

ВЛИЯНИЕ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭМБРИОТОКСИЧНОСТЬ ДАНИО РЕРИО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Н. В. БАРУЛИН, А. О. ЖАРИКОВА, А. О. ВОРОБЬЕВ,

*УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь, 213407*

И. Н. ДУБИНА

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063*

(Поступила в редакцию 20.01.2021)

Целью работы являлось изучение влияния различных дозировок фульвовой кислоты на модельный объект данио рерио и оценка эмбриотоксичности в эксперименте in vivo. Исследования проводились на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб». В ходе исследований было отобрано четыре опытные группы с различными концентрациями фульвовой кислоты (концентрации 0,1 % (опытная 1), 0,5 % (опытная 2), 1,0 % (опытная 3), 5,0 % (опытная 4)) и одна контрольная, в которую фульвовая кислота не добавлялась. В исследованиях регистрировались следующие параметры: выживаемость (эмбрионов в период инкубации, 7 суточных личинок, которые на стадии эмбрионов подвергались воздействию фульвовой кислоты, личинок перешедших на активное питание), средняя длина личинок, частота сердечных сокращений и активность кровотока в хвостовой вене, подвижность свободных эмбрионов в LDT тесте (общее проплываемое расстояние (мм), скорость подвижности (мм/с) свободных эмбрионов), гидрохимические параметры водной среды.

Проведенные исследования установили, что фульвовая кислота при внесении 60 %-го концентрата в инкубационные среды для эмбрионов модельного объекта данио рерио не оказывает эмбриотоксический эффект в дозировках 0,1–1 %. При дозировке 5 % был обнаружен эмбриотоксический эффект, который выражался в снижении выживаемости эмбрионов и личинок, а также в снижении двигательной активности свободных эмбрионов. Дозировки 0,1–0,5 % оказывают стимулирующее влияние личинок данио рерио в тесте на жизнестойкость.

Ключевые слова: *данио рерио, фульвовая кислота, выживаемость, эмбриотоксичность, жизнестойкость, поведение.*

The aim of the work was to study the effect of various dosages of fulvic acid on zebra fish used as a model and to evaluate the embryotoxicity in an in vivo experiment. The research was conducted on the basis of the Department of Ichthyology and Fish Farming in 2020, in the student research laboratory «Fish Physiology». As part of the study, four experimental groups with different concentrations of fulvic acid were selected (concentrations of 0.1 % (experimental 1), 0.5 % (experimental 2), 1.0 % (experimental 3), 5.0 % (experimental 4)) and one

control group to which fulvic acid was not added. The following parameters were recorded in the studies: survival (of embryos during incubation, of 7 day-old larvae exposed to fulvic acid at the embryo stage and larvae during initiation of active feeding), average length of larvae, heart rate and blood flow activity in the caudal vein, mobility of free embryos in the LDT test (total swimming distance (mm), mobility rate (mm / s) of free embryos), hydrochemical parameters of the aquatic environment.

The conducted studies have established that fulvic acid, when adding 60 % concentrate to the incubation media for the embryos of zebra fish used as a model, does not have an embryotoxic effect in dosages of 0.1–1 %. At a dosage of 5%, an embryotoxic effect was found. It was represented by a decrease in the survival rate of embryos and larvae, as well as by a decrease in the motor activity of free embryos. Dosages of 0.1–0.5 % have a stimulating effect on the larvae of zebra fish in the viability test.

Key words: zebra fish, fulvic acid, survival rate, embryotoxicity, viability, behaviour.

Введение. Рыбы являются удобным объектом исследований при изучении влияния различных факторов на физиологические процессы животных [12, 13, 14].

