

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПРОЦЕССЫ ЭКЗОТРОФИИ У КАРПА *CYPRINUS CARPIO*

© 2020 г. В. В. Кузьмина¹, *, Е. А. Куливацкая¹

¹Институт биологии внутренних вод РАН – ИБВВ РАН, Борок, Ярославская область, Россия

*E-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила в редакцию 06.08.2019 г.

После доработки 19.08.2019 г.

Принята к публикации 23.09.2019 г.

Впервые одновременно исследовано влияние мелатонина на начальное (питание) и центральное звено (пищеварение) экзотрофии у молоди карпа *Cyprinus carpio*. Изучено влияние внутрибрюшинных инъекций гормона в концентрации 100 и 200 нг/г массы тела на двигательную активность и потребление пищи, а также на активность пищеварительных ферментов в слизистой оболочке кишечника и химусе. Показано, что через 5 ч после введения гормона потребление пищи и активность пищеварительных ферментов в слизистой оболочке кишечника снижаются, тогда как двигательные реакции рыб и ферментативная активность химуса существенно не изменяются. Потребление пищи значительно (в 2.2 раза) сокращается в результате введения гормона в дозе 200 нг/г массы тела. Уровень казеинолитической и гемоглобинолитической активности пептидаз и амилолитической активности слизистой оболочки кишечника при этой дозе также значительно снижаются – соответственно на 27, 54 и 42% по сравнению с контролем. Введение мелатонина в дозе 100 нг/г вызывает незначительное снижение уровня ферментативной активности слизистой оболочки кишечника. Обсуждаются механизмы влияния мелатонина на процессы экзотрофии у рыб.

Ключевые слова: карп *Cyprinus carpio*, экзотрофия, пищевое поведение, пищеварение, пептидазы, слизистая оболочка кишечника, химус.

DOI: 10.31857/S004287522004013X

Мелатонин играет центральную роль в реализации суточных и годовых физиологических ритмов у рыб. Циркадианные ритмы мелатонина, формируемые чередованием света и тьмы, важны для потребления пищи, пищеварения, развития, размножения, роста, двигательной активности, пигментации кожи и других функций у рыб (Zhdanova et al., 2001; Maitra et al., 2006, 2015; Falcón et al., 2010; Zhdanova, 2011; Acuña-Castroviejo et al., 2014; Gupta, 2016; Ngasainao, Lukram, 2016). Кроме того, мелатонин является эффективным антиоксидантом, иммунологическим и антистрессовым фактором (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Conde-Sieira et al., 2014; Gupta, 2016; Jung et al., 2016; Mondal et al., 2017).

Секреция мелатонина осуществляется в эпифизе (шишковидной железе) в течение ночи, что приводит к повышению его уровня в крови и спинномозговой жидкости по сравнению с дневным периодом. Также важное место в организации циркадных ритмов рыб занимает сетчатка (Falcón et al., 2007, 2010). Фоторецепторы эпифиза, будучи структурными аналогами колбочек сетчатки, имеют сходный состав липидов и белков каскада фототрансдукции (опсин, трансду-

цин, аррестин, циклический нуклеотид). Их электрический ответ на световые раздражители также сходен (Falcón, 1999; Maitra et al., 2006; Falcón et al., 2010). Однако молекулярные часы рыб отличаются от таковых млекопитающих большим количеством генов криптохрома. Так, у данио *Danio rerio* клонированы семь генов криптохрома, составляющих две группы: одни имеют высокое сходство с таковыми млекопитающих, другие имеют более высокое сходство с генами дрозофилы *Drosophila melanogaster* (Kobayashi et al., 2000). Кроме того, мелатонин в значительных количествах синтезируется энтерохромаффинными клетками желудочно-кишечного тракта (Lepage et al., 2005; Maitra et al., 2015; Mukherjee, Maitra, 2015) и в меньшей степени – в других органах: печени, почках, клетках крови, гонадах и жабрах рыб (Falcón et al., 2010; Ngasainao, Lukram, 2016). При этом механизм синтеза мелатонина в кишечнике и эпифизе различен даже у одного и того же вида. Секреция мелатонина в желудочно-кишечном тракте, по-видимому, связана с частотой приёма пищи (Ngasainao, Lukram, 2016).

Наиболее подробно изучено влияние мелатонина на процессы размножения, что связано с

проблемами аквакультуры (Khan, Thomas, 1996; Maitra et al., 2006, 2015; Sébert et al., 2008; Mylonas et al., 2009; Falcón et al., 2010; Badruzzaman et al., 2013; Servili et al., 2013; Alvarado et al., 2015; Aripin et al., 2015; Gupta, 2016). При этом результаты, касающиеся влияния мелатонина на массу тела и скорость роста, у рыб разных видов довольно противоречивы (Falcón et al., 2010).

В ряде исследований установлено, что приём мелатонина может вызвать снижение потребления пищи (Falcón et al., 2010; Ngasainao, Lukram, 2016). Однако экспериментальных данных, подтверждающих гипотезу о прямой роли питания и его корреляции с системой желудочно-кишечного тракта рыб, немного. Так, при изучении влияния мелатонина и его аналога 2-йодомелатонина на потребление пищи золотой рыбкой *Carassius auratus* была выявлена зависимость от фотопериода. Установлено, что интрацеребровентрикулярное введение гормона и его аналога не влияет на потребление пищи рыбой, находящейся в условиях свет : темнота (12 : 12), ни днём, ни ночью. Однако внутрибрюшинные инъекции обоих индоловых аминов значительно снижают потребление пищи через 2, 5 и 8 ч после введения как в полдень, так и в полночь (Pinillos et al., 2001). У данио растворённый в воде мелатонин также значительно снижает потребление пищи через 5 ч по сравнению с контролем (Piccinetti et al., 2010a). У лаврака *Dicentrarchus labrax* перорально введённый мелатонин влияет не только на количество потребляемой пищи, но и на селективность в отношении макронутриентов, таких как белки, углеводы и жиры (Rubio et al., 2004). Кроме того, известно о влиянии внутрибрюшинных инъекций мелатонина на потребление пищи и двигательную активность рыб, различающихся по времени пищевой активности (“дневная” золотая рыбка и “ночной” линь *Tinca tinca*). Показано, что мелатонин снижает потребление пищи у обоих видов, но его влияние на двигательную активность зависит от времени введения (светлая или тёмная фаза) и характера активности этих видов. Однократное его введение золотой рыбке снижает потребление пищи в зависимости от режима освещения на 16 и 52%, двигательную активность — на 55 и 100%. У линя однократное введение мелатонина снижает потребление пищи как в светлую, так и в тёмную фазу соответственно на 29 и 37% (Lopez-Olmeda et al., 2006).

