

УДК: 639.3.043.13

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.144

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА «БАЦЕЛЛ-М» НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КАРПА ОБЫКНОВЕННОГО (*CYPRINUS CARPIO*)

Семенова Е.В.^{1*} – асп., ст. лаборант лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики. (ORCID 0000-0003-3675-5467); Стрельников Н.А.¹ – мл. науч. сотр. лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики (ORCID 0000-0002-0781-7713); Мармурова О.М.² – канд. с.-х. наук, доц. каф. ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии (ORCID 0000-0002-1726-3769); Михайлов Е.В.^{1,2} – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр., зав. отделом экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем, доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии (ORCID 0000-0001-54-57-1325).

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», Воронеж, Россия

²ФГБОУ ВО «Воронежский Государственный аграрный университет им. Петра I», Воронеж, Россия

* elenasemyonova5@gmail.com

Ключевые слова: аквакультура, промысловое рыбоводство, карп обыкновенный, пробиотик «Бацелл-М», жировая дистрофия печени, экспрессия генов.

Keywords: aquaculture, commercial fish farming, common carp, Bacell-M probiotic, liver steatosis, gene expression.

Поступила: 07.11.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024

РЕФЕРАТ



Рыбоводство является одной из важных отраслей сельского хозяйства. Успех в данной сфере в значительной мере зависит от эффективности использования кормов, что делает рациональное питание рыб одним из важнейших аспектов их разведения. Целью работы было изучение изменений морфофункционального статуса печени карпа обыкновенного (*Cyprinus Carpio*) при использовании пробиотика "Бацелл-М". В ходе данного эксперимента была использована товарная рыба массой 800-900 г. Для фонового исследования биологический материал отбирался от карпа обыкновенного (*Cyprinus carpio*) всех исследуемых групп для проведения цитоморфологических исследований. Особи, участвующие в работе, были разделены на две основные группы. Первая группа – контрольный пруд (n=600) – получали основной рацион. Гидробионты второй группы (n=600) в течение 30 дней питались основным рационом с добавлением пробиотического препарата «Бацелл-М» в дозировке 2 кг/тонну. Убой и отбор биологического материала исследуемых особей всех групп (n=6) проходил в два этапа: первый – через 14 дней после начала эксперимента, второй – через 35 дней после начала исследований. Полученные в ходе исследования данные показали, что применение пробиотика показывает положительные результаты,

такие как поддержка целостности сосудистой и паренхимотозной структуры печени, способствует снижению накопления липидов в гепатоцитах, уменьшает количество воспалительных инфильтратов и обеспечивает сохранение микроциркуляции в исследуемом органе. Для оценки полученных результатов исследовали экспрессию гена GPx-1, который играет ключевую роль в поддержании клеточной защиты от окислительного стресса.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Рыбоводство является одной из важных отраслей сельского хозяйства. Успех в данной сфере в значительной мере зависит от эффективности использования кормов, что делает рациональное питание рыб одним из важнейших аспектов их разведения. Значительную роль здесь играют высокоэффективные комбикорма, обеспечивающие гидробионтов всеми необходимыми питательными веществами, аминокислотами и витаминами [1, 2]. Важность разработки рациональных кормов в аквакультуре тесно связана с изучением проблем, возникающих при неправильном питании рыбы. Жировая дистрофия, возникающая вследствие несбалансированного питания, приводит к значительным нарушениям в работе организма рыб, включая деградацию функций печени и общего обмена веществ, что приводит к снижению продуктивности гидробионтов и их устойчивости к болезням.

Полученные за последние несколько лет данные показывают, что применение пробиотиков, таких как «Бацелл-М», в рационе рыб может способствовать не только улучшенному усвоению питательных веществ, но и снижению риска развития патологий печени [3]. Все это делает изучение взаимодействия пробиотиков и липидного обмена у карпов особенно актуальным для дальнейшего развития эффективных методов кормления, которые позволят значительно повысить продуктивность аквакультурных хозяйств, улучшая состояние здоровья рыб. Полученные результаты могут предоставить ценные научные данные для оптимизации кормовых стратегий и профилактики у гидробионтов, что особенно важно для коммерческого выращивания карпов и других видов рыб в условиях интенсивного производства.

