

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ФУЛЬВОВЫХ  
КИСЛОТ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ СЫРЬЯ  
НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ ДАНИО РЕРИО**

**Жарикова Анастасия Олеговна, аспирант,**

**Барулин Николай Валерьевич, доктор с.-х. н., доцент,**

**Белорусская государственная сельскохозяйственная академия**

Zharikova Anastasia, postgraduate, anastsiazh@gmail.com

Barulin Nikolai, Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor, barulin@list.ru

Belarusian State Agricultural Academy

**Аннотация.** В результате проведенных исследований установлено, что фульвовые кислоты из кукурузы и лигнита оказывают раздражающее воздействие на нервную систему эмбрионов и личинок данио рерио, что выражалось в увеличении количества толчков эмбрионами в STC-тесте и среднего количества проплываемого расстояния в LMR-тесте.

**Ключевые слова:** нейрофизиологические эффекты, фульвовая кислота, данио рерио, лигнит, кукурузное сырье, токсичность.

**Введение.** В современных исследованиях в области животноводства и аквакультуры активное внимание уделяется фульвовой кислоте (ФК) как эффективной добавке в корма. Её использование способствует улучшению качества производимой продукции и здоровья сельскохозяйственных животных [1].

ФК может быть получена из различных источников, включая лигнит – древесный материал, претерпевший угольный процесс под воздействием времени, давления и температуры [2]. Также современные технологии позволяют синтезировать ФК из растительного сырья, например, из кукурузы.

В этой связи вызывает интерес потенциальная возможность различных источников сырья, из которых изготавливают ФК, оказывать разный физиологический эффект. В наших предыдущих исследованиях нами было установлено, что между токсичностью ФК, полученных из лигнита и кукурузного сырья, существует разница [3].

В настоящее время тестирование различных эффектов воздействия химических веществ на человека и окружающую среду в значительной степени опирается на животные модели, такие как грызуны и взрослые рыбы. В качестве альтернативы, эмбрионы данио рерио оказались перспективной моделью благодаря своей способности предсказывать токсичность [4].

Потенциал выявления взаимодействия химических веществ с нервной системой с помощью поведенческих тестов на данио рерио был признан мировым сообществом. При этом наиболее часто используемые поведенческие тесты это: тест спонтанного сворачивания хвоста (spontaneous tail coiling, STC) и тест локомоторного ответа (locomotor response, LMR) [4].

**Цель работы** заключалась в изучении нейрофизиологических эффектов ФК, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на модельном объекте данио рерио.

**Материал и методика исследований.** Исследования выполнялись на кафедре ихтиологии и рыбоводства Белорусской государственной сельскохозяйственной академии.

В исследованиях использовали ФК, полученные из лигнита и кукурузного сырья. В качестве объектов исследований использовали эмбрионов и личинок данио рерио дикого типа в возрасте 6 – 144 часов после оплодотворения (hpf), находящихся на стадии икринки и, впоследствии, перешедших на активное питание.

Эмбрионы рыб получали от индивидуального нереста. Инкубацию осуществляли в 90 мм полистироловых чашках Петри, которые помещались в инкубаторы с системой охлаждения и нагревания. Температура инкубации эмбрионов составляла 27,5 – 28,0 °С. Объем инкубационной среды в каждой чашке Петри составлял 40 мл.

Приготовление концентраций ФК (как из лигнита, так из кукурузного сырья) в диапазоне 0 – 100 мг/л осуществлялось по следующей методике. Вначале приготавливался стоковый раствор в концентрации 2500 мг/л (100 мг сухой ФК в 40 мл EW). Затем из стокового раствора приготавливались растворы для экспозиции.

Экспозиционные растворы приготавливались перед непосредственным добавлением к эмбрионам и хранились в отдельных пробирках.

Через 6 часов после оплодотворения у собранных эмбрионов удалялись неоплодотворенные икринки. Затем эмбрионы переносились в отдельные емкости по 8 эмбрионов в 2-3кратной повторности для каждой концентрации. Далее у них оперативно удалялась вода и сразу добавлялся экспозиционный раствор соответствующей концентрации.

После этого, эмбрионы с каждой группы (концентрации) переносились в стандартный 96-ти луночный планшет: по одному эмбриону в каждую лунку вместе с 400 мкл экспозиционного раствора соответствующей концентрации. Переноска осуществлялась с помощью дозатора с регулируемым объемом 100 – 1000 мкл. Кончик наконечника отрезался ножницами, чтобы избежать травмирования эмбрионов. Затем эмбрионы в 96-ти луночном планшете перемещались в термостат для инкубации при температуре 27,5 – 28,0 °С. Замена экспозиционных растворов осуществлялась ежедневно.