Имеются сведения, что мелатонин влияет на активность пищеварительных ферментов у разных видов рыб, однако эти данные несопоставимы из-за использования разных доз гормона и способов его введения. Трёхкратное внутрибрюшинное введение мелатонина (25, 50 мг) в течение недели через 60 сут незначительно снижает активность пищеварительных ферментов у мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis*. Низкая

доза гормона (25 мг) практически не влияет на активность протеазы, амилазы и липазы, но под влиянием его более высокой дозы (50 мг) активность этих ферментов снижается соответственно на 13.4, 11.8 и 28.7% (Panchal et al., 2018). Семидневная диета с добавлением разных концентраций мелатонина (0.002, 0.01, 0.05%) снижает активность щелочной протеазы и амилазы в среднем отделе кишечника атлантического лосося *Salmo salar* и кижуча *Oncorhynchus kisutch* (Mardones et al., 2018). У радужной форели *Oncorhynchus mykiss* пероральное введение мелатонина (0.2 г/кг) в течение 10 сут вызывает значительное повышение уровня мелатонина в плазме крови. При этом активность амилазы снижается в случае низкой дозы (0.04 г/кг) и повышается в случае высокой дозы (0.2 г/кг), активность протеаз возрастает также в случае более высокой дозы, а активность липазы не изменяется даже при использовании более высокой дозы гормона (Conde-Sieira et al., 2014). У лаврака ритм питания (дневной или ночной) значительно влияет на суточные паттерны пищеварительной функции (Del Pozo et al., 2012).

У молоди карпа *Cyprinus carpio* предшественник мелатонина — серотонин (5-НТ) — снижает двигательную активность и потребление пищи в условиях световой депривации по сравнению с контрольными рыбами, которым вводили 5-НТ в условиях переменной освещённости (Kuz'mina, 2018). У особей карпа, содержащихся в условиях длительной световой депривации (1 и 4 мес.), через 1 ч после введения 5-НТ двигательная активность снижается соответственно в 5.0 и 11.6 раза по сравнению с контролем. Значительное снижение потребления пищи через 1 мес. отмечено как в контроле, так и в эксперименте, через 4 мес. — только в условиях световой депривации. На основании полученных данных предполагается, что эффекты 5-НТ частично опосредованы влиянием мелатонина (Кузьмина, Гарина, 2019).

Цель работы — изучение влияния мелатонина на разные звенья экзотрофии: пищевое поведение и активность пищеварительных гидролаз (пептидаз и гликозидаз) в кишечнике карпа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Молодь карпа, выращенную в течение лета в пруду, в сентябре перевозили в лабораторию. До начала экспериментов рыб содержали в стеклянном аквариуме объёмом 200 л с проточной водопроводной водой (температура 18–20°C, pH 7.0–7.3, общая жёсткость 4.6 ммоль/л; Ca²⁺ — 3.1, Mg²⁺ — 1.5, Na⁺ — 2.0, K⁺ — 0.13, Cl[–] — 0.08, SO₄^{2–} — 0.19 ммоль/л) при естественном освещении. Кормили два раза в неделю *ad libitum*. Корм состоял из тщательно перемешанных в 7.5%-ном растворе желатина (200

мл) филе минтая (86 г) и измельчённого корма для форели (14 г). В январе рыб перенесли в четыре стеклянных аквариума (40 л, габариты дна 30 × 60 см) с непроточной водопроводной водой и принудительной аэрацией, температура 18–20°C. Дно аквариума было чистым и не структурированным. Аквариумы были освещены люминесцентными лампами, расположенными на стене на 45 см выше аквариумов. Фотопериод составлял: 8 ч свет (450 лк) и 16 ч – темнота (0.08 лк). Фильтрацию и аэрацию воды осуществляли с использованием фильтра FAN-1 Plus (“Aquael”, Польша), замену воды – один раз в неделю.

Исследовали влияние введённого внутрибрюшинно мелатонина на пищевое поведение (опыт 1) и на активность ферментов (опыт 2). Каждый опыт включал по два варианта доз гормона (200 и 100 нг/г массы тела) и два контроля к ним. В опыте 1 первоначальная масса рыб в контрольной и в экспериментальной группах составила соответственно 5.9 ± 0.3 и 5.9 ± 0.4 г (по 5 экз. в каждой), в опыте 2 – 6.4 ± 0.3 и 6.0 ± 0.5 г (по 10 экз.). Мелатонин (“Sigma”, США) растворяли в небольшом количестве этанола и затем разбавляли солевым раствором (20 мг Na_2CO_3 /100 мл 0.6%-ного NaCl) до конечных концентраций (200 и 100 нг/г массы тела). Опытным рыбам внутрибрюшинно вблизи брюшных плавников вводили 0.1 мл раствора мелатонина, контрольным – равный объём солевого раствора.

