

УДК 612.015.33+612.821.6

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МОЛОДИ ПЕРСИДСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER PERSICUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ИХ ЗРЕЛОСТИ

© 2010 Ч.А. Мамедов

Азербайджанский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, г. Баку

Поступила в редакцию 30.04.2010

В статье приводятся результаты исследования содержания серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка (СМАБ), находящегося в прямых отношениях с уровнем серотонина, в головном мозге полуграммовых, однограммовых, двухграммовых и трёхграммовых мальков осетров 50- и 70-дневного возраста. Исследование выполнено с помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа с применением поликлональных иммуноглобулинов к СМАБ. Получены данные, свидетельствующие о том, что в процессе созревания головного мозга мальков осетров наблюдается снижение активности серотонинергической системы, имеющее ступенчатый характер.

Ключевые слова: *серотонин-модулируемый антиконсолидационный белок (СМАБ), персидский осетр, зрелость, головной мозг*

Серотонинергическая система играет важную роль в процессах пролиферации и дифференцировки клеточных элементов головного мозга. Серотонин-продуцирующие клетки [5] появляются на очень ранних стадиях эмбриогенеза человека [7] так же, как и серотониновые рецепторы [12]. Столь раннее возникновение серотонинпродуцирующих клеток (локализующихся в ядрах шва ствола головного мозга млекопитающих) в период, когда медиаторные свойства серотонина не могут быть реализованы вследствие недостаточной зрелости клеточных элементов центральной нервной системы, свидетельствует об участии этих клеток в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток эмбриональных тканей. У крыс серотонинпродуцирующие нейроны ствола появляются одними из первых в головном мозге и играют ключевую роль в регуляции нейрогенеза [10]. Серотонинпродуцирующие нейроны первыми из нейронов иннервируют примордиальную кортикальную пластинку, а серотонинергические волокна вырастают в кортикальную пластинку на пике митотического деления и созревания её клеточных элементов [8]. С другой стороны, согласно данным Lauder и Krebs [11], инъекции ингибитора синтеза серотонина – параклорфенилаланина – замедляло созревание нейронов в пренатальном онтогенезе, тогда как легкий стресс, способствующий выделению гормонов и серотонина, ускорял дифференцировку нейронов. Эти исследователи идентифицировали дифференциацию нейронов как результат прекращения

клеточного деления, о котором они судили по уровню включения ³H-тимидина. На непосредственное участие серотонина в регуляции дифференцировки нервных клеток также указывают результаты исследований других авторов [9, 13].

В настоящее время одним из спорных вопросов при искусственном воспроизводстве осетровых является определение стадии их выпуска из рыбоводных заводов в естественные водоёмы. При этом за основной показатель принимается их вес (масса) и в нормативных документах предусмотрен выпуск молоди по достижении массы тела 2-3 г, считая при этом промысловый возврат равным 2-3% от количества выпускаемой молоди. Исходя из этих данных, предлагают выпускать молодь с большей массой (5-10 г) с тем, чтобы повысить уровень промыслового возврата до 5-10%. Впоследствии, однако, было обнаружено, что масса тела не может служить достаточным критерием для выпуска молоди осетровых из рыбоводных заводов. Исследования Р.Ю. Касимова [1] и В.В. Лукьяненко с соавторами [2] показали, что адекватным критерием для выпуска молоди, может быть возраст, поскольку он отражает сформированность её поведенческих и физиолого-биохимических показателей, способствующих лучшему приспособлению и выживанию животных в природных условиях. С другой стороны, при выращивании осетровых на рыбоводных заводах в потомстве, полученной от одной самки, встречаются особи, отличающиеся темпами своего развития, т.е. в одновозрастной популяции встречаются как более крупные особи, так и особи меньшего размера, с меньшей массой. Исходя из сказанного, представляется важным определение уровня активности серотонинергической системы головного мозга осетровых в раннем онтогенезе с целью установления

Мамедов Чингиз Агамуса оглы, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией «Искусственное воспроизводство рыб и товарное рыбоводство». E-mail: m_chingiz@yahoo.com

соответствия степени зрелости и сформированности их центральной нервной системы требованиям естественных условий обитания.

