

РОЛЬ СЕРОТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКЗОТРОФИИ У РЫБ

В. В. Кузьмина

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия,
e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

Введение

Регуляция экзотрофии – сложный процесс, находящийся под нейро-гуморальным контролем. Наиболее подробно исследована регуляция начального звена экзотрофии – пищевого поведения рыб (Кузьмина, 2005). Продемонстрировано участие в центральной регуляции пищевого поведения рыб различных гормонов и нейропептидов (De Pedro, Björnsson, 2001). Твердо доказано ингибирующее влияние на количество потребляемой рыбами пищи таких гормонов и пептидов, как гистамин, кортиколиберин, дофамин, серотонин, бомбезин, холецистокинин, а также стимулирующее действие галанина, нейропептида Y и β -эндорфина. Есть сведения об увеличении потребления пищи под влиянием гормона роста. Обсуждается влияние на этот процесс α -меланоцитстимулирующего и тиреотропного гормонов, глюкагона глюкагоно-подобного пептида -1, инсулиноподобного фактора-1, пептида YY, а также норадреналина, γ -аминомасляной кислоты, меланинконцирттрирующего гормона, тиреоидных гормонов, инсулина и лептина (Кузьмина, 2005). Вместе с тем роль моноаминов в регуляции пищевого поведения рыб изучена недостаточно. При исследовании влияния серотонина на потребление пищи карасем *Carassius auratus* выявлен аноректический эффект только в случае его центрального (интравентрикулярного) введения. Достоверный ингибиторный эффект при внутрибрюшинном введении 5-HT не обнаружен (De Pedro et al., 1998).

Вместе с тем серотонин может влиять на пищевое поведение не только как нейротрансмиттер, но и как гормон. Это предположение базируется на том, что значительная часть серотонина синтезируется в кишечнике рыб (Holmgren, Nilsson, 1983). Особо следует отметить, что тра-

диционно во всех известных работах учитывалось только количество потребляемой пищи. Вместе с тем изучение пищевого поведения должно по возможности охватывать все этапы этого процесса, в том числе двигательную активность. Сведения о влиянии серотонина на характеристики пищеварительных ферментов, реализующих центральный этап экзотрофии – процессы пищеварения у рыб в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы – изучения влияния периферически введенного серотонина на различные аспекты пищевого поведения и процессы пищеварения у рыб (на примере карпа).

Материал и методы

Работа проведена в течение 2009–2010 г.г. Объект исследования: карп обыкновенный *Cyprinus carpio* L. Масса тела $9,2 \pm 0,4$ г. До начала опыта рыб содержали в 200-литровых аквариумах с проточной водой. Рыб кормили ежедневно (5% от массы тела) кормом с преобладанием белковых компонентов (17,3% белка, 1,7% жира и 0,1% углеводов в расчете на сырой вес). Затем рыбы, разбитые на четыре экспериментальные группы (по 5 особей в каждой), были пересажены в непроточные аквариумы объемом 40 л (площадь дна 30 x 60 см) с принудительной аэрацией (температура воды $20 \pm 2^\circ\text{C}$). Режим освещенности – 6 ч «свет» (450 лк), 18 ч «темнота» (0,08 лк). Смену воды в аквариумах производили по мере ее загрязнения. За два дня до опыта рыб переставали кормить. Для моделирования бентосного типа питания рыб помещали в камеру из прозрачного оргстекла с перфорациями (стартовый отсек), размером 10 x 5 x 6 см, которую устанавливали у задней стенки аквариума. Передняя стенка камеры могла подниматься. У противоположной стенки аквариума помещали корм (30

экз. замороженных личинок хирономид, индивидуальная масса 7,5 мг). Когда передняя стенка камеры поднималась, рыбы могли выходить из камеры для поиска и потребления корма. Перед началом опытов рыб в течение двух недель приучали находить корм в описанных выше экспериментальных условиях. Регистрировали три параметра – время нахождения рыб в стартовом отсеке после подъема передней стенки камеры (t_1), время, необходимое для достижения рыбами корма – латентное время питания (t_2), величина которого обратно пропорциональна скорости пищевой реакции, а также рацион (R). В последнем случае учитывали количество съеденных личинок хирономид за 3 мин наблюдения. Наблюдения проводили 2 раза в сутки – в 9 и 14 ч на протяжении 3-х сут. За 1 ч до опытов рыбам контрольной группы внутрив брюшинно или внутримышечно вводили 0,1 мл раствора Рингера для холоднокровных животных (109 mM NaCl, 1,9 mM KCl, 1,1 mM CaCl₂, 1,2 mM NaHCO₃), рыбам опытной группы – равное количество гидрохлорида серотонина, производства Sigma, в дозе 10 мкг/г массы тела, приготовленного на том же растворе Рингера. В ряде опытов за 1 ч до введения серотонина рыбам вводили папаверин в дозе 0,02 мг/г массы тела.