Целью работы было изучение изменений морфофункционального статуса печени рыбы при использовании пробиотика «Бацелл-М».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В данном эксперименте участие принимали карпы обыкновенные (*Cyprinus Carpio*) массой 800-900 г. После проведенных фоновых исследований гидробионты были разделены на две группы. Особи первой группы (контрольный пруд) (n=600) получали основной рацион, гидробионты второй группы (n = 600) получали в течение 30 дней основной рацион с добавлением пробиотика «Бацелл-М», в дозировке 2 кг/тонну. Убой и отбор биологического материала исследуемых особей всех групп проходил в два этапа: первый – через 14 дней после начала эксперимента, второй - через 35 дней после начала исследований.

Для проведения морфологических исследований тканей были отобраны образцы печени карпов, которые фиксировали в 10 %-ом растворе нейтрального формалина. Затем образцы тканей обезжировывали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и уплотняли парафином. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 3-5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и просматривали в светооптическом микроскопе.

Оценка экспрессии генов карпа обыкновенного проходила посредством ПЦР-анализа с добавлением красителя SYBR Green и с использованием специфичных праймеров генов: GPx-1. Выделение РНК осуществлялось набором «РНК-Экстран» (Син тол, Россия) по утвержденной инструкции. Оценку качества выделенной РНК производили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. По-

лимеразная цепная реакция проводилась на приборах Bio-Rad CFX 96 (Bio-rad, США) и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с готовой коммерчески

доступной смесью для PCR 5X qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Россия). В качестве референсного гена выступал β -Актин (табл 1).

Таблица 1 – Список праймеров для ПЦР в реальном времени

Исследуемый ген	Последовательность праймеров
β -Актин	F: GTACGTTGCCATCCAGGCTGTG R: ACGTCACACTTCATGATGGAGTTGAAG
Fish GPX1	F: TGCAACCAGTTCGGACATCA R: GAAGCCATTTCAGGACGGA

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Фоновые исследования тканей печени карпа обыкновенного выявили наличие патологических процессов. На рисунке 1А можно отметить выраженный макровезикулярный стеатоз, характеризующийся накоплением липидных капель в гепатоцитах. Ядра гиперхромны и вытеснены на периферию клетки, что служит индикатором процесса адаптации к хроническим повреждениям. На некоторых участках отмечается кариопикноз, характеризующий начальные стадии апоптоза или некроза. Цитоплазма клеток выглядит неровной, гранулярной, что, по мнению Roh H., может свидетельствовать о повреждениях митохондрий и эндоплазматического ретикулума в результате окислительного стресса, проводящего к накоплению дефектных белков и липидов в гепатоцитах [4].

Окраска гистологических препаратов суданом III + IV (рисунок 1, Б) подтверждает наличие макровезикулярного стеатоза визуализацией значительной степени вакуолизации клеток печени. Ткань выглядит дезорганизованной с малым количеством видимых сосудов и капилляров, что так же подтверждает начальную стадию некроза. Темные точечные включения, предположительно, являются областями гемосидерина - пигмента, который образуется в результате кровоизлияний и распада эритроцитов.

При исследовании морфофункционального статуса карпа обыкновенного на 14 сутки у контрольной группы был выявлен лизис гепатоцитов (рисунок 2, А). Они теряют свою структурную целостность, их мембраны разрушаются, что

приводит к высвобождению внутриклеточных компонентов в межклеточное пространство, усиливая воспаление. Исходя из результатов опубликованных Engin S. и Gurkan S. можно сделать вывод, что потеря митохондрий и эндоплазматического ретикулума приводит к нарушению синтеза белков и метаболизму липидов [5]. Разрушение центральной вены является следствием воспаления, что нарушает микроциркуляцию в печени и ухудшает доставку кислорода и питательных веществ.

