

УДК 597.554.3

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОСПЕЦИФИЧНОГО ДИГИДРОПИРИМИДИНАЗА-ПОДОБНОГО БЕЛКА-2 (DPYL2) НА ПИЩЕВУЮ МОТИВАЦИЮ МОЛОДИ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS*

¹Гарина Д.В., ¹Смирнова Е.С., ²Мехтиев А.А.

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, e-mail: darina@ibiw.ru;

²Институт физиологии им. академика Абдуллы Караева НАН Азербайджана, Баку, e-mail: arifmekht@yahoo.com

Дигидропиридиназа-подобный белок-2 (DPYL2) – нейроспецифичный белок массой 62 кДа, участвующий в развитии и поляризации нейронов, регуляции роста аксонов и клеточной миграции. Для исследования эффектов белка на процессы формирования долговременной памяти у животных используют различные модели их обучения, в том числе с пищевым подкреплением. Исследования влияния DPYL2 на пищевую мотивацию рыб до настоящей работы не проводились. В двух экспериментах исследовали влияние DPYL2, введённого в желудочек головного мозга, на пищевую мотивацию молоди серебряного карася *Carassius auratus*. В первом эксперименте исследовали влияние внутримозговой инъекции DPYL2 на индивидуальное потребление пищи карасями в лабиринте с пищевым подкреплением. Во втором эксперименте изучали влияние внутримозговых инъекций DPYL2 на групповое пищевое поведение карасей, питавшихся размещёнными в грунте личинками хирономид. В первом эксперименте наблюдалось достоверное постепенное увеличение потреблённого корма особями всех трёх групп (интактной, контрольной и опытной) по мере их обучения, однако при этом DPYL2 не снижал количество потребляемого корма у рыб опытной группы по сравнению с особями из группы активного контроля. Во втором эксперименте наблюдалось незначительное недостоверное снижение рационов рыб через сутки после инъекции в опыте и через двое – в контроле, однако достоверные отличия показателя у рыб двух групп отсутствуют. Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии негативного влияния DPYL2 на пищевую мотивацию рыб и, следовательно, об оправданности использования моделей обучения с пищевым подкреплением.

Ключевые слова: карась *Carassius auratus*, дигидропиридиназа-подобный белок-2 (DPYL2), пищевая мотивация, обучение

INFLUENCE OF NEURO-SPECIFIC DIHYDROPYRIMIDINASE-RELATED PROTEIN 2 (DPYL2) ON FEEDING MOTIVATION OF JUVENILE GOLDFISH *CARASSIUS AURATUS*

¹Garina D.V., ¹Smirnova E.S., ²Mekhtiev A.A.

¹Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, Borok, e-mail: darina@ibiw.ru;

²Karaev Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, e-mail: arifmekht@yahoo.com

Dihydropyrimidinase-like protein-2 (DPYL2) is a 62 kDa neuro-specific protein involved in development and polarization of neurons, regulation of axon growth and cell migration. To study the effects of protein on formation of long-term memory in animals, various models of learning, including those with food reinforcement, are used. The effect of DPYL2 on fish feeding motivation was not studied before this work. In two experiments, the effect of DPYL2 injected into the brain ventricle on the feeding motivation of juvenile goldfish *Carassius auratus* was investigated. In the first experiment, the effect of ICV injection of DPYL2 on the individual food consumption of goldfish in a maze with food reinforcement was studied. In the second experiment, the effect of ICV protein injection on the group fish feeding behavior feeding on chironomid larvae placed in the ground, was studied. In the first experiment significant gradual increase in food intake by individuals of all three groups (intact, control, experimental) was observed as they trained, however, DPYL2 did not reduce the amount of food consumed by fish of the experimental group compared to the individuals from the control group. In the second experiment, there was slight insignificant decrease in the ration one day after injection (experimental group) and two days later (control group), however, there were no significant differences in the parameter between two groups. The results suggest that there was no negative effect of DPYL2 on the feeding motivation in fish and, therefore, about the justification of using the learning models with food reinforcement.

Keywords: goldfish *Carassius auratus*, dihydropyrimidinase-like protein-2 (DPYL2), feeding motivation, training

В 1991 г. в коре головного мозга крыс был обнаружен белок, названный авторами «серотонин-модулируемый антиконсолидационный белок» (СМАБ), обладающий способностью негативно влиять на процессы обучения и формирование долговременной

памяти у животных (консолидацию следов памяти). В частности, при ежедневном введении белка в желудочек мозга за 40 мин до сеанса обучения у крыс нарушалось формирование следов памяти в многократной модели челночной камеры с электро-

болевым подкреплением [1], а также в условно-рефлекторной модели чередования побегок с пищевым подкреплением [2]. Было показано также негативное влияние белка на формирование долговременной памяти у костистых рыб (карпа *Cyprinus carpio* и серебряного карася *Carassius auratus*): его введение в 4-й желудочек мозга снижало способность рыб к обучению и нарушало формирование пространственной памяти у рыб в лабиринте с пищевым подкреплением [3].

