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance // *Scientific Reports*. 2019. № 9. P. 1–11.
- Turin C.G., Zea A., Pezo A., Cruz K., Zegarra J., Bellomo S., Cam L., Llanos R., Castañeda A., Tucto L., Ochoa T.J.* Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis // *Biometals*. 2014. № 27(5). P. 1007–1016.
- Wang Y.Z., Xu C.L., An Z.H., Liu J.X., Feng J.* Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets // *Animal Feed Science and Technology*. 2008. V. 140. P. 326–336.
- Xiong J., Nie L., Chen J.* Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity // *Zool. Res.* 2019. № 40(2). P. 70–76.
- Zhang Y., Wen B., Meng L.-J., Gao J.-Z., Chen Z.-Z.* Dynamic changes of gut microbiota of discus fish (*Symphysodon haraldi*) at different feeding stages // *Aquaculture*. 2021. V. 531. P. 1–9.

The Effect of the Probiotic “Subtilis-C” on the Lactoferrin Content in the Blood and Epidermal Secretions of “Feeding” Discus Fish

G. I. Pronina^{1, #}, O. V. Sanaya¹, and A. O. Revyakin²

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
49 Timiryazevskaya str., Moscow, 127550 Russia

² Pharmoborona Testing Center, Ltd., 46A Gagarina str., Korolev, Moscow Region, 141074 Russia

[#]e-mail: gidrobiont4@yandex.ru

Probiotics modulate the immune response, displace pathogenic microorganisms from the gastrointestinal tract, and increase the survival rate of larvae. The object of the study was selected discus feeding offspring with an epidermal secret similar in a set of components to mammalian milk. Lactoferrin is found in the blood and skin secretions of discus, it has antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic activity. The addition of the probiotic “Subtilis-C” to the diet of nursing discus increases the production of lactoferrin in the epidermal secretions of parents, and also contributes to better survival of larvae and fry of fish.

Keywords: probiotics, immunity, discus fish, lactoferrin, epidermal secret