Общую амилолитическую активность (суммарная активность α -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) определяли при помощи метода Нельсона в модификации А. М. Уголева и Н. Н. Иезуитовой (1969). Протеолитическую активность (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина по методу Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. Для определения амилолитической активности в качестве субстрата использовали 1% раствор растворимого крахмала (рН 7,4), протеолитической активности – 1% раствор казеина (рН 7,4). Инкубацию гомогената и субстрата осуществляли при температуре 20°C в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество глюкозы и тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани (мкмоль/г·мин. Для оценки влияния серотонина на состав жидких сред у рыб из хвостовых сосудов брали пробы крови. Концентрацию глюкозы в крови (ммоль/л) определяли при помощи аппарата Accu-Chek Active.

Данные обработаны статистически с использованием приложения EXCEL программы MS Office'XP. Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюденту при $p \leq 0,05$, в ряде случаев – при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, при том же уровне значимости.

Результаты

Важно отметить, что внутрив брюшинное введение серотонина приводит к изменению поведения рыб: через 1,5–2 мин после инъекции рыбы, всплывающие к поверхности воды, активно поглощают воздух и держатся в этом слое около 20–30 мин. Затем они постепенно опускаются в придонные слои воды, что характерно для рыб-бентофагов. К моменту начала регистрации пищевого поведения, рыбы опытной группы не отличаются по поведению от рыб контрольной группы. Поскольку известно о том, что серотонин является агонистом (стимулятором) 5-HT₂-рецепторов, локализованных в гладкой мускулатуре стенок сосудов, можно предположить, что серотонин, сужая сосуды и негативно влияя на стенку плавательного пузыря, ухудшает дыхательную функцию. Действительно, предварительное введение папаверина, обладающего спазмолитическим действием, снимает этот эффект.

Влияние внутрив брюшинных инъекций серотонина на пищевое поведение рыб. Данные, касающиеся времени пребывания в стартовом отсеке (t_1) рыб контрольной группы, получавших внутрив брюшинные инъекции раствора Рингера, свидетельствуют о достаточной стабильности показателя в течение 24 ч и последующем его снижении к концу эксперимента. В течение периода наблюдений значения t_1 изменялись от $1,3 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,4$ сек. У рыб опытной группы наблюдалось достоверное увеличение значений t_1 через 1, 5 и 53 ч (в последнем случае на 70%) после введения серотонина (рис. 1).

Данные, касающиеся латентного времени питания (t_2), свидетельствуют о еще большей стабильности показателя у рыб контрольных групп. В течение периода наблюдений значения t_2 изменялись от $2,9 \pm 0,3$ до $3,9 \pm 0,3$ сек. У рыб опытных групп наблюдался резкий подъем показателя через 1 ч после введения серотонина (до $14,3 \pm 5,5$ сек). Достоверное увеличение значений t_2 наблюдается через 5, 29 и 53 ч после введения серотонина (максимум на 110%). В последующие сроки на фоне снижения величины t_2 было отмечено колебательное изменение этого показателя. Важно отметить достоверное превышение уровня контроля почти во все сроки наблюдения.