Определение активности серотонинергической системы осуществляли путём иммунохимического измерения содержания серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка (СМАБ) в белковых экстрактах головного мозга мальков осетров с использованием поликлональных иммуноглобулинов, полученных к этому белку. СМАБ был выделен ранее в Институте физиологии им. А.И. Караева (Баку) из головного мозга белых крыс, обладает молекулярной массой 126 кДа [3] и лишён видовой специфичности.

Материал и методика. Исследования выполнены в 2005-2006 гг. на разновозрастных группах молоди персидского осетра *Acipenser persicus*, выращенных бассейновым методом в условиях Хыллинского осетрового рыбного завода Азербайджанской Республики. Мальки массой 0,5 г (n=9) и 1 г (n=7) были 50-дневного возраста, тогда как двухграммовые и трёхграммовые мальки были 50- (n=7) и 70-дневного (n=7) возраста. При проведении исследований у мальков извлекали головной мозг и экстрагировали суммарные водорастворимые белки путём гомогенизации в стеклянных гомогенизаторах в 0,05 М фосфатном экстрагирующем буфере (рН 7,2), содержащем 0,3 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 0,1%-ный тритон X-100. Пробы центрифугировали при 6000 об./мин в течение 15 минут и собирали супернатант. Концентрацию экстрагированных белков измеряли методом Бредфорда с помощью 0,01%-ного раствора Кумасси ярко-голубого G-250 в спектрофотометре на длине волны 595 нм. Концентрацию экстрагированных белков доводили с помощью 0,1 М буфера трис-HCl (рН 8,6) до 20 мкг/мл и использовали в качестве антигенов при постановке непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах умеренного уровня связывания (Corning Incorporated, USA). Через 20 ч лунки четырежды отмывали 0,15 М раствором NaCl, содержащим 0,05%-ный твин-20 и наносили поликлональные иммуноглобулины к СМАБ, разведенные в соотношении 1: 40 в 0,01 М фосфатном буфере для антител (рН 7,2), содержащим 0,15 М NaCl и 0,05%-ный твин-20. Через 24 ч лунки вновь отмывали и наносили противокроличьи козьи конъюгаты иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (Кардиоцентр, Москва) в разведении 1: 6000 в буфере для антител. Через 3 ч лунки вновь отмывали и заливали субстратом – ортофенилендиамин – в концентрации 0,5 мг/мл в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере (рН 4,5), содержащим 0,4 мг/мл перекиси водорода. Реакцию останавливали через 20 мин путём добавления в лунки 3 М раствора NaOH. Результаты реакции считывали с помощью фотометра для иммуноферментного анализа на длине волны 492 нм.

Полученные результаты погруппно усредняли и сравнивали по t-критерию Стьюдента [3].

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований была выявлена следующая закономерность изменений в уровне СМАБ в головном мозге мальков осетров в зависимости от степени их зрелости. При сравнении 50-ти дневных мальков осетров весом 0,5 г, 1 г и 2 г было обнаружено резкое снижение содержания СМАБ у однограммовых мальков относительно полуграммовых (p<0,01), тогда как между однограммовыми и двухграммовыми мальками никакой разницы по уровню СМАБ обнаружено не было (рис. 1).

