

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА В ЭПИДЕРМАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ КОРМЯЩИХ ДИСКУСОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ВЫКАРМЛИВАЕМОГО ПОТОМСТВА*

О.В. Саная¹, Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин²

¹Российский государственный аграрный университет –
МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

²ИЦ «ФАРМОБОРОНА», Королев

Лактоферрин – это многофункциональный белок, который принимает участие в иммунной системе, обладает антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противопаразитарной активностью. Встречается у млекопитающих в секреторных жидкостях эпидермального происхождения. Данные о наличии лактоферрина у более низших животных отсутствуют. Сделано предположение, что представители семейства Цихлиды, выкармливающие личинок секретом собственного тела, могут создавать колостральный иммунитет у потомства. Ранние исследования кожного секрета дискусов показали наличие в нём компонентов схожих с молоком млекопитающих. Исследовали корреляцию содержания лактоферрина в эпидермальном секрете и крови кормящих дискусов, а также влияние количества лактоферрина в эпидермальном секрете родительских пар на выживаемость потомства в личиночной стадии. Лактоферрин определяли методом иммуноферментного анализа. В эпидермальном секрете дискусов обнаружен лактоферрин, при повышении его концентрации в кожной слизи наблюдается снижение концентрации в крови. Родительские пары дискусов с высоким уровнем лактоферрина в эпидермальном секрете реже уничтожали кладки икры и личинок, также наблюдалось большее количество принятых личинок. Выявлено, что повышенный уровень лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов достоверно увеличивает выживаемость личинок.

***Ключевые слова:** лактоферрин, врожденный иммунитет, дискусы, выживаемость потомства.*

Введение. Лактоферрин – полифункциональный негемосодержащий железосвязывающий белок из семейства трансферринов широко представлен в различных секреторных жидкостях, таких как молоко, слюна, слёзы, секреты носовых желез. Лактоферрин является одним из компонентов иммунной системы организма, принимает участие в системе неспецифического гуморального иммунитета, регулирует функции иммунокомпетентных

© Саная О.В., Пронина Г.И.,

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 20-316-90000-Ревякин А.О., 2021

клеток и является белком острой фазы воспаления. Помимо индукции системного иммунитета, лактоферрин может стимулировать кожный иммунитет и ингибировать аллергические реакции (Gonzalez-Chavez et al., 2009; Николаев, Сухарев, 2015; Mayeur et al., 2016).

Установлено, что лактоферрин обладает антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противопаразитарной активностью.

Антимикробное действие лактоферрина обусловлено двумя разными механизмами: связывание свободного железа бактерий, необходимого для их роста, и прямое взаимодействие лактоферрина с липополисахаридом бактериальных стенок. Лактоферрин может повреждать бактерии за счет образования пероксидов, катализируемых ионами лактоферрин-связанного железа (III), влияя на проницаемость мембраны и приводя к лизису бактериальных клеток (Bennett, Kokocinski, 2005). С другой стороны, лактоферрин способствует росту бактерий с низкой потребностью в железе, таких как *Lactobacillus* и *Bifidobacteria*, которые обычно считаются полезными для хозяина (Sherman et al., 2004; Gianasanti et al., 2016).

Противогрибковое действие лактоферрина заключается в дестабилизации мембран; при этом иммуномодуляция и секвестрация железа играют второстепенные роли (Valenti, Antonini, 2005; Fernandes, Carter, 2017). Лактоферрин проявляет мощную противовирусную активность как против вирусов в оболочке, так и против вирусов без оболочки (Pietrantoni et al., 2010; Wakabayashi et al., 2014).

Противопаразитарная активность лактоферрина связана с нарушением усвоения железа некоторыми паразитами (Giansanti et al., 2013).

Считается общепринятым, что лактоферрин является ключевым фактором врожденного иммунитета млекопитающих (в том числе человека) (Legrand, Mazurier, 2010). Лактоферрин защищает новорождённого от патогенных микроорганизмов до тех пор, пока не заработает его собственный иммунитет. Однако имеющиеся данные относятся исключительно к млекопитающим, у которых происходит передача белка от матери к потомству вместе с молозивом и молоком. Вместе с тем отсутствуют данные о приобретении пассивного иммунитета у более низших животных. Изучив данный вопрос, было отмечено что у некоторых видов рыб семейства Цихлиды, мальки поедают секрет с тела родителей. Нами было сделано предположение, что по аналогии с молоком млекопитающих, обеспечивающим колостральный иммунитет, в секрете кормящих цихлид помимо питательных веществ могут содержаться источники пассивного иммунитета. Для проверки этой гипотезы был проведен эксперимент на рыбах дискусах, представителях семейства Цихлиды.