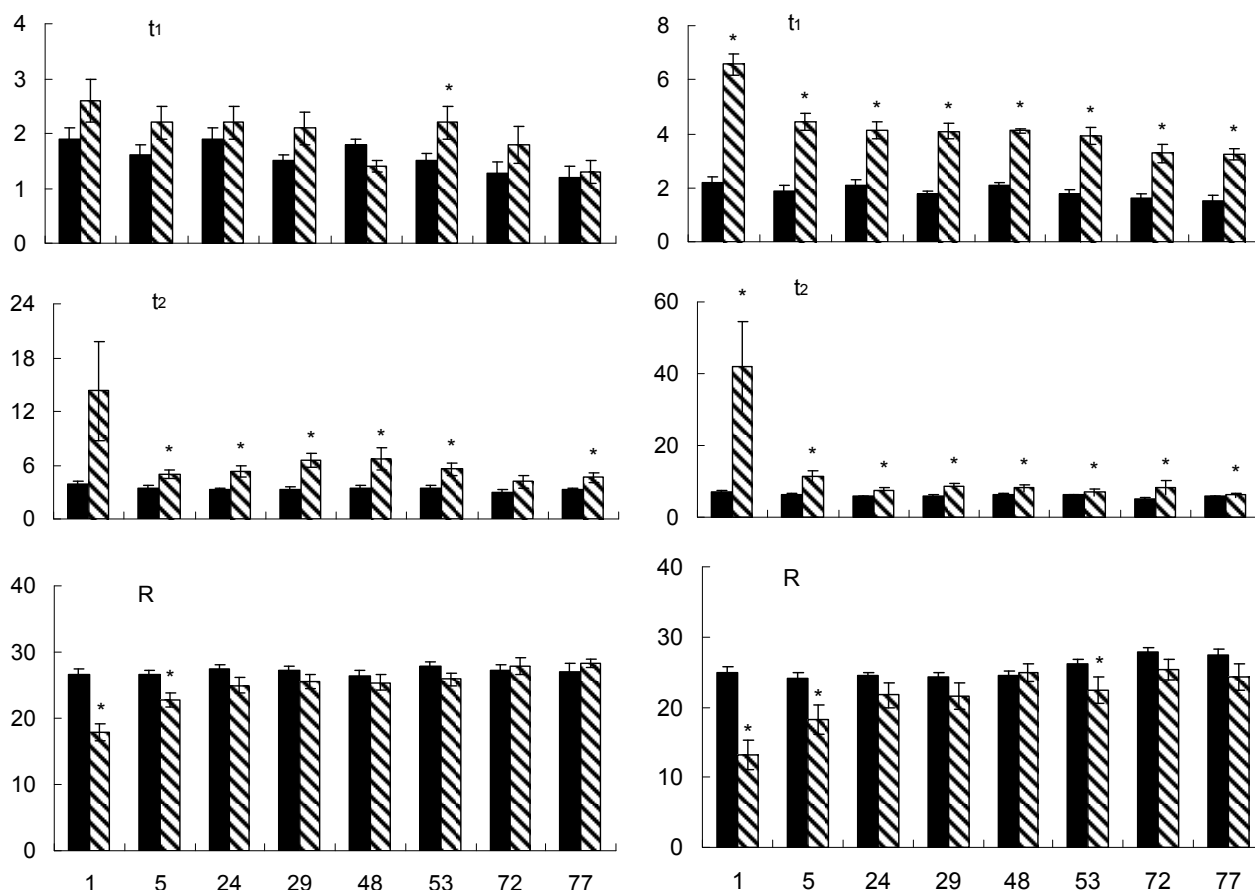


Рис. 1. Влияние периферически введенного серотонина на пищевое поведение карпа.

Обозначения: по горизонтали – время, ч, по вертикали – t1 и t2, сек, R – экз. личинок хирономид.

Слева – внутрибрюшинное введение серотонина, справа – внутримышечное

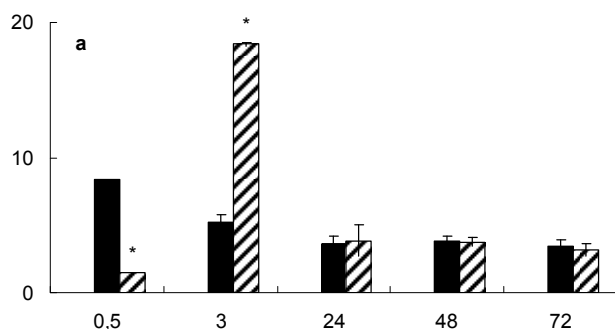
Данные, касающиеся рациона (R), также свидетельствуют о незначительной вариабельности показателя у рыб контрольных групп в течение периода наблюдений: значения изменялись от $26,4 \pm 0,8$ до $27,8 \pm 0,7$ экз. личинок хирономид. У рыб опытной группы при введении раствора Рингера наблюдалось значительное и достоверное снижение величины показателя через 1 ч после введения серотонина (до $17,9 \pm 1,3$ экз. личинок хирономид). Затем было отмечено некоторое увеличение значений R. Однако и через 5, и через 24 ч сохранялись достоверно более низкие по сравнению с контролем величины показателя: соответственно $22,8 \pm 1,1$ и $25,0 \pm 1,1$ экз. личинок хирономид. При этом максимальное снижение рациона не превышало 35%. В последующие сроки наблюдения величина R была близка таковой рыб контрольной группы.