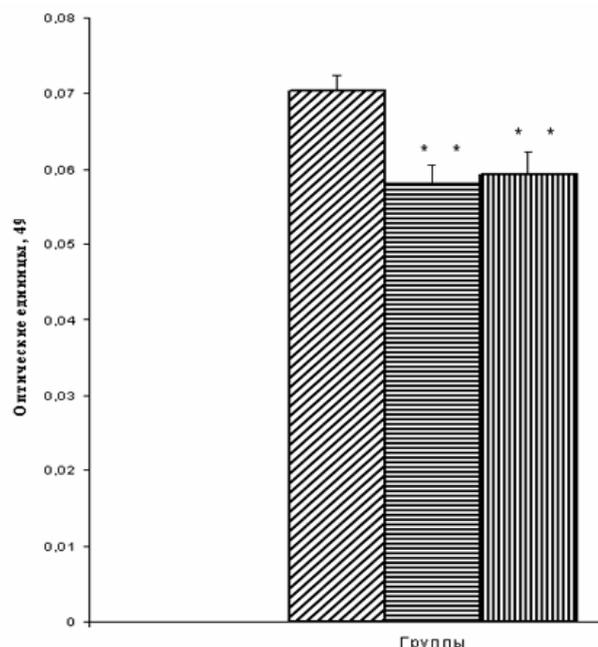


Рис. 1. Содержание серотонин-модулируемого белка в головном мозге 50-дневных мальков осетров разного веса: наклонная штриховка – 0,5 г, горизонтальная штриховка – 1 г, вертикальная штриховка – 2 г. ** - p<0,01

Наряду с этим, также проводили сочетанное сравнение уровня СМАБ в головном мозге мальков осетров разного веса и возраста. При анализе содержания СМАБ у двухграммовых мальков, отобранных из популяции мальков 50- и 70-суточного возраста, а также у трёхграммовых мальков 58- и 70-суточного возраста была выявлена преобладающая роль степени зрелости (веса) над возрастом животных в детерминировании его значений. В частности, двухграммовые мальки осетров 50- и 70-суточного возраста имели близкие значения СМАБ так же, как и трёхграммовые мальки 58- и 70-суточного возраста (рис. 2). Вместе с тем, были обнаружены значительные различия между двухграммовыми 50-суточными и трёхграммовыми 58-суточными мальками (p<0,01), а также между двухграммовыми 70-суточными и трёхграммовыми 70-суточными мальками осетров (p<0,01; рис. 2).

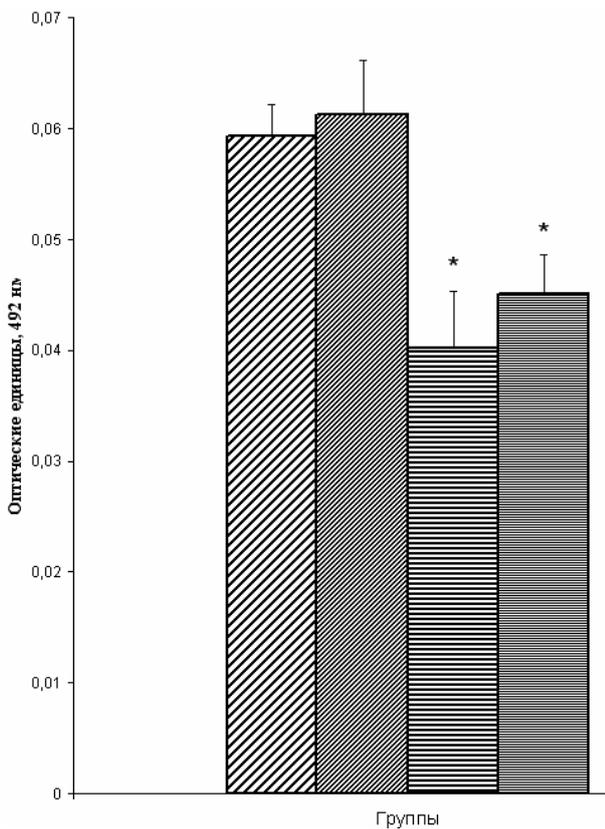


Рис. 2. Изменение содержания серотонин-модулируемого белка в мозге мальков осетров в зависимости от веса и возраста. * - $p < 0,05$.

Широкая наклонная штриховка – 2 г. 50 сут.;
узкая наклонная штриховка – 2 г. 70 сут.;
горизонтальная широкая штриховка – 3 г. 58 сут.;
горизонтальная мелкая штриховка – 3 г. 70 сут.