Популярная среди аквариумистов рыба данио [1] (*Danio rerio*, англ. *zebrafish*), получившая свое название благодаря полосатой окраске, в последние годы стала эффективной моделью в генетике, молекулярной биологии, экотоксикологии [2], эмбриологии, фармакологии, нейробиологии [3], аквакультуре [4]. Впервые этим организмом, как лабораторным объектом заинтересовался в 1960-х годах американский биолог Джордж Стрейзингер. Использование данио, как модельного организма (т. е. организма, с помощью которого можно моделировать биологические процессы), имеет множество преимуществ, включая удобство генетических манипуляций, а также свойственные этим рыбам наружное оплодотворение, ускоренное развитие, высокую фертильность и маленький размер (примерно 2,5–3,0 см во взрослом состоянии). Кроме того, они недороги и весьма просты в содержании и разведении в лабораторных условиях [5].

Основные органы у данио развиваются в течение пяти дней после оплодотворения, а уже через три месяца после рождения рыба способна к репродукции – всё это указывает на высокую скорость развития организма. В то же время данио рерио живут дольше, чем мыши. Следовательно, они могут служить отличным и экономным объектом для изучения биологии [5].

Данио рерио демонстрируют высокое физиологическое сходство с человеком в таких важных системах, как метаболическая, кровяная, сердечно-сосудистая и нервная. Столь большое сходство (гомология) позволяет использовать данио для широкого спектра практических задач, например, для создания экспериментальных моделей онкогенеза, васкуляризации, а также для скрининга новых препаратов *in*

vivo. Нейрохимические системы человека и данио рерио также поражают своим сходством, и, несмотря на очевидные различия в организации ЦНС, данио имеет много структур, функционально и морфологически сходных со многими зонами мозга грызунов и человека [5].

Если сравнить беспозвоночных (*Drosophila*), рыб данио рерио и мышей – наиболее распространенные объекты исследования в лабораториях – данио – по различным критериям, от сходства их биологии с другими организмами до затратности опытов с ними [5].

Фульвовая кислота (*fulvic acid, FA*) – это один из двух классов натурального кислотного органического полимера, который может быть извлечен (экстрагирован) из гумуса, обнаруженного в почве, осадке или водной среде. Его название происходит от латинского *fulvus*, обозначая его желтый цвет. Это органическое вещество растворимо в сильной кислоте (pH = 1) и имеет усредненную химическую формулу $C_{135}H_{182}O_{95}N_5S_2$ [6].

Благодаря высокой растворимости и относительно небольшой молекулярной массе фульвовые кислоты являются наиболее активным участником природных химических процессов. Имея небольшой размер (относительно гуминовых кислот), молекула фульвовой кислоты может работать как снаружи, так внутри клетки. В её составе порядка 74 органических минералов, 18 аминокислот и 10 витаминов. Все содержащиеся в ней минералы являются мельчайшими ионами, что и позволяет им легко усваиваться [6].

Широкое применение фульвовая кислота получила в медицине благодаря своему влиянию на организм человека. Основными положительными воздействиями являются: детоксикация, антиоксидантная активность, транспорт веществ, пребиотическая функция, защита от аллергенов, помощь в борьбе с вирусами [7].

В промышленном рыбоводстве специалисты часто прибегают к добавкам к воде на основе фульвовых кислот или, к продуктам на основе гуминовых веществ из сектора кормов для животных. Такие продукты особенно привлекательны для профилактики и лечения вторичных инфекций, поскольку выбор разрешенных фармацевтических препаратов в аквакультуре очень ограничен. Отсутствие лечебных и противопаразитарных веществ создало большой спрос на экологические и естественные альтернативы в аквакультуре и рыбоводстве. Один из возможных вариантов – фульвокислоты [8].

Преимущества применения гуминовых и фульвовых кислот в аквакультуре: увеличение выклева личинок за счет профилактической обработки икры и личинок рыб; улучшение роста и использования пищи;

повышение устойчивости к болезням, увеличение жизнестойкости, особенно во время транспортировки; более быстрое заживление зараженных эктопаразитами рыб с помощью терапевтических препаратов; подавление вспышек первичной инфекции с помощью профилактических средств, подавление вторичной инфекции; детоксикация вредных металлов и химикатов в воде; лечение гуминовой кислотой в концентрации 50–90 мг/л уменьшает болезненность и смертность; воздействие гуминовой кислоты в дозе 5 мг/л на икру радужной форели в течение часа защищает от микоза (грибковая инфекция, в основном вызываемая *Saprolegnia* и *Achyla sp.*) [9].