Влияние внутримышечных инъекций серотонина на пищевое поведение рыб. При внутримышечном введении раствора Рингера время пребывания в стартовом отсеке (t1) рыб контрольной группы несколько отличалось от такового

при внутрибрюшинном введении. Значения t2 изменялись от $1,3 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,4$ сек. Однако у рыб опытной группы наблюдалось резкое достоверное увеличение значений t1 на всем протяжении эксперимента. Через 1 ч после введения серотонина величины t1 соответствовали $6,6 \pm 1,2$, в конце – $3,2 \pm 1,5$ сек. Время достижения кормового пятна (t2), у рыб контрольных групп колебалось от $2,9 \pm 0,3$ до $3,9 \pm 0,3$ сек. У рыб опытных групп наблюдался резкий достоверный подъем показателя через 1 ч после введения серотонина (до $41,9 \pm 12,6$ сек). В последующие сроки наблюдения значения t2 резко снижались, оставаясь, однако, достоверно выше уровня контроля.

Данные, касающиеся рациона (R), также свидетельствуют о незначительной вариабельности показателя в течение периода наблюдений у рыб контрольных групп: значения изменялись от $26,4 \pm 0,8$ до $27,8 \pm 0,7$ экз. личинок хирономид. У рыб опытной группы при введении серотонина наблюдалось значительное и достоверное снижение величины показателя через 1 ч после

введения (до $13,2 \pm 2,1$ экз. личинок хирономид). Несмотря на некоторое увеличение значений R, через 5 ч сохранялись достоверно более низкие по сравнению с контролем величины показателя ($18,1 \pm 2,1$ экз. личинок хирономид). В последующие сроки наблюдения величина R статистически не отличалась от таковой рыб контрольной группы, однако через 53 ч снова были выявлены достоверные различия (значения R соответствовали $22,4 \pm 1,9$ экз. личинок хирономид).



Влияние внутрибрюшинных инъекций серотонина на уровень гликемии у рыб. При введении серотонина уровень гликемии значительно изменяется (рис. 2). Так, у интактных рыб содержание глюкозы в крови соответствует $3,3 \pm 0,5$ ммоль/л. Через 0,5 ч после инъекции уровень гликемии снижается в 5,3 раза по сравнению с контролем (до 1,6 ммоль/л). Однако через 3 ч после введения серотонина уровень гликемии увеличивается в 11,5 раз (до 18,4 ммоль/л).

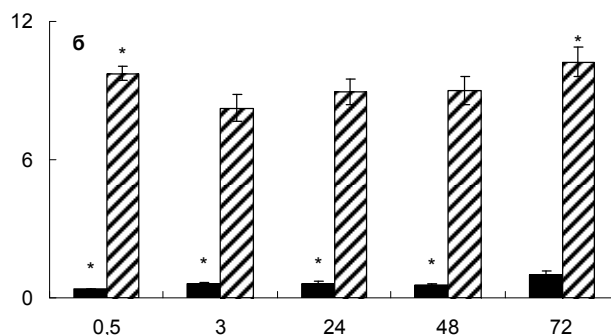


Рис. 2. Влияние внутрибрюшинно введенного серотонина на уровень гликемии (а) и активность пищеварительных гидролаз слизистой оболочки кишечника (б) карпа.

Обозначения: по горизонтали – время, ч, по вертикали на (а) темные столбики – контроль, заштрихованные – опыт, на (б) – активность протеиназ и гликозидаз соответственно

Влияние внутрибрюшинных инъекций серотонина на уровень протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб. Уровень активности протеиназ и гликозидаз у интактных рыб соответствует $1,0 \pm 0,1$ и $6,8 \pm 0,8$ мкмоль/г·мин. При этом коэффициент П/Г (активность протеиназ/активность гликозидаз) соответствует 0,15, что свидетельствует о значительно большей по сравнению с белками роли углеводов в пище карпов. Активность протеиназ после введения серотонина достоверно снижается почти во все сроки наблюдения – через 0,5, 3, 24 и 48 ч. Активность гликозидаз, напротив, возрастает, достоверно – через 0,5 и 72 ч после введения серотонина.