Дискусы (*Symphysodon haraldi*) являются интересным объектом изучения передачи иммунных свойств от родителей потомству, так как личинка питается эпидермальным секретом родителей. Некоторые полезные компоненты слизи дискаса, которые передаются личинкам, аналогичны компонентам молока млекопитающих: иммуноглобулины, лектины, гормоны, ионы, аминокислоты и антитела (Chong et al., 2005; Khong et al., 2009). Интересно, что многие из этих компонентов (пролактин, иммуноглобулины и специфические белки) значительно увеличиваются в кожной слизи во время размножения (Sylvain, Derome, 2017; Zhang et al., 2021). Вместе с тем исследований по содержанию лактоферрина в эпидермальном секрете дискусов в доступной литературе нами не найдено.

Цель – определение содержания лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов и его влияние на выживаемость выкармливаемого потомства

Методика. Объектами исследований являлись родительские пары кормящих дискусов (*Symphysodon haraldi*), возраст 1,5-2 года и их потомство в личиночной стадии в период вскармливания эпидермальным секретом.

По массе и размерам тела рыбы достоверно не различались между собой. Родительские пары дискусов содержались 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 2-х недель (рис. 1).

Условия среды в аквариумах соответствовали нормам. Температура воды составляла $29 \pm 1^\circ\text{C}$, рН 6,0-6,2, фотопериод по 12 часов света и темноты, жесткость 2-3 гН. Кормом для дискусов служили крупные личинки хирономид (*Chironomus plumosus*) в дозе 2,5% от массы тела 1 раз в сутки. Длительность эксперимента составляла 3 месяца.

На подготовительном этапе у всех рыб определяли уровень лактоферрина в эпидермальном секрете, затем формировали группы. В опытную группу отбирались пары с уровнем лактоферрина в эпидермальном секрете выше 100 нг/мл (6 пар n=12). В контроль подбирались пары со значениями показателя ниже 100 нг/мл (6 пар n=12).

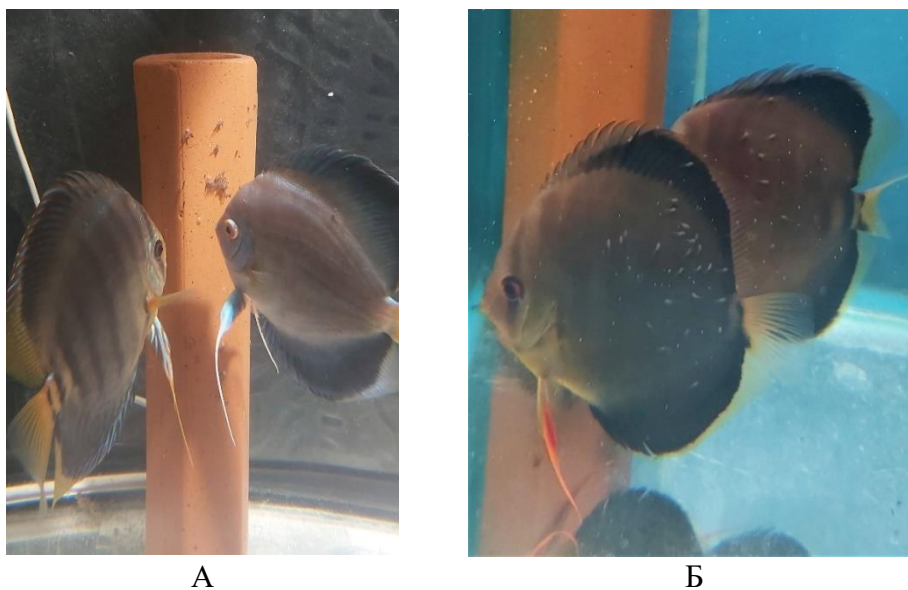


Рис. 1. Дискусы и их потомство. А – прикрепленная личинка на столбе.
Б – кормящая личинку родительская пара дискусов

Пробы брали *in vivo* у кормящих самцов и самок. Эпидермальный секрет получали *in vivo* спонжем (рис. 2А), затем переносили в шприц и выдавливали в пробирку (Chong et al., 2005). Лактоферрин в эпидермальном секрете и плазме крови рыб определялся методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ELISA (LTF) на спектрофотометре MultiScan Go.

Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены (рис. 2Б) шприцом с добавлением гепарина на льду, затем переносили в пробирку.