Биологические эффекты комплексных связей гуминовой и фульвовой кислот способны эффективно интенсифицировать обменные процессы в живом организме молоди рыб, ускоряя окислительно-восстановительные процессы, улучшая газообмен в тканях, увеличивая скорость свободно-радикального окисления, относясь к кислотам низкого молекулярного веса и могут активно связывать свободные радикалы, угнетают рост патогенных бактерий в желудочно-кишечном тракте, ускоряют переваривание белка с усвоением кальция, микроэлементов, питательных веществ, имеющих свойство образования пленки из тончайших частиц гуминовой кислоты, защищая воспаленную ткань эпителия и комплекса лимфатических желез – проникая в субэпителиальную ткань и способствуя их восстановлению. Связанные гуминовыми кислотами бактерии и токсины выводятся естественным путем [10].

Несмотря на перспективно положительные характеристики фульвовой кислоты, ее использование в области кормления рыб является малоизученным. Также открытым остается вопрос о дозировании данной кислоты при ее использовании в аквакультуре.

Целью наших исследований являлась оценка эмбриотоксичности различных дозровок фульвовой кислоты в эксперименте *in vivo*.

Основная часть. Исследования выполнялись на базе кафедры ихтиологии и рыбоводства в 2020 г., в студенческой научно-исследовательской лаборатории «Физиология рыб» (научный руководитель лаборатории – Барулин Н. В.). В качестве объектов исследований использовали данио рерио на стадии икры и на стадии свободного эмбриона, а также личинки перешедшие на активное питание. В эксперименте использовали 60 % концентрат фульвовой кислоты. Инкубацию эмбрионов осуществляли в 90 мм полистирольных чашках Петри. Температура инкубации эмбрионов составляла 27,5 °С. Объем инкубационной среды в каждой чашке Петри составлял 40 мл. В каждую

чашку Петри помещались по 30 экз. эмбрионов спустя 24 часа после оплодотворения. Дополнительно в инкубационные среды опытных групп перед началом инкубации вносился концентрат фульвово́й кислоты в дозировках, обеспечивающих концентрацию 0,1 % (опытная группа 1); 0,5 % (опытная группа 2); 1,0 % (опытная группа 3); 5,0 % (опытная группа 4) от исходного 60-го % концентрата фульвово́й кислоты. В контрольную группу фульвовая кислота не вносилась. Каждая опытная и контрольная группа имела дополнительно 2 дубликата. После внесения фульвово́й кислоты в опытные группы, ежедневно регистрировали выживаемость эмбрионов. После перехода эмбрионов из стадии икры, в стадию свободного эмбриона, осуществляли регистрацию частоты сердечных сокращений и активность кровотока в хвостовой вене при помощи биологического микроскопа и камеры для микроскопа Basler acA2040-55uc. Захват изображений осуществляли при помощи ПО pylonViewer, с дальнейшим обработкой видео на специализированном ПО DanioScope (Noldus). После перехода свободных эмбрионов на плав, осуществляли тестирование подвижности эмбрионов в LDT тесте (light dark test) в 96 луночном планшете с круглыми лунками. Запись подвижности эмбрионов осуществляли при помощи камеры Basler, снабженной инфракрасным фильтром и ПО pylon Viewer с дальнейшим анализом траекторий движения в ПО EthoVision XT (Noldus) в режиме DanioVision. Для статистической обработки использовали программу R с пакетами RCommander и др. [11]. В дальнейшем осуществляли контроль выживаемости и размерных показателей у личинок, перешедших на активное питание в обычных условиях, и в условиях теста на жизнестойкость (в условиях отсутствия аэрации, подмены воды, высоких концентрациях аммония, аммиака, нитритов, нитратов).