Рыб, предназначенных для изучения пищевого поведения, предварительно адаптировали к условиям эксперимента: в течение двух недель их кормили личинками хирономид *Chironomus* sp., которых помещали на дно возле передней стенки аквариума; затем в течение 13 сут ежедневно обучали питаться в экспериментальном аквариуме со стартовой камерой (см. ниже). После однодневного голодания рыбам внутрибрюшинно вводили мелатонин в дозе 200 нг/г массы тела и в течение 5 сут (через 5, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после инъекции) проводили опыты по изучению его влияния на пищевое поведение. Через 2 сут после окончания 1-го варианта опыта, когда рыбы не получали пищу, этим же особям внутрибрюшинно вводили мелатонин в дозе 100 нг/г массы тела (2-й вариант), после чего в течение 2 сут (через 5, 24 и 48 ч после инъекции) регистрировали пищевое поведение.

В качестве экспериментальной модели использован бентосный тип питания рыб (Kuz'mina, 2011). Каждую рыбу поочерёдно помещали в стартовую камеру (10 × 5 × 6 см) с перфорированными прозрачными пластиковыми стенками, установленную возле задней стенки аквариума. Передняя стенка камеры может подниматься. Корм (15 замороженных личинок хирономид, средняя индивидуальная масса 39.5 мг) помещали на

дно около передней стенки аквариума. После подъёма передней стенки стартовой камеры рыба может покидать её для поиска и потребления пищи. С помощью секундомера регистрировали время выхода из стартовой камеры после поднятия передней стенки (t_1 , с) и латентное время питания (t_2 , с), т. е. период, в течение которого рыба приближалась к корму. Этот параметр обратно пропорционален скорости пищевой реакции ($1/t_2$). Также учитывали число съеденных личинок хирономид за 3 мин наблюдения (R , экз.). Тестирование каждой особи требовало ~5 мин. Обучение рыб начинали проводить в 10 ч.

Рыб, использованных для изучения влияния мелатонина на активность пищеварительных ферментов, во время периода адаптации в опыте 1 к экспериментальным условиям кормили ежедневно в 16 ч влажным кормом (5% массы тела), как указано выше. Гормон им вводили в тех же дозах и в то же время. Материал брали через 5 ч. Рыб быстро вылавливали из воды и обездвигивали, перерезая спинной мозг. Затем рассекали брюшную полость. Кишечник изымали и помещали на стекло ледяной бани, удаляли влагу фильтровальной бумагой, очищали от жира и делали продольный разрез. Химус осторожно собирали с помощью специального скребка и небольшого стеклянного шпателя. Затем слизистую оболочку кишечника осушали фильтровальной бумагой, тщательно собирали пластиковым скребком и быстро взвешивали. Аликвоту (~ 0.1 г) слизистой оболочки гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 9 объёмах охлаждённого раствора Рингера (3–4°C) для пойкилотермных животных (103 ммоль/л NaCl, 1.9 ммоль/л KCl, 0.45 ммоль/л CaCl_2 , 1.4 ммоль/л MgSO_4 , pH 7.4); гомогенаты разбавляли раствором Рингера в 10 раз. Конечное разведение гомогенатов составляло 1 : 99. Затем гомогенаты доводили до pH 7.4 при помощи pH-метра Basic 20 (“Crison”, Испания).

Активность пептидаз оценивали по увеличению концентрации тирозина с использованием в качестве субстрата (10 г/л) казеина (казеинолитическая активность) или гемоглобина (гемоглинолитическая активность), приготовленных на растворе Рингера. Для определения концентрации тирозина 0.5 мл субстрата и 0.5 мл гомогената инкубировали в течение 30 мин при температуре 20°C, pH 7.4. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0.3 N трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Через 10 мин инкубационную смесь фильтровали с использованием бумажного фильтра. Затем смешивали 0.25 мл фильтра, 2 мл 0.5 N NaOH, 0.25 мл 0.025 N CuSO_4 и 0.75 мл реактива Фолина, разведённого в три раза *ex tempore*. Для определения исходного содержания тирозина в пробах (фон) ТХУ прибавляли к гомогенату до добавления субстрата. Другие операции были идентич-

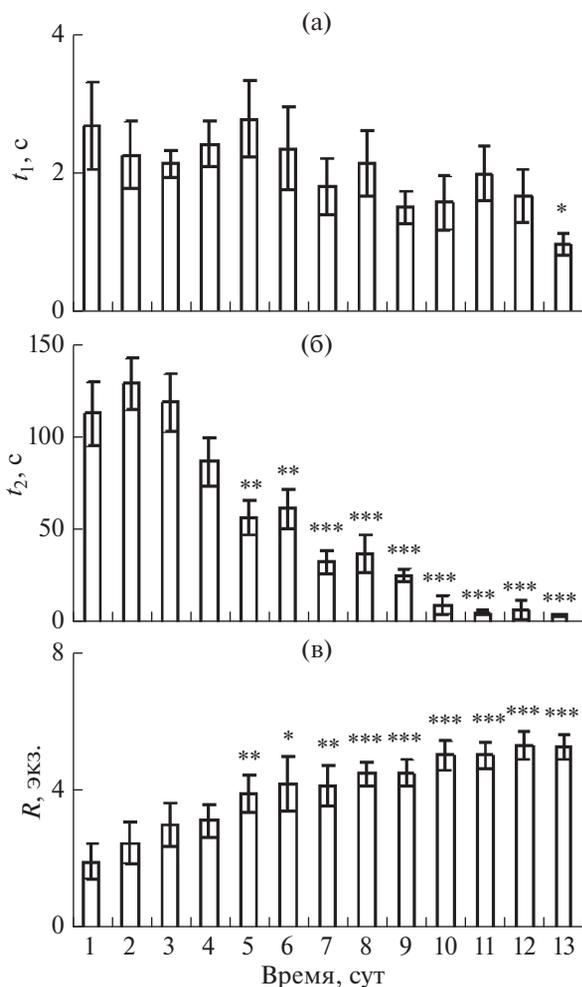


Рис. 1. Изменения параметров пищевого поведения молоди карпа *Cyprinus carpio* ($n = 10$ экз.) в течение тренировочного периода: а – время выхода рыб из стартовой камеры (t_1), б – латентное время питания (t_2), в – число потреблённых личинок хирономид за 3 мин наблюдения (R); (□) – среднее значение, (I) – ошибка среднего; отличия от первых суток наблюдения достоверны при p : * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001 .