На рисунке 2Б представлен гистологический препарат печени опытной группы. Можно отметить, что структура центральной вены остается интактной, а области с очагами воспаления сведены к минимуму. Отсутствие значительного разрушения сосудов указывает на нормализацию венозного оттока и улучшение микроциркуляции в печени, что способствует восстановлению клеток [6]. Гепатоциты сохраняют нормальную округлую форму, их ядра не смещены, что говорит о хорошем состоянии клеток. Сохранение структуры гепатоцитов связано с тем, что пробиотик поддерживает нормальный метаболизм митохондрий, предотвращая развитие жировой дистрофии и разрушение клеток [7].

На 35 сутки у контрольной группы (рисунок 3, А) было выявлено наличие очагов воспалительных клеток в процессе системного воспаления, которое затрагивает микрососудистую систему печени, приводя ткани к развитию дистрофий и некрозов. Это явление также может свидетельствовать о нарушении метаболической и детоксикационной функции пече-

ни, поскольку гепатоциты теряют способность эффективно обрабатывать питательные вещества и удалять токсины, что согласуется с выводами, сделанными Li X. и Zheng S. [8, 9].

У карпов, получавший пробиотик (рисунок 3, Б), отмечается сохранность структуры паренхимы печени, нормализующейся в связи с поддержкой пробио-

тика целостности клеточных мембран и предотвращении накопления липидов в гепатоцитах. Сами клетки печени остаются структурно неповрежденными, их ядра и цитоплазма имеют нормальное состояние. Центральная вена и синусоиды не расширены, что указывает на отсутствие застойных процессов и воспаления [10].

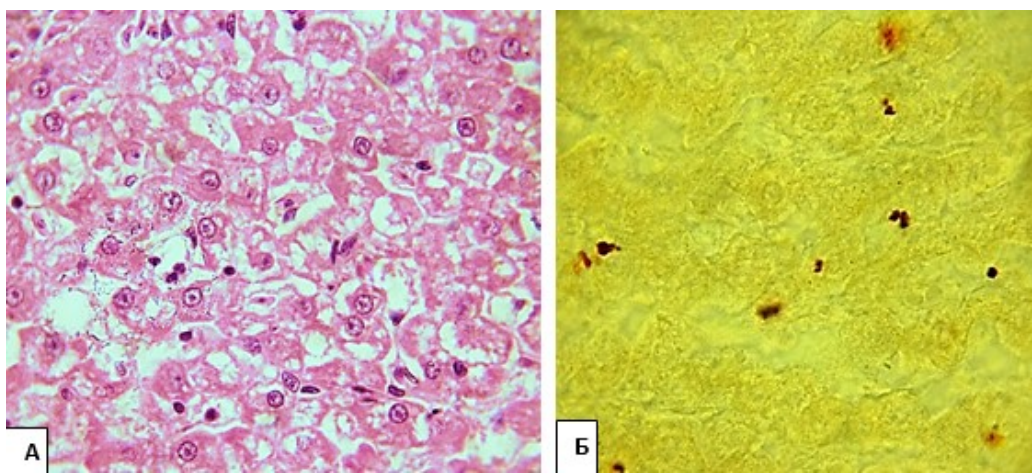


Рисунок 1 (А, Б) - Микрофотографии структуры печени карпа обыкновенного (*Cyprinus Carpio*) при фоновом исследовании:

А - Среднекапельная жировая дистрофия. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x400. Б - Среднекапельная диффузная жировая дистрофия в печени. Окр. суданом III + IV, ув. ок. 8, об. 40.