В результате проведенных исследований было установлено, что различные дозировки фульвово́й кислоты способны оказывать как отрицательный, так и положительный эффект на эмбрионы и личинки данио рерио в условия *in vivo*. Так, выживаемость в период инкубации эмбрионов в контрольной и в опытных группах 1–3 составила 100 %. В опытной группе 4 выживаемость эмбрионов составила 40 %. Исследования ЧСС и активности кровотока в хвостовой вене не выявили достоверных различий между исследуемыми группами (контроль, опытные группы 1–3). Исследования ЧСС и активности кровотока в хвостовой вене в опытной группе 4 не осуществлялись по причине задержки их эмбрионального развития.

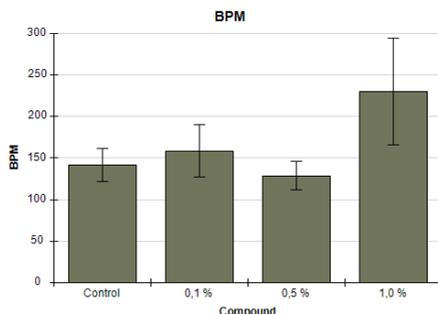
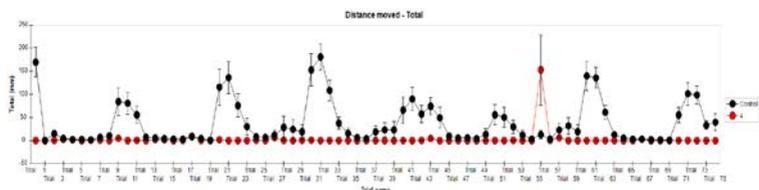


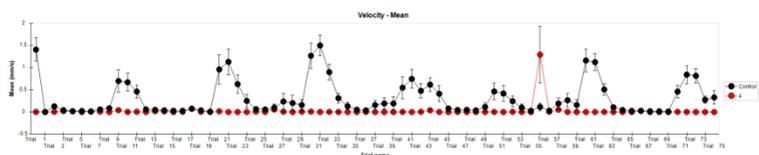
Рис. 1. Влияние фульвовой кислоты на частоту сердечных сокращений свободных эмбрионов данио рерио

Как видно из рис. 1, в опытной группе 3 происходило увеличение ЧСС. Однако статистический анализ не выявил достоверных различий.

Исследования подвижности свободных эмбрионов в LTD тесте установили достоверное снижение общего проплываемого расстояния и средней скорости подвижности в опытной группе 4 (рис. 2). В остальных группах не было установлено достоверных различий по отношению к контрольной группе.



а



б

Рис. 2. Влияние фульвовой кислоты на общее проплываемое расстояние (мм) (а) и скорость подвижности (мм/с) (б) свободных эмбрионов в LTD тесте (сравнение контрольной группы с опытной группой 4)

Как видно из рис. 2, свободные эмбрионы в контрольной группе хорошо реагировали на изменение светового режима. При выключении видимого света подвижность свободных личинок заметно активизировалась, что выражалось в колоколообразных кривых на графике

(trial 11 – 15; 21 – 25; 31 – 35; 41 – 45; 51 – 55; 61 – 65; 71 – 75), в отличие от опытной группы 4, свободные эмбрионы которой практически не реагировали на выключение видимого света.

Средняя скорость подвижности за весь период LTD теста при свете составила $0,092 \pm 0,016$ мм/с в контрольной группе и $0,052 \pm 0,026$ мм/с в опытной группе 4. Средняя скорость подвижности за весь период LTD теста в темноте составила $0,458 \pm 0,029$ мм/с в контрольной группе и $0,005 \pm 0,001$ мм/с в опытной группе 4 (рис. 3).