ными. Концентрацию тирозина в пробах определяли через 30 мин. Активность гликозидаз (преимущественно активность α -амилазы, ЕС 3.2.1.1, глюкоамилазы, ЕС 3.2.1.3 и мальтазы, ЕС 3.2.1.20) оценивали по методу, предложенному Уголевым и Иезуитовой (1969). В качестве субстрата использовали раствор растворимого крахмала (10 г/л, рН 7.4), приготовленный на растворе Рингера. Интенсивность окраски измеряли с помощью фотокolorиметра КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) при 670 нм. Активность ферментов определяли в двух повторностях с учётом фона (изначальное количество тирозина и гексоз в пробе) и выражали в мкмоль/(г · мин).

Результаты статистически обработаны с использованием стандартного пакета программ (Microsoft Office 2007, приложение Excel) и представлены как

среднее значение и его ошибка. Достоверность различий оценивали с использованием критерия Стьюдента для малых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние мелатонина на пищевое поведение рыб. Динамика t_1 в течение периода обучения рыб имела зигзагообразный характер (рис. 1а). Рыбы обычно покидали камеру в течение 2 с. Величина t_2 (рис. 1б) за 13 сут уменьшилась в 22.7 раза (от 113.4 ± 17.9 до 5.0 ± 0.4 с). Значение R (рис. 1в), напротив, увеличилось в пять раз (от 1.92 ± 0.5 до 5.24 ± 0.4 экз.).

В первом варианте опыта (доза мелатонина 200 нг/г массы тела) в течение 5 сут значения t_1 у рыб контрольной и опытной групп изменялись так же, как и в период обучения (рис. 2). Значение t_2 у контрольных рыб незначительно изменялось (от 8.1 ± 2.2 до 7.5 ± 1.9 с), а у опытных снизилось в 2.3 раза (от 9.8 ± 2.4 до 4.2 ± 0.8 с); при этом через 5 ч после введения гормона значения t_2 были выше, чем у контрольной группы рыб, всего в 1.2 раза (рис. 2в). Значение R у контрольных рыб за период наблюдений сократилось в 1.4 раза (от 6.2 ± 0.6 до 4.5 ± 1.1 экз.), а у опытных, наоборот, возросло в 1.9 раза (с 2.8 ± 1.2 до 5.3 ± 1.7 экз.); причём через 5 ч после введения мелатонина количество потребляемой пищи было меньше в 2.2 раза ($p < 0.05$), чем в контроле (рис. 2д).

Во втором варианте опыта (доза мелатонина 100 нг/г массы тела) в течение 48 ч значения t_1 и t_2 у особей контрольной группы были значительно ниже, чем в первом варианте. Значения t_1 через 5, 24 и 48 ч после введения гормона были выше, чем у контрольных рыб, соответственно в 2.0, 1.4 и 1.5 раза (рис. 2б). Значения t_2 у опытных рыб также были выше: через 5 и 48 ч после введения мелатонина соответственно в 1.6 и 1.8 раза (рис. 2г). Значение R за период наблюдений, как и в первом варианте опыта, у контрольных рыб уменьшилось в 1.4 раза (от 5.0 ± 0.6 до 3.7 ± 1.1 экз.), а у опытных повысилось в 1.4 раза (от 3.6 ± 0.4 до 5.2 ± 0.9 экз.); однако через 5 ч после введения мелатонина значения R были ниже, чем в контроле, лишь в 1.4 раза (рис. 2е).

Влияние мелатонина на активность ферментов кишечника рыб. Через 5 ч после введения дозы гормона 200 нг/г массы тела активность всех изученных ферментов в слизистой оболочке была достоверно ниже, чем у контрольных рыб: казеинолитическая и гемоглобинолитическая активности пептидаз соответственно на 27.0 и 54.4%, амилолитическая активность – на 42.2% (таблица). Через 5 ч после введения меньшей дозы (100 нг/г массы тела) пептидазная и амилолитическая активности также снижались, однако отличия от контроля были недостоверны. Влия-