Рис. 2. Отбор проб у дискусов: А – получение эпидермального секрета;
Б – взятие крови из хвостовой вены

Для получения плазмы пробирки с кровью центрифугировали при температуре +4°C 1500 об/мин в течение 15 минут. После отбора и переноса плазмы в свежие пробирки ее снова центрифугировали при тех же условиях. Готовые образцы хранили в полипропиленовых пробирках при температуре -70°C. Выживаемость личинок определяли у каждой пары дискусов методом подсчета в момент выклева личинок и после снятия с родителей самостоятельно питающихся мальков.

Математическую обработку цифровых материалов проводили методом вариационной статистики по Стьюденту с использованием компьютерной обработки данных. Достоверными считались различия при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Впервые было констатировано наличие лактоферрина в эпидермальном секрете дискусов, что подтверждает нашу гипотезу о сходстве компонентов и иммунных свойств эпидермальной слизи кормящих дискусов с молоком млекопитающих. А также, возможно, о передаче иммунитета от родителей потомству.

Отмечено, что в крови опытных дискусов уровень лактоферрина в крови достоверно ниже, чем в контроле (при повышении его концентрации в кожной слизи наблюдается снижение концентрации в крови (таблица). По данным показателям выявлена обратная корреляция с коэффициентом равном -0,79.

Таблица
Показатели эпидермального секрета и крови родительских форм и жизнестойкости потомства дискусов за 3 месяца

Показатели	Контроль 6 пар	Опыт 6 пар
Масса тела, г	82,9±3,6	83,8±3,2
Длина тела TL, см	10,5±0,3	11,2±0,2
Содержание лактоферрина в эпидермальном секрете дискусов, нг/мл	63,3±10,1	119,1±9,9*
Содержание лактоферрина в крови дискусов, нг/мл	174,0±27,8	87,8±1,8*
Количество уничтоженных кладок, шт	18	8
Количество уничтоженных кладок, приходящихся на одну пару	2,8	1,4
Гибель пометов, шт	5	5
Выращено и высажено пометов, шт.	7	15
Количество выращенных личинок с одного помета, шт	52,8±2,1	67,1±2,5*

Примечание: * - различия достоверны ($P < 0,05$).

Выявлено, что у дискусов с высоким уровнем лактоферрина в эпидермальном секрете (опытная группа) меньше уничтоженных

кладок и больше выращенных и высаженных пометов, чем у родительских пар с низким уровнем лактоферрина в кожном секрете (таблица).

Кроме того, в опытной группе наблюдалось достоверно большее количество выращенных личинок с одного помета.

По-видимому, эпидермальный секрет кормящих дискусов помимо питательной ценности обладает адаптогенными свойствами и повышает защитные механизмы иммунитета у личинок, что может быть связано с в т.ч. с входящим в его состав лактоферрином, который, как было отмечено выше, обладает противомикробными, противовирусными и противогрибковыми свойствами и предположительно, через усиление иммунитета влияет на выживаемость выкармливаемых личинок. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на эволюцию механизмов, увеличивающих способность к выживанию, в т.ч. пассивного иммунитета и использовать дискусов в качестве модели для более глубокого изучения данного вопроса.

Заключение. В эпидермальном секрете кормящих дискусов также как в молоке млекопитающих содержится лактоферрин.

Повышенный уровень лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов достоверно увеличивает выживаемость личинки.

Полученные результаты позволят ближе подойти к пониманию фундаментальных основ эволюционного развития, так как рыбы (цихлиды), находясь на более низкой ступени, предположительно раньше млекопитающих перешли на вскармливание потомства, тем самым повысив их выживаемость.

Дискусы являются удобной и адекватной моделью для изучения эволюционных взаимоотношений по вопросам вскармливания потомства, влиянию различных факторов на выживаемость потомства, с возможностью экстраполяции полученных результатов на других животных и, возможно, человека, а также филогенетической прослеживаемости изучаемых вопросов.

Список литературы

- Николаев А.А., Сухарев А.Е.* 2015. Лактоферрин и его роль в репродукции (обзор литературы) // Проблемы репродукции. № 6. С. 25-30.
- Bennett R.M., Kokocinski T.* 2005. Lactoferrin content of peripheral blood cells // British journal of Haematology. V. 39. P. 509-521.
- Chong K., Ying T. S., Foo J., Jin L. T., Chong A.* 2005. Characterization of proteins in epidermal mucus of discus fish (*Symphysodon spp.*) during parental phase // Aquaculture. V. 249. P. 469-476.
- Esteban M A., Rodríguez A., Meseguer C., José A.* 2005. Effects of lactoferrin on