Через 24 и 144 hpf эмбрионы проходили тестирование в тесте STC и в тесте LMR, соответственно. При STC-тесте, 96-луночный планшет с эмбрионами помещали на платформу с инфра-

красной подсветкой и затем накрывали затемненным боксом, поддерживающим температуру 28,0 °С. Видео активности эмбрионов записывали в течение 1 минуты в темноте, после 5 минут адаптации. После последнего измерения 96-луночный планшет с эмбрионами помещали в термостат для дальнейшей инкубации. Для проведения LMR-теста, 96-луночный планшет со свободными эмбрионами, также помещали на платформу с инфракрасной подсветкой и затем накрывали затемненным боксом, поддерживающим температуру 28,0 °С. Видеозаписи подвижности личинок записывали и анализировали с помощью программного обеспечения EthoVision XT в режиме DanioVision с использованием камеры микроскопа Basler, оснащенной инфракрасным фильтром. Интервал записи составлял 15 секунд.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Результаты изучения нейрофизиологических эффектов ФК, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на данио рерио представлены в таблицах 1 – 2.

Таблица 1. – Влияние ФК на среднее количество толчков (в % к контролю) эмбрионов данио рерио в возрасте 24 часа после оплодотворения в STC-тесте в зависимости от различных концентраций

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %	Стандартная ошибка среднего	Среднеквадратическое отклонение	р-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)
<b>«Кукурузная» ФК</b>				
0	100,0	16,1	61,5	-
10	85,1	17,6	68,1	0,994
20	123,8	15,0	82,6	1,000
30	167,9	24,2	70,1	0,090
40	232,8	19,4	105,5	<b>0,003</b>
50	181,7	20,5	92,9	0,080
60	225,5	18,2	93,8	<b>0,002</b>
70	187,0	20,9	87,4	0,052
80	207,3	16,5	98,1	<b>0,016</b>
90	190,0	10,8	81,1	<b>0,013</b>
100	101,5	16,1	50,7	1,000
<b>«Лигнитная» ФК</b>				
0	100,0	14,9	68,2	-
10	150,0	19,7	92,2	0,781
20	208,0	22,7	101,4	<b>0,024</b>
30	234,0	21,1	105,6	<b>0,002</b>
40	247,0	27,0	132,1	<b>0,003</b>
50	317,0	20,6	105,2	<b>&lt;0,001</b>
60	271,0	20,2	108,8	<b>&lt;0,001</b>
70	305,0	25,5	132,6	<b>&lt;0,001</b>
80	261,0	20,0	104,1	<b>&lt;0,001</b>
90	252,0	38,9	102,9	<b>0,047</b>
100	192,0	38,7	102,4	0,408

Примечание – Жирным шрифтом выделены достоверные различия

В результате изучения влияния «кукурузной» ФК было установлено, что под влиянием данной ФК происходило увеличение среднего количества толчков на 1,5 – 132,8 %, в зависимости от дозировки. При этом достоверное увеличение толчков эмбрионов было обнаружено в 4 из 10 дозировок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 40 мг/л. Усредненный эффект от всех дозировок составил 170,26 %.

Однако наиболее значимые эффекты в STC-тесте наблюдались при воздействии «лигнитной» ФК, под влиянием которой происходило увеличение толчков эмбрионов на 50 – 317 %, в зависимости от дозировки. При этом достоверное увеличение толчков эмбрионов было обнаружено в 8 из 10 дозирок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 50 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирок составил 243,7 %.

Таблица 2. – Среднее проплываемое расстояние (в % к контролю) личинками данио рерио в возрасте 144 часов после оплодотворения в LMR-тесте (световая фаза) в зависимости от различных концентраций