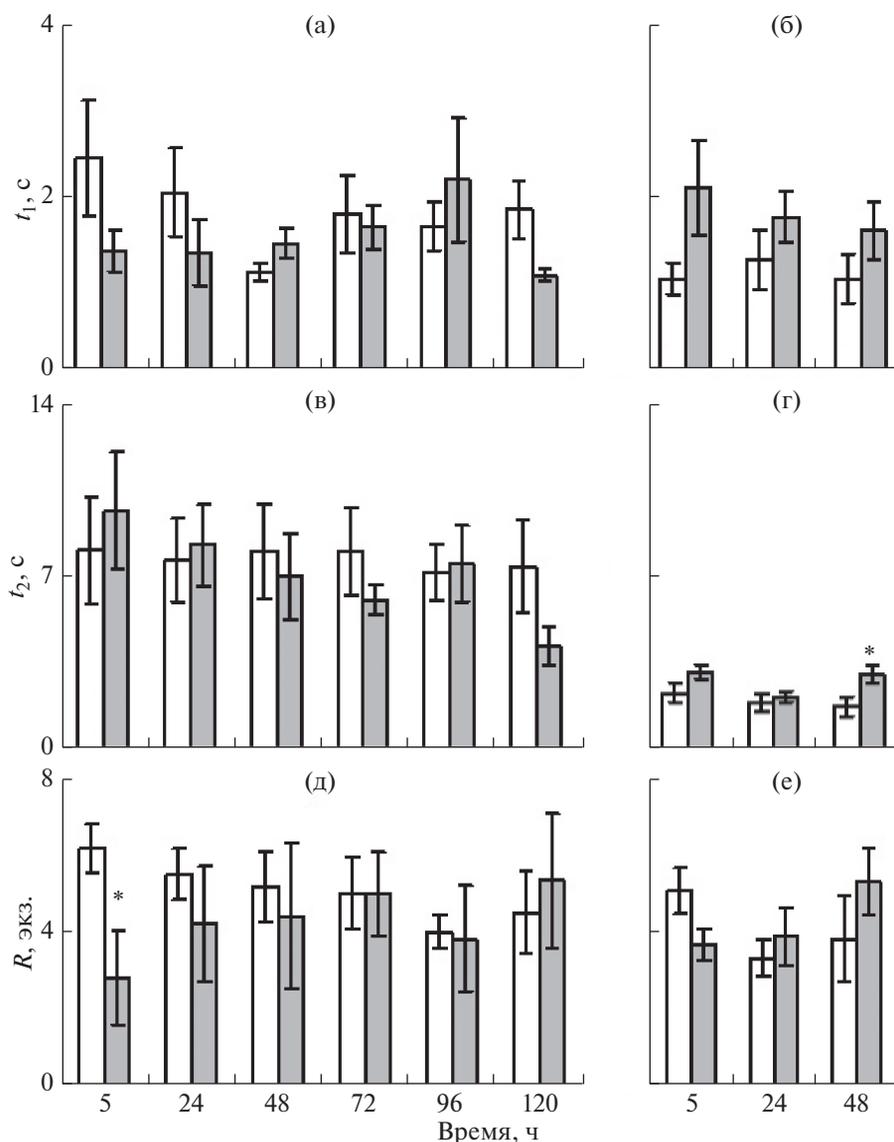


Рис. 2. Влияние введённых внутривнутрибрюшинно доз мелатонина 200 (а, в, д) и 100 (б, г, е) нг/г массы тела на пищевое поведение молоди карпа *Cyprinus carpio* ($n = 5$ экз.): а – время выхода рыб из стартовой камеры (t_1), б – латентное время питания (t_2), в – число потреблённых личинок хирономид за 3 мин наблюдения (R); (□) – контроль, (■) – опыт; ост. обозначения см. на рис. 1.

ние мелатонина на уровень ферментативной активности химуса не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные в значительной степени близки результатам изучения влияния мелатонина на потребление пищи золотой рыбкой (Pinillos et al., 2001). Мы подтвердили снижение потребления пищи у карпа через 5 ч после его введения. Во многом это может быть связано с тем, что мы использовали аналогичный метод исследования. В работе, выполненной на данио, снижение потребления пищи также наблюдали через 5 ч после

введения мелатонина (Piccinetti et al., 2010a). Все указанные виды рыб относятся к одному семейству – Cyprinidae. Не исключено, что 5 ч – время максимального влияния гормона на пищевое поведение рыб и оно характерно для многих видов.

Механизмы, опосредующие ингибирующее действие мелатонина на потребление пищи, не совсем ясны. Некоторые авторы предполагают, что этот эффект может быть связан с его седативным действием на локомоторную активность, обнаруженным у нескольких видов рыб (Zhdanova et al., 2001, 2002). Например, добавление его в воду ингибирует двигательную активность личинок данио на 50% (Zhdanova et al., 2001). Была высказана гипотеза о

Влияние введённого внутривнутрибрюшинно мелатонина на активность ферментов слизистой оболочки кишечника и химуса молоди карпа *Cyprinus carpio*, мкмоль / (г · мин)

Активность	Доза мелатонина, нг/г массы тела			
	200		100	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
	Слизистая оболочка кишечника			
Казеинопептидазная	11.63 ± 1.15*	15.90 ± 0.58	6.61 ± 0.96	10.40 ± 1.91
Гемоглинолитическая	0.89 ± 0.10***	1.95 ± 0.15	1.60 ± 0.29	2.15 ± 0.19
Амилитическая	10.00 ± 1.34**	17.34 ± 0.76	10.19 ± 0.65	12.94 ± 1.49
	Химус			
Казеинопептидазная	6.65 ± 0.72	6.66 ± 1.30		
Гемоглинолитическая	2.37 ± 0.20	2.25 ± 0.15		
Амилитическая	12.63 ± 1.75	12.31 ± 1.37		

Примечание. Отличия от контроля достоверны при p : * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001.

том, что мелатонин может прямо или косвенно изменять секрецию других гормонов, участвующих в контроле приёма пищи (Le Bail, Voeuf, 1997). Предполагалось, что аноректическое действие мелатонина может сочетаться с действием 5-НТ. Это предположение хорошо согласуется с данными о том, что интрацеребровентрикулярные инъекции 5-НТ оказывают аноректическое действие на золотых рыбок (De Pedro et al., 1998), а внутривнутрибрюшинные инъекции 5-НТ вызывают снижение не только потребления пищи, но и двигательной активности у карпа (Кузьмина, Гарина, 2013). Кроме того, известно, что добавление мелатонина (10^{-12} – 100 мкмоль) в условиях *in vitro* ослабляет стимулированные ацетилхолином и 5-НТ полоски кишечника золотой рыбки. Результаты этого исследования указывают на наличие базального нитрегергического тонуса в кишечнике, где мелатонин оказывает кальцийзависимое, независимое от оксида азота, расслабляющее действие на серотонинергическое и холинергическое сокращения (Velarde et al., 2011).