- non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.) // Fish & shellfish immunology. V. 18(2). P. 109-124.
- Fernandes K.E., Carter D.A. 2017. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens // *Frontiers in Microbiology*. V. 8(2).
- Giansanti F., Leboffe L., D'Elia I., Antonini G. 2013. An update on the antifungal activities of Lactoferrin: New promising applications in diagnostic, therapeutics and biotechnology // *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. V. 11. P. 155-158.
- Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. 2016. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties // *Pharmaceuticals (Basel)*. V. 9(4). P. 61.
- Gonzalez-Chavez S. A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications // *International Journal of Antimicrobial Agents*. V. 33(4). P. 301.e1-8.
- Khong H.K., Kuah M. K., Jaya-Ram A., Shu-Chien A.C. 2009. Prolactin receptor mRNA is upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. V. 153 P. 18-28.
- Legrand D., Mazurier J. 2010. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity // *Biometals*. V. 23. P. 365-376.
- Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y., Levy E. 2016. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease // *Antioxid Redox Signal*. V. 24. P. 813-836.
- Pietrantonio A., Dofrelli E., Tinari A., Ammendolia M.G., Puzelli S., Fabiani C., Donatelli I., Superti F. 2010. Bovine lactoferrin inhibits influenza A virus induced programmed cell death *in vitro* // *Biometals*. V. 23. P. 465-475.
- Sherman M.P., Bennett S.H., Hwang F.F., Yu C. 2004. Neonatal small bowel epithelia: Enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus GG* // *Biometals*. V. 17. P. 285-289.
- Sylvain F., Derome N. 2017. Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny // *Scientific Reports*. V. 7(1). P. 52-63.
- Valenti P., Antonini G. 2005. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack // *Cellular and Molecular Life Sciences*. V. 62. P. 2576-2587.
- Wakabayashi H., Oda H., Yamauchi K., Abe F. 2014. Lactoferrin for prevention of common viral infections // *Journal of Infection and Chemotherapy*. V. 20. P. 666-671.
- Zhang Y., Wen B., Meng L.-J., Gao J.-Z., Chen Zh.-Zh. 2021. Dynamic changes of gut microbiota of discus fish (*Symphysodon haraldi*) at different feeding stages // *Aquaculture*. V. 531. P. 735-912.

**RESEARCHING OF THE LACTOFERRIN CONTENT
IN THE EPIDERMAL SECRETION OF NURSING DISCUS
ON THE SURVIVAL OF THE REARED OFFSPRING**

O.V. Sanaya¹, G.I. Pronina¹, A.O. Revyakin²

¹Russian State Agrarian University –
Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow
²RC «FARMOBORONA», Korolev

Lactoferrin is a multifunctional protein that participates in the immune system, has antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic activity. It occurs in mammals in secretory fluids of epidermal origin. There are no data on the presence of lactoferrin in lower animals. It is assumed that representatives of the Cichlid family, feeding larvae with the secret of their own body, can create colostral immunity in offspring. Early studies of the skin secretion of discus showed the presence of components similar to mammalian milk in it. The correlation of lactoferrin content in epidermal secretions and blood of nursing discus, as well as the effect of the amount of lactoferrin in the epidermal secretions of parental pairs on the survival of offspring in the larval stage was investigated. Lactoferrin was determined by enzyme immunoassay. Lactoferrin was found in the epidermal secretion of discus, with an increase in its concentration in the skin mucus, a decrease in the concentration in the blood is observed. Parental pairs of discus fish with a high level of lactoferrin epidermal secretions were less likely to destroy eggs and larvae clutches, and a greater number of adopted larvae were also observed. It was revealed that the increased level of lactoferrin in the epidermal secretion of nursing discus fish significantly increases the survival of larvae.

Keywords: *lactoferrin, innate immunity, discus fish, offspring survival.*

Об авторах:

САНАЯ Ольга Владимировна – аспирант кафедры аквакультур и пчеловодства, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: discus2020@gmail.com.

ПРОНИНА Галина Иозеповна – доктор биологических наук, доцент кафедры аквакультур и пчеловодства, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: gidrobiont4@yandex.ru.

РЕВЯКИН Артем Олегович – кандидат биологических наук, ООО ИЦ «Фармоборона», 141074, Московская область, Королев, ул. Гагарина, 46А; e-mail: ar_info@mail.ru.

Саная О.В. Изучение содержания лактоферрина в эпидермальном секрете кормящих дискусов на выживаемость выращиваемого потомства / О.В. Саная, Г.И. Пронина, А.О. Ревякин // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2021. № 4(64). С. 62-69.