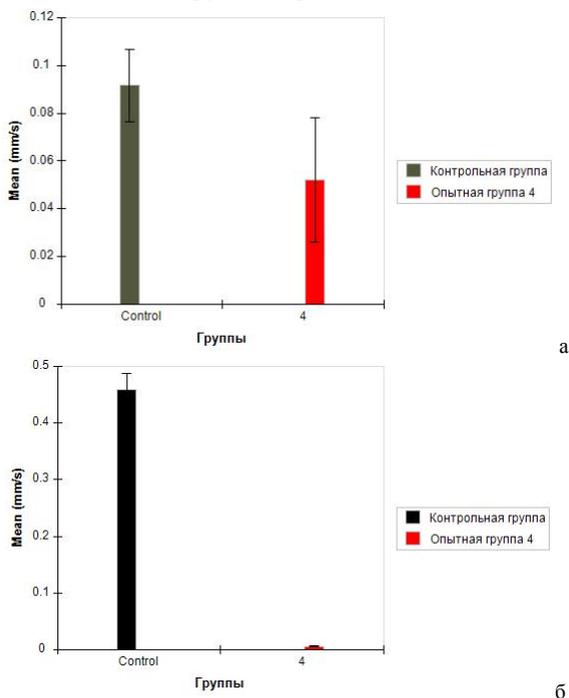


Рис. 3. Влияние фульвово́й кислоты на среднюю скорость подвижности (мм/с) при свете (а) и темноте (б) в LTD тесте (за весь период эксперимента)

Дальнейшие наблюдения за личинками, перешедшими на активное питание установили, что в опытной группе 4 происходило достоверное снижение выживаемости по отношению к контрольной группе, которое составило 30 % (75 % в контрольной группе). При этом в опытных группах 1 и 2 происходило достоверное повышение выживаемости, относительно контрольной группы – 90 и 85 %, соответственно

(табл. 1).

Таблица 1. **Выживаемость 7 суточных личинок данно рерио, которые на стадии эмбрионов подвергались воздействию фульвовой кислоты**

| Группа | Дозировка, % | Выживаемость, % |
|-----------|--------------|-----------------|
| Контроль | 0 | 75 |
| Опытная 1 | 0,1 | 90 |
| Опытная 2 | 0,5 | 85 |
| Опытная 3 | 1,0 | 75 |
| Опытная 4 | 5,0 | 30 |

Достоверных отличий между исследуемыми группами по средней длине обнаружено не было.

С целью исследования влияния фульвовой кислоты на жизнестойкость личинок, перешедших на активное питание в условиях отсутствия аэрации, подмены воды и высоких концентрациях азотных веществ (по причине использования сухих кормов), нами были сформированы исследуемые группы: контрольная, опытная 1 (внесение в воду 0,05 % фульвовой кислоты), опытная 2 (внесение в воду 0,1 % фульвовой кислоты), опытная 3 (внесение в воду 0,5 % фульвовой кислоты). В тесте на жизнестойкость, в опытных группах с дозировками внесения концентрата фульвовой кислоты 0,1 и 0,5 %, были продемонстрированы наибольшие показатели выживаемости личинок – 50 и 55 %, соответственно (достоверной разницы между этим группами обнаружено не было), тогда как в контрольной группе, а также в опытной группе с дозировкой концентрата 0,05 %, наблюдалась 100 % смертность личинок. В опытных группах в которых выжили личинки, достоверной разницы по средней длине не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 2. **Средняя длина личинок данно рерио, перешедших на активное питание в конце теста на жизнестойкость (в условиях отсутствия аэрации, подмены воды, высоких концентрациях аммония, аммиака, нитритов) под влиянием фульвовой кислоты**

| Группа | Mean±SE, мг | SD | CV, % |
|----------|-------------|------|-------|
| Группа 2 | 4,52±0,26 | 0,52 | 0,11 |
| Группа 3 | 4,59±0,42 | 1,11 | 0,24 |

Примечание: Mean – среднее значение длины, SE – стандартная ошибка среднего, SD – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации, %.