Поскольку хроническое введение мелатонина значительно снижает норадренергический метаболизм и вызывает изменения ряда других показателей в гипоталамусе и плазме крови золотой рыбки, было высказано предположение о том, что он частично влияет на энергетический баланс через взаимодействие с катехоламиновой системой гипоталамуса (Rubio et al., 2004). Позже было показано, что его введение особям указанного вида модулирует норадренергический метаболизм в гипоталамусе, а также снижает темп увеличения массы тела и удельную скорость роста (De Pedro et al., 2008). У карпа после введения мелатонина увеличивается концентрация дофамина в гипоталамусе, причём только в летний период, что указывает на его сезонное влияние на дофаминергическую систему (Poprek et al., 2006).

Установлены взаимодействия между мелатонином и гипокретин–орексиновой системой (Zhdanova, 2011). У взрослых особей данио обнаружено значительное снижение основных орексигенных сигналов в головном мозгу под влиянием мелатонина (100 нмоль/л и 1 мкмоль/л); гормон вызывал значительное снижение экспрессии мРНК грелина (более чем в два раза), нейропептида Y (~ в четыре раза) и каннабиноидных рецепторов CB1 (~ в шесть раз) по сравнению с контролем (Piccinetti et al., 2010a). Добавление в воду эндоканнабиноидного анандамина повышает уровень мелатонина в мозгу дорады *Sparus aurata* почти в 1000 раз; при этом потребление пищи, уровни мРНК нейропептида Y и каннабиноидных рецепторов CB1 в мозгу рыб также значительно увеличиваются (Piccinetti et al., 2010b). Кроме того, мелатонин участвует в периферических цепях, регулирующих аппетит, а также в обмене веществ (Piccinetti et al., 2013).

Влияние мелатонина на активность пищеварительных ферментов исследовано меньше, чем на пищевое поведение. В отличие от мелатонина эпифиза, выделяемого в ночной период, мелатонин кишечника выделяется в дневное время (Falcón et al., 2007). Исследование его уровня у карпа показало, что независимо от времени года и суточных колебаний освещённости пик синтеза мелатонина в каждом сегменте кишечника наблюдается в середине дня (Mukherjee et al., 2014). Именно поэтому мы исследовали влияние мелатонина на активность пищеварительных ферментов в светлый период. Данные, касающиеся влияния гормона на активность пищеварительных ферментов слизистой оболочки, в основном сходны с результатами, полученными ранее. Как внутривнутрибрюшинные инъекции мелатонина (Panchal et al., 2018), так и его пероральное введение (Conde-Sieira et al., 2014; Mardones et al., 2018) снижают активность пептидаз и гликозидаз у рыб. Отсут-

ствии влияния мелатонина на ферменты химуса подтверждает представления о том, что гормон действует паракринно в пределах границы щёточной каймы энтероцитов.

Механизм действия мелатонина на желудочно-кишечный тракт изучен в меньшей степени, чем на мозг. В то же время были предложены некоторые возможные механизмы его действия. Бубеник и Панг (Bubenik, Pang, 1994) выдвинули гипотезу, согласно которой в желудочно-кишечном тракте поддерживается равновесие благодаря существованию обратной связи между мелатонином и 5-НТ. Также предполагается, что у рыб, как и у млекопитающих, он может действовать как местный регулятор ткани желудочно-кишечного тракта, в частности, при снижении тонуса кишечника (Harlow, Weekly, 1986). Эти гипотезы могут объяснить отсутствие эффекта при его центральном введении и признать мелатонин в качестве периферического сигнала сытости (Pinillos et al., 2001). Как и в случае центральной регуляции пищевого поведения рыб, мелатонин может прямо или косвенно изменять секрецию других гормонов, участвующих в контроле потребления пищи (Le Bail, Voeuf, 1997). Наконец, важную роль может играть нервная система. Благодаря висцеральным афферентам и различным рецепторам информация о процессах в пищеварительном тракте постоянно поступает в мозг. Важно, что после приёма пищи сигналы сытости (холецистокинин, 5-НТ, бомбезин, глюкагоноподобный пептид-1, пептид YY и амилин) действуют совместно с *p. vagus* (Кузьмина, 2019). При этом наибольшее количество 5-НТ выявляется в переднем отделе кишечника рыб, а его высокая концентрация в кишечнике в основном обусловлена серотонинергическими нервными волокнами, высокая плотность которых наблюдается в стенке кишечника (Саатаño-Tubío et al., 2007).

Предполагается, что верхний сегмент желудочно-кишечного тракта, как и у млекопитающих, может выделять мелатонин в ответ на приём пищи, действующий как сигнал, регулирующий аппетит, в то время как в нижних отделах он может действовать через рецепторы для синхронизации процессов питания и пищеварения (Rubio et al., 2004). Важным сигналом для синтеза мелатонина является наличие пищи (Herrero et al., 2007). При этом у золотых рыбок уровень гормона в желудочно-кишечном тракте после кормления высокий, независимо от режима питания или случайного кормления (Vera et al., 2007). Следовательно, эффекты кишечного мелатонина могут быть реализованы в результате взаимодействия нервной системы с эндокринными сигналами сытости, которые действуют на местном и центральном уровнях.

Эти результаты подтверждают предположение о том, что мелатонин входит в сложную сеть сигналов, которые регулируют потребление пищи и играют ключевую роль в центральной и периферической регуляции аппетита (Piccinetti et al., 2010b). При этом влияние мелатонина на питание и двигательную активность может быть независимым. Влияние мелатонина на питание рыб может быть опосредовано локальным действием гормона в желудочно-кишечном тракте, а на двигательную активность может быть опосредовано через его влияние на циркадианную систему, поскольку эти эффекты в большей степени зависят от условий освещения (Lopez-Olmeda et al., 2006).