Обсуждение результатов

При анализе полученного материала следует отметить, что данной работе впервые получены данные, свидетельствующие не только о возможности достоверного снижения под влиянием периферически введенного серотонина количества потребляемой пищи, но и о его влиянии на двигательные реакции, активность пищеварительных гидролаз и уровень гликемии. В наиболее близкой по дизайну эксперимента работе (отличие – режим освещения, равный 12:12)

достоверное снижение количества потребляемой карасями пищи наблюдалось только при интравентрикулярном введении той же дозы препарата (De Pedro et al., 1998). Отсутствие эффекта при внутрибрюшинном введении серотонина по мнению авторов свидетельствовало о его участии лишь в центральной регуляции пищевого поведения рыб. Также важно подчеркнуть, что достоверный эффект серотонина в цитируемой работе был зарегистрирован только в первый срок после инъекции (2 ч). В более поздние сроки наблюдения (2–5 и 5–8 ч) снижения количества карасями потребляемой пищи не наблюдалось. При этом снижение количества потребляемой рыбами пищи, наблюдавшееся при интравентрикулярном введении той же дозы серотонина объяснялось посредничеством кортикотропин-релизинг-фактора (CRF), который осуществляет не только собственные аноректические эффекты, но и может участвовать в качестве медиатора в эффектах серотонина, активируя CRF-нейроны, ингибирующие в свою очередь серотонинергическую трансмиссию. При этом отсутствие эффекта при внутрибрюшинном введении серотонина объяснялось крайне слабым его проникновением через гематоэнцефалический барьер (De Pedro et al., 1998).

Однако в последние годы была доказана как возможность проникновения молекул серотонина из пищеварительного тракта в кровь, так и возможность преодоления ими гематоэнцефалического барьера (Rubio, 2006).

Не исключено, что в наших опытах, проводимых в условиях более слабой освещенности (450 и 0,08 лк, режим 5:18 ч) по сравнению с условиями эксперимента, проводимого на серебряном карасе (12:12 ч) (De Pedro et al., 1998), уровень собственного серотонина у всех исследованных групп рыб был понижен. Известно, что нормальная зона освещенности для роста карпа – 430–2200 лк (Ручин, 2001), а в природном водоеме на глубине 1 м освещенность колеблется от 6000 лк в ясный день до 3200 лк – в пасмурный (Кузнецов, Ручин, (2001). Возможно, в результате более слабой освещенности эндогенный серотонин не создавал конкуренцию экзогенному препарату, который мог, преодолевая гематоэнцефалический барьер, поступать в мозг и оказывать центральное влияние на пищевое поведение рыб. Косвенно об этом свидетельствует значительная вариабельность полученных нами результатов.

Однако для понимания механизма действия периферически введенного серотонина наиболее важными представляются сведения о том, что при введении препарата *per os* его уровень в плазме крови морского окуня *Dicentrarchus labrax* увеличивается от 3,5 нг/мл до 6,2 нг/мл, причем максимальный эффект достигается через 20 мин (Rubio, 2006). Следовательно, серотонин может преодолевать стенку пищеварительного тракта и с током крови попадать в другие органы. Эти факты дают основания полагать, что в регуляции потребления пищи у рыб участвуют как центральные, так и периферические механизмы. Это предположение подтверждается сведениями о том, что у млекопитающих серотонин действует как периферический посредник сытости. При этом в реализацию ингибиторного действия серотонина включены рецепторы двух типов – 5-HT_{1B} 5-HT_{2C} (Simansky, 1996). Более того, как указывалось во введении, в состав кишечного эпителия входят enteroхромаффинные клетки, вырабатывающие серотонин (Holmgren, Nilsson, 1983). Этот факт делает понятным то обстоятельство, что серотонин стимулирует секрецию ферментов поджелудочной железы, воздействует на моторику желудочно-кишечного тракта, а также, по-видимому, индуцирует эффекты гормонов. Возможность вовлечения инсулина в эффекты серотонина подтверждается двумя об-