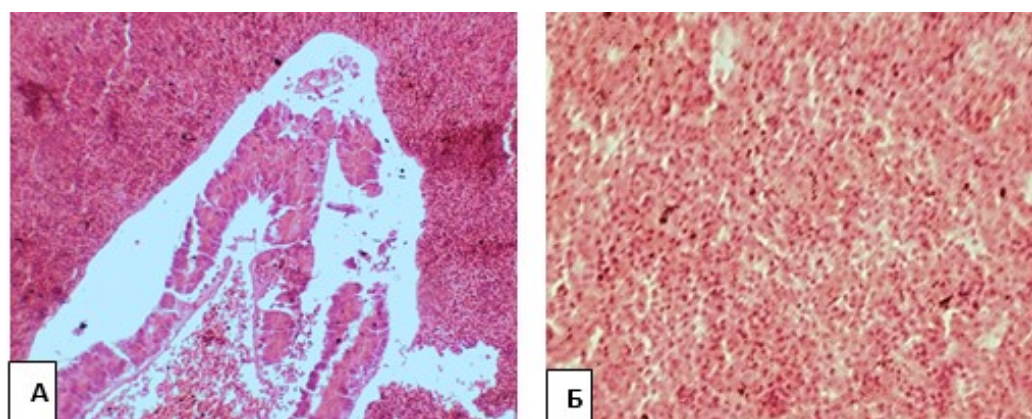


Рисунок 2 (А, Б) - Микрофотографии структуры печени карпа обыкновенного (*Cyprinus Carpio*) на 14 день:

А – Лизис гепатоцитов и разрушение центральной вены у особей контрольной группы. Б – Сохранная структура печени у рыб, получавших «Бацелл-М». Окраска гематоксилин-эозином, ув. x400.

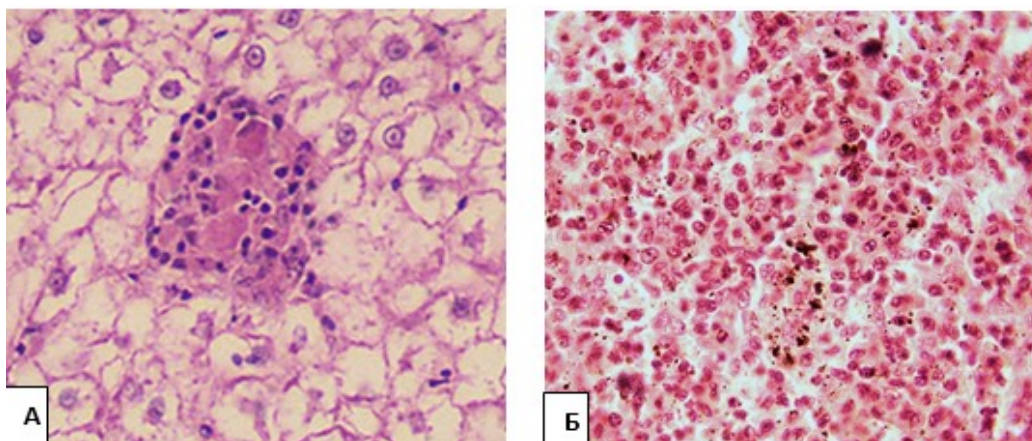


Рисунок 3 (А, Б) – Микрофотографии структуры печени карпа обыкновенного (*Cyprinus Carpio*) на 35 день:

А – Очаг воспалительных клеток у особей контрольной группы. Б – Сохранная структура паренхимы печени у рыб, получавших «Бацелл-М». Окраска гематоксилин-эозином, ув. х400.