Таким образом, результаты нашего исследования указывают на сходный характер влияния мелатонина на начальное и центральное звено экзотрофии у карпа, т.е. на процессы питания и пищеварения. Через 5 ч после внутрибрюшинного введения гормона уменьшается как потребление пищи, так и активность пищеварительных ферментов в слизистой оболочке кишечника, тогда как двигательные реакции рыб и ферментативная активность химуса существенно не изменяются. Потребление пищи значительно (в 2.2 раза) сокращается в результате введения гормона в дозе 200 нг/г массы тела. Уровень казеинолитической и гемоглинолитической активности пептидаз и амилитической активности слизистой оболочки кишечника при той же дозе также значительно снижаются — соответственно на 27, 54 и 42% по сравнению с контролем. Введение гормона в дозе 100 нг/г вызывает незначительное снижение уровня ферментативной активности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012690102-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кузьмина В.В. 2019. Механизмы регуляции пищевого поведения рыб // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. Т. 55. № 1. С. 3–13.
<https://doi.org/10.1134/S0044452919010078>
- Кузьмина В.В., Гарина Д.В. 2013. Влияние периферически введенного серотонина на пищевую и двигательную активность карпа *Cyprinus carpio* L. // Биология внутр. вод. № 1. С. 73–81.
<https://doi.org/10.7868/S0320965213010087>
- Кузьмина В.В., Гарина Д.В. 2019. Пищевое поведение рыб: влияние долговременной световой депривации на эффекты серотонина у карпа *Cyprinus carpio* L. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. Т. 55. № 6. С. 425–432.
<https://doi.org/10.1134/S0044452919030094>
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. 1969. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследования

- ние пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука. С. 169–173.
- Acuña-Castroviejo D., Escames G., Venegas C. et al.* 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions // *Cell. Mol. Life Sci.* V. 71. P. 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Alvarado M.V., Carrillo M., Felip A.* 2015. Melatonin-induced changes in kiss/gnrh gene expression patterns in the brain of male sea bass during spermatogenesis // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 185A. P. 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.03.010>
- Aripin S.A., Jintasataporn O., Yoonpundh R.* 2015. Effects of exogenous melatonin in *Clarias macrocephalus* male broodstock first puberty stage // *J. Aquac. Res. Devel.* V. 6. P. 307–313. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000307>
- Badruzzaman M., Vapary M.A., Takemura A.* 2013. Possible roles of photoperiod and melatonin in reproductive activity via changes in dopaminergic activity in the brain of a tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea* // *Gen. Comp. Endocrinol.* V. 194. P. 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.09.012>
- Bubenik G.A., Pang S.F.* 1994. The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation and food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback // *J. Pineal Res.* V. 16. P. 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1994.tb00088.x>
- Caamaño-Tubío R.I., Pérez J., Ferreir S., Aldegund M.* 2007. Peripheral serotonin dynamics in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 129C. P. 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.017>
- Conde-Sieira M., Muñoz J.L., López-Patiño M.A. et al.* 2014. Oral administration of melatonin counteracts several of the effects of chronic stress in rainbow trout // *Domest. Anim. Endocrinol.* V. 46. P. 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.10.001>
- De Pedro N., Pinillos M.L., Valenciano A.I. et al.* 1998. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF // *Peptides.* V. 19. P. 505–511. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(97\)00469-5](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(97)00469-5)
- De Pedro N., Martínez-Alvarez R.M., Delgado M.J.* 2008. Melatonin reduces body weight in goldfish (*Carassius auratus*): effects on metabolic resources and some feeding regulators // *J. Pineal Res.* V. 45. P. 32–39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00553.x>
- Del Pozo A., Vera L.M., Montoya A., Sanchez-Vazquez F.J.* 2012. Daily rhythms of blood glucose differ in diurnal and nocturnal European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) undergoing seasonal phase inversions // *Fish Physiol. Biochem.* V. 106. P. 446–450. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9732-z>
- Falcón J.* 1999. Cellular circadian clocks in the pineal // *Prog. Neurobiol.* V. 8. P. 121–162.
- Falcón J., Besseau L., Sauzet S., Bœuf G.* 2007. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish // *Trends Endocrinol. Metab.* V. 18. P. 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.01.002>
- Falcón J., Migaud H., Muñoz-Cueto J.A., Carrillo M.* 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish // *Gen. Comp. Endocrinol.* V. 165. № 3. P. 469–482. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.026>
- Gupta B.B.P.* 2016. Comparative endocrinology of the pineal organ: structural evolution, regulation and function // *Updates on integrative physiology and comparative endocrinology* / Eds. Haldar Ch. et al. Varanasi: Publ. Cell, Press and Publ. Division Banaras Hindu Univ. P. 297–328.
- Harlow H.J., Weekly B.L.* 1986. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of *in vitro* rat small and large intestine // *J. Pineal. Res.* V. 3. P. 277–284. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1986.tb00750.x>
- Herrero M.J., Martínez F.J., Míguez J.M., Madrid J.A.* 2007. Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptophan and melatonin // *J. Comp. Physiol.* V. 177B. P. 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00360-006-0131-6>
- Jung S.J., Choi Y.J., Kim N.N. et al.* 2016. Effects of melatonin injection or green-wavelength LED light on the antioxidant system in goldfish (*Carassius auratus*) during thermal stress // *Fish Shellfish Immunol.* V. 52. P. 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.002>
- Khan I.A., Thomas P.* 1996. Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* V. 104. P. 231–242. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0166>
- Kobayashi Y., Ishikawa T., Hirayama J. et al.* 2000. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family two types of cryptochromes present in zebrafish // *Gen. Cells.* V. 5. P. 725–738. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00364.x>
- Kuz'mina V.V.* 2011. The influence of zinc and copper on the latency period for feeding and the food uptake in common carp *Cyprinus carpio* L. // *Aquat. Toxicol.* V. 102. № 1–2. P. 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.018>
- Kuz'mina V.V.* 2018. Feeding behavior of fish. Influence of light deprivation on the effects of serotonin in carp *Cyprinus carpio* L. // *Adv. Biol. Earth Sci.* V. 3. № 2. P. 101–106.
- Le Bail P.Y., Boeuf G.* 1997. What hormones may regulate food intake in fish? // *Aquat. Liv. Resour.* V. 10. P. 371–379. <https://doi.org/10.1051/alr:1997041>
- Lepage O., Larson E.T., Mayer I., Winberg S.* 2005. Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout // *J. Pineal Res.* V. 38. P. 264–271. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00201.x>
- Lopez-Olmeda J.F., Madrid J.A., Sanchez Vazquez F.J.* 2006. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench) // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 144A. № 2. P. 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.031>
- Maitra S.K., Seth M., Chatteraj A.* 2006. Photoperiod, pineal photoreceptors and melatonin as the signal of photoperiod in the regulation of reproduction in fish // *J. Endocrinol. Reprod.* V. 10. № 2. P. 73–87.
- Maitra S.K., Mukherjee S., Hasan K.N.* 2015. Melatonin: endogenous sources and role in the regulation of fish reproduction // *Indoleamines: sources, role in biological processes and health effects* / Ed. Catalá Á. N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc. P. 43–77.
- Mardones O., Devia E., Labbé B.S. et al.* 2018. Effect of L-tryptophan and melatonin supplementation on the sero-