Проведение интегрального анализа содержания СМАБ у 50-дневных полуграммовых, однограммовых, двухграммовых и 58-дневных трёхграммовых мальков позволило выявить следующую динамику (рис. 3). При созревании мальков в интервале от полуграммовых к однограммовым животным наблюдается заметное ($p < 0,01$) снижение содержания СМАБ. Далее, при анализе уровня СМАБ у однограммовых и двухграммовых мальков происходит стабилизация значений этого показателя – они выходят на плато, тогда как при последующем развитии от двухграммовых к трёхграммовым малькам вновь отмечается заметное ($p < 0,05$) падение уровня СМАБ. Таким образом, на ранних этапах созревания головного мозга осетров в постэмбриональном онтогенезе от полуграммовых мальков к трёхграммовым наблюдается постепенное снижение активности серотонинергической системы. Выявленное снижение активности серотонинергической системы отмечается в период значительного сокращения пролиферативной активности клеточных элементов головного мозга мальков осетров и интенсификации процессов их дифференциации и формирования структур головного мозга. В частности, возраст

использованных в представленном исследовании животных приходится на 6-ой период III этапа развития конечного мозга осетровых рыб, охватывающий интервал от 35-тых до 70-ых суток постэмбрионального развития [5]. К этому этапу происходит образование всех основных зон и ядер конечного мозга осетровых, и дальнейшее развитие следует по пути дифференцировки образовавшихся структур.

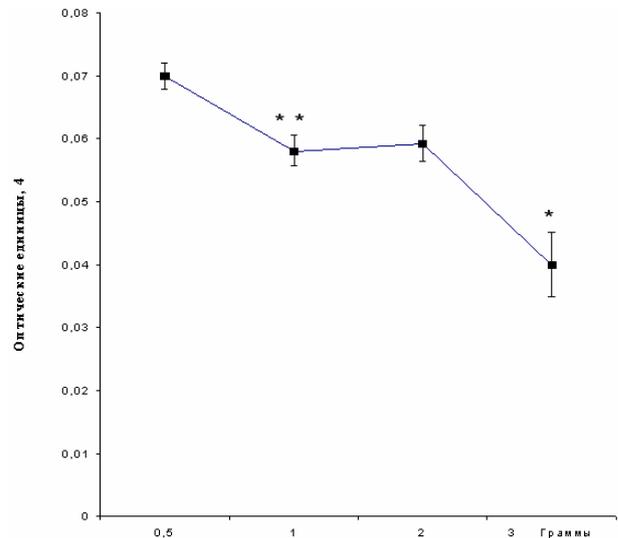


Рис. 3. Зависимость уровня серотонин-модулируемого белка от массы мальков осетров 50-дневного возраста. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Снижение активности серотонинергической системы головного мозга мальков осетров в период интенсификации процессов дифференцировки его клеточных элементов и завершения их пролиферации, вероятно, обусловлено тем, что рецепторы серотонина 5-НТ1А, задействованные в регуляции процессов дифференцировки клеток, обладают высоким уровнем аффинности (10^{-9} М) к серотонину, на три порядка превышающим аффинность рецепторов серотонина 5-НТ2А (10^{-6} М), ответственных за регуляцию пролиферации нервных клеток [7].

Исходя из известной из литературы регуляторной роли серотонина в отношении процессов дифференциации клеток [9, 13] выявленная динамика изменения уровня СМАБ позволяет проследить во временном масштабе характер этой регуляции. Рассмотрение этой динамики в процессе созревания головного мозга мальков осетров позволяет придти к заключению о том, что снижение активности серотонинергической системы происходит не градуально, а имеет ступенчатый (на отрезке развития от однограммовых к двухграммовым малькам) характер. Вследствие регуляции серотонином процесса дифференцировки, можно полагать, что аналогичному временному характеру изменений также подчиняется динамика дифференциации клеточных элементов и созревания структур головного

мозга мальков. Следовательно, по уровню активности серотонинергической системы головного мозга мальков осетров можно делать заключение о степени зрелости структур их головного мозга. Обнаруженная в данной работе закономерность может быть востребована в практике рыбоводства для определения степени зрелости мальков осетров перед их выпуском в естественную среду обитания.

Выводы:

1. Обнаружено резкое снижение содержания СМАБ у однограммовых мальков относительно полуграммовых, тогда как между однограммовыми и двухграммовыми мальками никакой разницы по уровню СМАБ обнаружено не было.