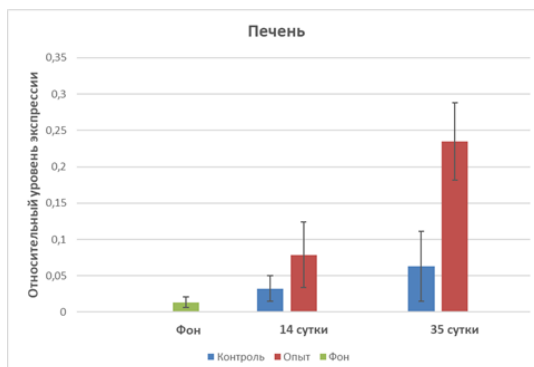


Рисунок 4 – Уровни экспрессии гена GPx-1 в печени карпа обыкновенного (*Cyprinus Carpio*) на 14 и 35 день.

Для оценки полученных результатов гистологического исследования печени карпа обыкновенного оценивали экспрессию гена GPx-1 (рисунок 4), который играет ключевую роль в поддержании клеточной защиты от окислительного стресса.

Фоновый уровень экспрессии отражает исходный уровень экспрессии гена в печени до начала эксперимента. Его крайне низкое значение – менее 0,02 – о том, что исследуемый ген в печени, вероятно, не является активно задействованным в нормальных физиологических условиях или включается только при

определённых стимулирующих факторах, таких как стресс.

Уровень экспрессии гена GPx-1 в опытной группе, получавшей пробиотик «Бацелл-М» на 14 и 35 сутки оказался выше, чем в контрольной группе, что свидетельствует о положительном влиянии пробиотика на антиоксидантную систему, способствуя активации гена GPx-1 и улучшению состояния печени на фоне жировой дистрофии. Михайлов Е.В. утверждает, что «Бацелл-М» способствует восстановлению микрофлоры кишечника и нормализации обменных процессов [11]. Поскольку печень тесно связана с метаболизмом и является важным орга-

ном для детоксикации, улучшение её состояния за счёт пробиотика может проявляться в повышении активности антиоксидантных ферментов, таких как глутатионпероксидаза-1.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Проведенный эксперимент показал, что использование пробиотика "Бацелл-М" положительно влияет на морфофункциональное состояние печени карпа обыкновенного. Пробиотик способствует сохранению структурной целостности печени, уменьшает воспалительные процессы и предотвращает повреждение тканей, что подтверждается гистологическими исследованиями. Оценка уровня экспрессии гена антиоксидантной системы GPx-1 так же подтвердила положительное влияние пробиотика на состояние печени карпа обыкновенного на фоне жировой дистрофии. Дальнейшие работы в данном направлении могут быть направлены на оценку долгосрочного влияния пробиотиков на другие органы и системы организма рыб, а также на разработку новых комплексных подходов к профилактике заболеваний в аквакультуре.

THE EFFECT OF THE PROBIOTIC "BACELL-M" ON THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Semenova E.V.* – graduate student, senior laboratory assistant at the laboratory of innovative drugs for recombinant proteomics (ORCID ID 0000-0003-3675-5467); **Strelnikov N.A.** – Junior researcher, Laboratory of Innovative Recombinant Proteomics. (ORCID ID 0000-0002-0781-7713); **Mikhailov E.V.** – Candidate of Veterinary Sciences, Senior researcher, Head of the Department of Experimental Pharmacology and Living Systems Functioning (ORCID ID 000-0001-54-57-1325).

All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy (ARVRIPP&T), Voronezh, Russia.

*elenasemyonova5@gmail.com

ABSTRACT

Fish farming is one of the important branches of agriculture. Success in this area largely depends on the efficiency of feed use, which makes rational feeding of fish one of the most important aspects of their breeding. The purpose of this study was to investigate the changes in the morphofunctional state of the liver in common carp (*Cyprinus carpio*) after the inclusion of the probiotic "Bacell-M" in the fish diet. During the experiment, market-size carp weighing 800-900 grams were used. For baseline research, biological material was collected from common carp across all experimental groups for cytomorphological analysis. The fish were divided into two main groups. The first group (control, n=600) received a standard diet, while the second group (n=600) was fed the same diet supplemented with the probiotic Bacell-M at a dose of 2 kg/ton for 30 days. Slaughter and biological sampling for all groups (n=6) were performed at two time points: 14 days and 35 days after the start of the experiment.