Такие результаты жизнестойкости под влиянием фульвовой кислоты можно объяснить ее потенциальными токсикорезистентными свойствами. Кроме того, повышение жизнестойкости опытных групп 2 и 3 в условиях высокой концентрации азотных веществ относительно контрольной группы и опытной группы 1 (0,05 %) можно объяснить тем, что под влиянием фульвовой кислоты происходило снижение рН, что

снижало долю NH_3 в соединении $\text{NH}_3\text{--NH}_4$.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования установили, что фульвовая кислота при внесении 60 %-го концентрата в инкубационные среды для эмбрионов модельного объекта данио рерио не оказывает эмбриотоксического эффекта в дозировках 0,1–1 %. При дозировке 5 % нами был обнаружен эмбриотоксический эффект, который выражался в снижении выживаемости эмбрионов и личинок, а также в снижении двигательной активности свободных эмбрионов. Дозировки 0,1–0,5 % оказывают стимулирующее влияние на личинок данио рерио в тесте на жизнестойкость. Мы полагаем, что такой эффект можно объяснить тем, что при добавлении фульвовой кислоты в воду происходило снижения токсичности азотных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nusslein-Volhard, C. The zebrafish issue of Development / C. Nusslein-Volhard. – Development. – 2012. – Vol. 139 (22). – P. 4099–4103.
2. Bioavailability of a natural lead-contaminated invertebrate diet to zebrafish / D. Boyle [et al.] – Environ Toxicol Chem. – 2010. – Vol. 29 (3). – P. 708–714.
3. Arrenberg, A. B. Integrating anatomy and function for zebrafish circuit analysis / A. B. Arrenberg, W. Driever // Front Neural Circuits. – 2013. – Vol. 7. – P. 74.
4. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species / R. Dahm, R. Geisler / Mar Biotechnol. – 2006. – Vol. 8 (4). – 329–345.
5. Троицкий вариант – Наука [Электронный ресурс] / Зебраданию потеснили мышшей и дрозофил в биомедицине. – Режим доступа: <https://trv-science.ru/2018/02/zebradanio-v-biomedicine/> – Дата доступа: 13.02.2021.
6. Britannica [Electronic resource]: Fulvic acid chemical compound. – Mode of access: <https://www.britannica.com/science/fulvic-acid>. – Date of access: 18.01.2021.
7. Арт Лайф [Электронный ресурс] / Чем полезна фульвовая кислота для человека. – Режим доступа: <https://www.artlife.ru/blog/zdorove/chem-polezna-fulvovaya-kislota-dlya-cheloveka?> – Дата доступа: 18.01.2021.
8. German technology. Humic substances based products [Electronic resource]: What fulvic acids do for your aquarium. – Mode of access: <https://www.humintech.com/livestock-breeding/blog/what-fulvic-acids-do-for-your-aquarium>. – Date of access: 20.01.2021.
9. Humic Substances (review series). Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding / T. Meinelt [et al.] // EnvSci Pollut. – Res. 15 (1). – P. 17–22.
10. Попов, В. И. Биологическая активность и биохимия гуминовых веществ. Часть 2. Медико-биологический аспект (обзор литературы) / В. И. Попов, В. Н. Зеленков, Т. В. Тепляков // Вестник Российской академии естественных наук. – 2016. – 16 (5). – 9–15.
11. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – 2017. – URL <https://www.R-project.org>.
12. Плавский, В. Ю. Роль поляризации и когерентности оптического излучения во взаимодействии со сперматозоидами осетровых рыб / В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сборник научных трудов / РУП «Институт рыбного хозяйства», РУП «Научно–практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», Белорусский государственный университет; под. общ.

ред. М. М. Радько. – Минск : РУП «Институт рыбного хозяйства», 2009. – Вып. 25. – С. 56–63.

13. Барулин, Н. В. Комплекс диагностического мониторинга физиологического состояния ремонтно-маточных стад осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения / Н. В. Барулин // Вестник Государственной полярной академии. – 2014. – № 1 (18). – С. 19–20.

14. Рекомендации по воспроизводству осетровых рыб в рыбоводных промышленных комплексах с применением инновационных методов / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки : БГСХА, 2016. – 204 с.