- tonin gastrointestinal content and digestive enzymatic activity for *Salmo salar* and *Oncorhynchus kisutch* // *Aquaculture*. V. 482. P. 203–210.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.003>
- Mondal P., Hasan K.N., Pal P.K., Maitra S.K. 2017. Influences of exogenous melatonin on the oocyte growth and oxidative status of ovary during different reproductive phases of an annual cycle in carp *Catla catla* // *Triogenology*. V. 87. № 1. P. 349–359.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.021>
- Mukherjee S., Maitra S.K. 2015. Gut melatonin in vertebrates: chronobiology and physiology // *Front Endocrinol*. V. 6. Article 112.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00112>
- Mukherjee S., Moniruzzaman M., Maitra S.K. 2014. Daily and seasonal profiles of gut melatonin and their temporal relationship with pineal and serum melatonin in carp *Catla catla* under natural photo-thermal conditions // *Biol. Rhythm Res*. V. 45. P. 301–315.
<https://doi.org/10.1080/09291016.2013.817139>
- Mylonas C.C., Fostier A., Zanuy S. 2009. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction // *Gen. Comp. Endocrinol*. V. 5. № 3. P. 516–534.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2009.03.007>
- Ngasainao M.R., Lukram I.M. 2016. A review on melatonin and its prospects in fish // *Res. Rev. J. Zool. Sci*. V. 4. № 3. P. 34–41
- Panchal R., Rani S., Poonam, Manju. 2018. A comparative study of growth, metabolism and digestive enzyme activities of pinealectomized and non-pinealectomized catfish (*Heteropneustes fossilis*) // *Int. J. Zool. Appl. Biosci*. V. 3. № 2. P. 239–244.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1314522>
- Piccinetti C.C., Migliarini B., Olivotto I. et al. 2010a. Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio* // *Hormon. Behav*. V. 58. P. 780–785.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.013>
- Piccinetti C.C., Migliarini B., Petrosino S. et al. 2010b. Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish // *Gen. Comp. Endocrinol*. V. 166. № 2. P. 259–267.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2009.09.017>
- Piccinetti C.C., Migliarini B., Olivotto I. et al. 2013. Melatonin and peripheral circuitries: insights on appetite and metabolism in *Danio rerio* // *Zebrafish*. V. 10. № 3. P. 275–282.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0844>
- Pinillos M.L., De Pedro N., Alonso-Gomez A.L. et al. 2001. Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*) // *Physiol. Behav*. V. 72. P. 629–634.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00399-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00399-1)
- Popek W., Luszczyk-Trojnar E., Drog-Kozak E. et al. 2006. Effect of melatonin on dopamine secretion in the hypothalamus of mature female common carp, *Cyprinus carpio* L. // *Acta Ichthyol. Piscat*. V. 36. P. 134–141
- Rubio V.C., Sánchez-Vázquez F.J., Madrid J.A. 2004. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) // *J. Pineal Res*. V. 37. № 1. P. 42–47.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00134.x>
- Sébert M.E., Legros C., Weltzien F.A. et al. 2008. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function // *J. Neuroendocrinol*. V. 20. P. 917–929.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01744.x>
- Servili A., Herrera-Pérez P., del Carmen Rendón M., Muñoz-Cueto J.A. 2013. Melatonin Inhibits GnRH-1, GnRH-3 and GnRH Receptor Expression in the Brain of the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* // *Int. J. Mol. Sci*. V. 14. № 4. P. 7603–7616.
<https://doi.org/10.3390/ijms14047603>
- Velarde E., Alonso-Gómez A.L., Azpeleta C. et al. 2011. Melatonin effects on gut motility are independent of the relaxation mediated by the nitrergic system in the goldfish // *Comp. Biochem. Physiol*. V. 159A. № 4. P. 367–371.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.01.024>
- Vera L.M., De Pedro N., Gómez-Milán E. et al. 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish // *Physiol. Behav*. V. 90. P. 518–524.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.10.017>
- Zhdanova I.V. 2011. Sleep and its regulation in zebrafish // *Rev. Neurosci*. V. 22. P. 27–36.
<https://doi.org/10.1515/RNS.2011.005>
- Zhdanova I.V., Wang S.Y., Leclair O.U., Danilova N.P. 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish // *Brain Res*. V. 903. P. 263–268.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02444-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02444-1)
- Zhdanova I.V., Geiger D.A., Schwagerl A.L. et al. 2002. Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates // *Physiol. Behav*. V. 75. P. 523–529.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00654-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00654-6)