The results of the study demonstrated that the probiotic exerted positive effects, such as supporting the integrity of the liver's vascular and parenchymal structures, reducing lipid accumulation in hepatocytes, decreasing inflammatory infiltrates, and maintaining microcirculation within the liver. To assess these effects, we measured the expression of the GPx-1 gene, which plays a key role in cellular defense against oxidative stress.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Остроумова И. Н. Биологические основы кормления рыб / И. Н. Остроумова // СПб.: ГосНИОРХ -2001. -372 с. ISBN 978-5-91648-039-9
2. Шалгимбаева С. М. Изучение влияния продукционных кормов на микробиоценоз органов тилапии (*Tilapia*) в установках замкнутого водообеспечения / С. М. Шалгимбаева // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. - 2016. -№3.- С. 94-99. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-vliyaniya-produktsionnyh-kormov-na-mikrobiotsenoz-organov-tilyapii-tilapia-v-ustanovkah-zamknutogo->

vodoobespecheniya.

3. Михайлов Е.В. Морфофункциональное состояние печени маточного стада карпа обыкновенного (*Cyprinus carpio*) в период нереста / Е.В. Михайлов // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2022. – Т. 58. – С. 148-153. – DOI 10.52368/2078-0109-2022-58-4-148-153

4. Roh H. Overfeeding-Induced Obesity Could Cause Potential Immuno-Physiological Disorders in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) / H. Roh // Animals. – 2020. – №10. – P.1499. URL: <https://doi.org/10.3390/ani10091499>.

5. Engin S., Gurkan S. Cellular Changes in Liver Tissue of Adult Common Sole (*Solea solea* L. 1758) in the Aegean Sea, Turkey / S. Engin, S. Gurkan // Journal of Coastal Research. – 2024. – №40. – P. 740-748. URL: <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-23-00087.1>

6. Eriegha O. J. Histopathology of Selected Economically Important Fish Species from the Escravos Estuary, Nigeria: A Baseline Study for Environmental Monitoring / Eriegha O. J. // International Journal of Innovative Studies in Aquatic Biology and Fisheries. – №9. – 2024. – P. 1-8. DOI:10.20431/2454-7670.0901001.

7. Mišćević M. Effect of probiotics on the production of one-year old tench and common carp / M. Mišćević // Archiva Zootechnica. – 2012. – №15. – P. 69-76. URL: https://www.ibna.ro/arhiva/AZ%2015-4/AZ%2015-4_07_miscevic.pdf

8. Li X., Zheng S. Effects of dietary protein and lipid levels on the growth performance, feed utilization, and liver histology of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) / X. Li, S. Zheng // Amino Acids. – 2020. – №52. – P. 1043–1061. DOI: 10.1007/s00726-020-02874-9

9. Li X. Hepatic glucose metabolism and its disorders in fish / X. Li // Recent advances in animal nutrition and metabolism. – 2022. – № 1. – С. 207-236. DOI:10.1007/978-3-030-85686-1_11.

10. Neyrão I. M. Quantification of liver lipid deposition and melano-macrophages in lesser guitarfish *Zapteryx brevirostris* submitted to different feeding cycles / I. M. Neyrão //

Comparative Clinical Pathology. – 2019. – Т. 28. – С. 805-810. DOI:10.1007/s00580-019-02953-8

11. Оценка экспрессии генов и биохимических показателей крови карпа обыкновенного при применении пробиотика «Бацелл-М» в условиях антропогенного прессинга / Е. В. Михайлов, Н. В. Пасько, А. В. Голубцов и др. // Теория и практика инновационных технологий в АПК: материалы национальной научно-практической конференции (Воронеж, 1 марта-28 апреля 2023 г.): секция "Актуальные проблемы развития животноводства и ветеринарной медицины" (27-31 марта 2023 г.) / Воронежский государственный аграрный университет. — Воронеж, 2023. — Ч. I. URL: <http://elib.vsau.ru/main/last?page=47>

REFERENCES

1. Ostrooumova I. N. Biological principles of fish feeding / I. N. Ostrooumova // St. Petersburg: GosNIORH, 2001. – 372 p. ISBN 978-5-91648-039-9 (In Russ.)