Группа (дозировка, мг/л)	Среднее значение, %	Стандартная ошибка среднего	Среднеквадратическое отклонение	p-уровень значимости (критерий Краскела-Уоллиса)
<b>«Кукурузная» ФК</b>				
0	100,0	14,33	157,0	-
10	60,3	8,63	94,5	0,426
20	91,7	9,57	104,8	0,867
30	90,0	11,06	121,2	1,000
40	159,3	19,71	215,9	0,382
50	87,8	10,98	120,2	0,998
60	118,2	12,05	132,0	0,245
70	53,8	8,79	96,3	<b>&lt;0,001</b>
80	101,7	13,67	149,8	0,998
90	118,6	10,54	115,5	<b>0,008</b>
100	125,4	13,92	152,5	0,999
<b>«Лигнитная» ФК</b>				
0	100,0	6,10	94,4	-
10	189,4	13,44	208,2	<b>0,016</b>
20	242,2	15,19	235,3	<b>&lt;0,001</b>
30	232,6	20,59	319,0	0,982
40	201,7	14,43	223,5	<b>0,046</b>
50	191,7	11,99	185,8	<b>&lt;0,001</b>
60	197,9	11,78	182,4	<b>&lt;0,001</b>
70	156,0	8,00	124,0	<b>&lt;0,001</b>
80	253,5	17,46	270,5	<b>&lt;0,001</b>
90	73,0	8,22	90,0	0,084

Примечание – Жирным шрифтом выделены достоверные различия

В результате изучения влияния «кукурузной» ФК на среднее проплываемое расстояние (в % к контролю) нами наблюдалось снижение эффекта на 46,2 %, а также увеличение эффекта на 59,3 %, в зависимости от дозирок. Однако, достоверные различия наблюдали в 2 из 10 дозирок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «кукурузной» ФК в концентрации 90 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирок составил 100,68 %.

В результате изучения влияния «лигнитной» ФК было установлено резкое увеличение среднего проплываемого расстояния личинками от 56,0 до 153,5 % (за исключением дозировки 90 мг/л). Наблюдали достоверные статистические различия в 7 из 9 дозирок. Максимальный статистически достоверный эффект наблюдался в группе, на эмбрионы которых воздействовали «лигнитной» ФК в концентрации 80 мг/л. Усредненный эффект от всех дозирок составил 193,11 %.

**Заключение.** В результате проведенных исследований осуществлено сравнение нейрофизиологических эффектов ФК, полученных из лигнита и стеблей кукурузы на модельном объекте данио

рерио. Установлено, что как кукурузная так и лигнитная ФК оказывают раздражающее действие на нервную систему эмбрионов и личинок данио рерио, что выражалось в увеличении количества толчков эмбрионами в STC-тесте и среднего количества проплываемого расстояния в LMR-тесте. Однако наиболее раздражающий эффект оказывает лигнитная ФК. Разница между усредненным для всех дозировок эффектом между кукурузной и лигнитной ФК составила: 1,4 раза в STC-тесте, 1,9 раз в световой фазе LMR-теста. Эти результаты, а также результаты полученные в ходе определения полулетальных доз ФК, полученной из лигнита и кукурузного сырья [3], являются доказательством того, что лигнитная ФК обладает более высоким раздражающим и токсическим эффектом. Это необходимо учитывать, при установлении и разработке дозировок ФК при использовании ее в качестве кормовой добавки в животноводстве и рыбоводстве.

#### **Список использованных источников**

1. Капитонова, Е. А. Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров при введении фульвокислоты в различных концентрациях / Е. А. Капитонова, П. В. Арефьев, Л. П. Мищенко // Зоотехническая наука Беларуси : сборник научных трудов. – 2021. – Т. 56, № 2 – С. 132–139.
2. Extraction of fulvic acid from lignite and characterization of its functional groups / G. Gong et al. // ACS omega. – 2020. – Vol. 5, № 43. – P. 27953–27961.
3. Жарикова, А. О. Определение полулетальной дозы (ЛД<sub>50</sub>) фульвовой кислоты, как потенциальной кормовой добавки в аквакультуре, полученной из лигнита и кукурузного сырья, на модельном объекте данио рерио / А. О. Жарикова, Н. В. Барулин // Современные достижения и актуальные проблемы животноводства : Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию биотехнологического факультета и кафедр генетики и разведения сельскохозяйственных животных, технологии производства продукции и механизации животноводства, кормления сельскохозяйственных животных, Витебск, 12–13 октября 2023 года. – Витебск: Витебская государственная академия ветеринарной медицины, 2023. – С. 200–204.
4. Барулин, Н. В. Современные методы использования данио рерио (zebrafish) для оценки нейротоксичности химических веществ / Н. В. Барулин // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии : Материалы VI Международного съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 09–11 июня 2022 года / Редколлегия: Н.И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск: Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2022. – С. 11–15.