2. При анализе содержания СМАБ у двухграммовых мальков 50- и 70-суточного возраста, а также у трёхграммовых мальков 58- и 70-суточного возраста была выявлена преобладающая роль степени зрелости (веса) над возрастом животных в детерминировании его значений.

3. Анализ содержания СМАБ у полуграммовых, однограммовых, двухграммовых и трёхграммовых мальков 50-дневного возраста указывает на ступенчатый характер снижения его уровня.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Касимов, Р.Ю.* Сравнительная характеристика поведения дикой и заводской молоди осетровых в раннем онтогенезе. Монография. – Баку: Элм, 1980. – 136 с.
2. *Лукьяненко, В.И.* Возрастно-весовой стандарт заводской молоди каспийских осетровых. Монография / *В.И. Лукьяненко, Р.Ю. Касимов, А.А. Кокоза.* – Волгоград: 1984. – 227 с.
3. *Лакин, Г.Ф.* Биометрия. Монография. – М.: Высшая школа, 1973. – 343 с.
4. *Мехтиев, А.А.* Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающим антиконсолидационными свойствами // Бюллетень экспериментальной биологической медицины. – 2000. – Т.130, №8. – С. 147-150.
5. *Попова, Н.К.* Серотонин и поведение. Монография / *Н.К. Попова, Е.В. Науменко, В.Г. Колпаков.* – Новосибирск: Наука, 1978. – 188 с.
6. *Рустамов, Э.К.* Развитие конечного мозга осетровых рыб в раннем онтогенезе // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1987. – Т. 23, № 2. – С. 253-257.
7. *Azmitia, E.C.* Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // *Brain Res. Bulletin.* – 2001. – V. 56, № 5. – P. 413-424.
8. *Dori, I.* Regional differences in the ontogeny of of the serotonergic projection to the cerebral cortex / *I. Dori, A. Dinopoulos, M.E. Blue, J.G. Parnavelasm* // *Experimental neurology.* – 1996. – V. 138, № 1. – P. 1-14.
9. *Hernandez, R.J.* Serotonin as a neurotrophic factor in the fetal brain: Binding, capture and release in the centers of axonal growth // *Gas. Med. Mex.* – 1994. – V. 130, № 1. – P. 246-252.
10. *Klingman, D.* Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain / *D. Klingman, D.R. Marshak* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – V. 82, № 22. – P. 7136-7139.
11. *Lauder, J.M.* Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis / *J.M. Lauder, H. Krebs* // *Dev. Neurosci.* – 1978. – V. 1, № 1. – P. 15-30.
12. *Lauder, J.M.* Expression of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in the mouse embryo / *J.M. Lauder, M.B. Wilkie, Ch. Wu, S. Singh* // *Int. J. Developmental Neurosci.* – 2000. – V. 18, № 7. – P. 653-662.
13. *Marois, R.* Development of serotoninlike immunoreactivity in the embryonic nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* / *R. Marois, R.P. Croll* // *J. Comp. Neurol.* – 1992. – V. 322, № 1. – P. 255-265.

CHARACTER OF CHANGE THE SEROTONINERGICAL SYSTEM ACTIVITY OF THE BRAIN OF YOUNG FISHES OF PERSIAN STURGEON *ACIPENSER PERSICUS* DEPENDING ON THE LEVEL OF THEIR MATURITY

© 2010 Ch.A. Mamedov

Azerbaijan Scientific Research Institute of Fish Economy, Baku

In article results of research the maintenance of serotonin-modulated anticonsolidated protein (SMAP), being in direct relations with the level of serotonin, in a brain of half-gramm, one-gramm, two-gramm and three-gramm young sturgeons 50 and 70-day's age are resulted. Research is executed by means of solid-phase immunoenzymatic analysis with application of polyclonals antibodies to SMAP. The data, testifying that during maturation of young sturgeons brain decrease the activity of serotoninergical system is observed, having are obtained step character.

Key words: *serotonin-modulated anticonsolidated protein, persian sturgeon, maturity, brain*

Chingiz Mamedov, Candidate of Biology, Chief of the Laboratory "Artificial Reproduction and Commodity Fish Culture". E-mail: m_chingiz@yahoo.com