2. Shalgimbaeva S. M. Study of the effect of production feeds on the microbiocenosis of tilapia organs (*Tilapia*) in recirculating aquaculture systems / S. M. Shalgimbaeva // Vestnik AGTU. Series: Fisheries. – 2016. – No. 3. – P. 94-99. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-vliyaniya-produktsionnyh-kormov-na-mikrobiotsenoz-organov-tilypii-tilapia-v-ustanovkakh-zamknutogo-vodoobespecheniya>. (In Russ.)

3. Mikhailov E.V. Morphofunctional state of the liver in broodstock of common carp (*Cyprinus carpio*) during spawning / E.V. Mikhailov // Scientific Notes of the Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine. – 2022. – Vol. 58. – P. 148-153. – DOI 10.52368/2078-0109-2022-58-4-148-153 . (In Russ.)

4. Roh H. Overfeeding-Induced Obesity Could Cause Potential Immuno-Physiological Disorders in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) / H. Roh // Animals. – 2020. – No. 10. – P. 1499. URL: <https://doi.org/10.3390/ani10091499>.

5. Engin S., Gurkan, S. Cellular Changes in Liver Tissue of Adult Common Sole (*Solea*

- solea L. 1758) in the Aegean Sea, Turkey / S. Engin, S. Gurkan // *Journal of Coastal Research*. – 2024. - No. 40. - P. 740-748. URL: <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-23-00087.1>.
6. Eriegha O. J. Histopathology of Selected Economically Important Fish Species from the Escravos Estuary, Nigeria: A Baseline Study for Environmental Monitoring / O. Eriegha // *International Journal of Innovative Studies in Aquatic Biology and Fisheries*. – 2024. - No. 9. - P. 1-8. DOI:10.20431/2454-7670.0901001
7. Mišćević M. Effect of probiotics on the production of one-year-old tench and common carp / M. Mišćević // *Archiva Zootechnica*. - 2012. - No. 15.- P. 69-76. URL: https://www.ibna.ro/arhiva/AZ%2015-4/AZ%2015-4_07_miscevic.pdf.
8. Li X., Zheng S. Effects of dietary protein and lipid levels on the growth performance, feed utilization, and liver histology of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) / X. Li, S. Zheng // *Amino Acids*. – 2020. - No. 52. – P.1043–1061. DOI: 10.1007/s00726-020-02874-9
9. Li, X. Hepatic glucose metabolism and its disorders in fish / X. Li // *Recent Advances in Animal Nutrition and Metabolism*. – 2022. - №1. – P. 207-236. DOI:10.1007/978-3-030-85686-1_11
10. Neyrão I. M. Quantification of liver lipid deposition and melano-macrophages in lesser guitarfish *Zapteryx brevirostris* subjected to different feeding cycles / I. M. Neyrão // *Comparative Clinical Pathology*. – 2019. - Vol. 28. – P. 805-810. DOI:10.1007/s00580-019-02953-8
11. Mikhailov E.V. et al. Assessment of gene expression and biochemical indicators in common carp under the influence of Bacell-M probiotic in anthropogenic stress conditions // *Theory and Practice of Innovative Technologies in Agriculture: Proceedings of the National Scientific-Practical Conference (Voronezh, March 1 - April 28, 2023): Section “Current Issues in Livestock and Veterinary Medicine” (March 27-31, 2023) / Voronezh State Agrarian University. Voronezh, 2023. Part I. URL: <http://elib.vsau.ru/main/last?page=47>. (In Russ.)*