стоятельствами. При введении рыбам инсулина не только выявлено дозозависимое снижение потребление пищи, но и отмечено значительное изменение уровня гликемии. Так, через 30 мин после введения серотонина уровень гликемии снижается в 5,3 раза по сравнению с контролем, что обычно наблюдается при введении инсулина. О вовлечении других гормонов в регуляцию гликемии свидетельствует колебательный характер ее изменения. Действительно, уже через 3 ч после введения серотонина уровень гликемии увеличивается в 11,5 раз. Этот факт может свидетельствовать об увеличении инкреции адреналина и кортизола, ингибирующее влияние которых на пищевое поведение рыб хорошо документировано. Вовлечение адреналина подтверждается наблюдающейся при этом дефекацией, обусловленной усилением моторики желудочно-кишечного тракта рыб. Также не исключено влияние серотонина на эффекты глюкагона, холецистокинина и мелатонина. На вовлечение гормонов указывает и тот факт, что в наших опытах наблюдалось колебательное пролонгированное влияние серотонина как на рацион рыб, так и на их двигательную активность. Помимо этого, опосредованное влияние на эффекты серотонина оказывает физиолого-биохимический статус рыб. В частности, в условиях голодания или недостаточного питания эффекты серотонина могут усиливаться.

Таким образом, на примере карпа впервые показано, что серотонин, введенный периферически (внутрибрюшинно или внутримышечно), пролонгированно влияет на различные аспекты пищевого поведения рыб: снижает уровень адаптивного любопытства, замедляет скорость пищевой реакции, а также уменьшает рацион рыб. Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности не только прямого, но и опосредованного влияния периферически введенного серотонина не только на пищевое поведение рыб, но и на активность пищеварительных гидролаз, а также обмен веществ. Полученные данные расширяют сведения о действии серотонина на различные характеристики пищевого поведения и пищеварения, существенно дополняя представления о роли этого моноамина в регуляции экзотрофии у рыб.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-04-00075) Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. А. Б. Ручину за консультативную, а П. В. Русановой – за техническую помощь.

Литература

- Гарина Д. В. Влияние глюкозы и некоторых гормонов на пищевое поведение рыб (на примере карася и карпа). Автореф. дис...канд. биол. наук. Борок, ИБВВ РАН. 2005. 20 с.
- Ручин А. Б. Особенности роста и энергетики карпа (*Cyprinus carpio*) при различной освещенности // Зоол. журн. 2001. Т. 80. № 4. С. 433–437.
- Кузнецов В. А., Ручин А. Б. Влияние колебаний рН и освещенности на рост и развитие озерной лягушки *Rana ridibunda* // Зоол. журн. 2001. Т. 80. Вып. 10. С. 1246–1251.
- Кузьмина В. В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. 2005. М.: Наука, 300 с.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. 1969. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л. Наука. С. 169–173.
- Anson M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. V. 22. P. 79–83.
- de Pedro N., Bjornsson B.T. Regulation of food intake by neuro-peptides and hormones // Food intake in fish. Ch. 12. Eds. Houlihan D., Boujard T., Jobling M. Blackwell Sci. 2001. P. 269–296.
- de Pedro N., Pinillos M.L., Valenciano A.I., Alonso-Bedate M., Delgado M.J. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: Involvement of CRF // Peptides. 1998. V. 19. № 3. P. 505–511.
- Holmgren S., Nilsson S. Bombesin-, gastrin/CCK-5-hydroxytryptamine-, neurotensin-, somatostatin-, and VIP-like immunoreactivity and catecholamine fluorescence in the gut of elasmobranch, *Squalus acanthias* // Cell Tissue Res. 1983. V. 234. P. 595–618.
- Rubio V.C., Sanchez-Vazquez F.J., Madrid J.A. Oral serotonin administration affects the quantity and the quality of macronutrients selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. // Physiol. Behavior. 2006. V. 87. P. 7–15.
- Simansky K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety // Behav. Brain Res. 1996. V. 73. P. 37–42.

THE ROLE OF SEROTONIN IN FISH EXOTROPHY REGULATION

V.V. Kuz'mina

I.D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia
e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

At the first time it was shown that serotonin injected peripherally, influence on various parameters of fish exotrophy. It decreases the level

of adaptive curiosity, the rate of feeding reaction and the ration as well as it changes the activity of some digestive enzymes.