Позднее применение электрофореза в денатурирующих условиях с последующей масс-спектрометрией MALDI-TOF позволило идентифицировать несколько белковых фракций, входящих в состав СМАБ. Поскольку все изученные фракции, кроме одной, оказались структурными белками, было предположено, что негативный эффект СМАБ на формирование памяти у животных вызывает фракция, идентифицированная как дигидропиримидиназа-подобный белок-2 (dihydropyrimidinase-related protein 2, DPYL2, или CRMP2) [3]. Это внутриклеточный нейроспецифичный белок массой 62 кДа относится к небольшому семейству цитозольных белков, известных как медиаторы Sema3A сигналинга и нейрональной дифференциации. Биологическая функция DPYL2 – участие в развитии и поляризации нейронов, регуляции роста аксонов и клеточной миграции [4].

В опытах по обучению рыб условному рефлексу с пищевым подкреплением нами было визуально отмечено, что карпы опытной группы, которым вводили нативный DPYL2, несколько снижали пищевую активность по сравнению с особями из группы активного контроля, инъецированными инактивированным белком. В случае если бы такое влияние имело место, модели обучения рыб с пищевым подкреплением не могли бы рассматриваться как адекватные для исследования эффектов DPYL2 на формирование памяти либо должны применяться осмотрительно, с поправками на его побочные, неспецифические эффекты. Однако экспериментов, поставленных специально с целью изучения влияния DPYL2 на пищевую мотивацию у рыб, до настоящего времени поставлено не было.

Цель исследования: установить, оказывает ли DPYL2 влияние на пищевую активность молоди серебряного карася, в двух различных схемах экспериментов, моделирующих: 1) поиск и потребление корма отдельными особями в лабиринте и 2) поиск и потребление корма, расположенного в виде «кормовых пятен» в грунте, группой особей.

Материалы и методы исследования

Эксперимент 1 проводили в мае 2013 г. на молоди (0+) серебряного карася *Carassius auratus* массой 7,8–9,7 г. Эксперимент 2 проводили в феврале – марте 2020 г. на молоди (0+) серебряного карася *Carassius auratus* массой 7,1–10,6 г. Молодь рыб была получена из прудов экспериментальной прудовой базы ИБВВ РАН «Сунога» (п. Борок, Ярославская обл., Россия). Отловленные в сентябре особи содержались в течение осенне-зимнего периода в условиях аквариальной вплоть до начала экспериментов: в аквариуме объемом 200 л с проточной водой, при естественном освещении, с кормлением один раз в сутки искусственным желированным кормом *ad libitum*. Перед началом первого эксперимента формировали 3 группы рыб: интактную, опытную и группу активного контроля, по 8 особей в каждой. Рыб помещали в индивидуальные контейнеры ёмкостью 4 л, с аэрируемой водой. Температура воды 18–19 °С, освещение искусственное (10 ч «свет»: 14 ч «темнота»). Рыб в течение 7 сут акклиматизировали к данным условиям, кормили раз в сутки личинками *Chironomus sp. ad libitum*, после чего особей двух групп (опытной и контрольной) подвергали инъекции препаратов.

Инъекцию белка в 4-й желудочек головного мозга проводили микрошприцем Гамильтона под наркозом (раствор метансульфоната трикаина (MS-222), 130 мг/л воды). Рыбам опытной группы вводили нативный белок (3 и 2,7 мкг в первом и втором опытах соответственно), рыбам контрольной группы – то же количество белка, инактивированного нагреванием при 55 °С в течение 40 мин. Карасям из интактной группы СМАБ не вводили. Обучение рыб в лабиринте (первый опыт) и исследование пищевого поведения рыб (второй опыт) начинали через 24 ч после инъекции.

Эксперимент 1

Схема лабиринта представлена на рис. 1. Корм (20 личинок хирономид) размещали в конце левого коридора. Рыбу помещали в стартовую камеру, затем открывали заслонку, преграждающую выход из камеры, и включали аналоговую видеокамеру Quadro-Namy HOME (Китай), расположенную над аквариумом. Поведение особи регистрировали в течение 10 мин после открытия заслонки в стартовой камере, после чего видеорегистрацию заканчивали, особь изымали из установки, остатки корма подсчитывали, помещали следующую и т.д. В сутки проводили один сеанс обучения, всего провели 7 последовательных сеансов.

Рассчитывали среднее значение рациона для каждого временного интервала ($n = 8$) и всего периода наблюдения после инъекции ($n = 56$).

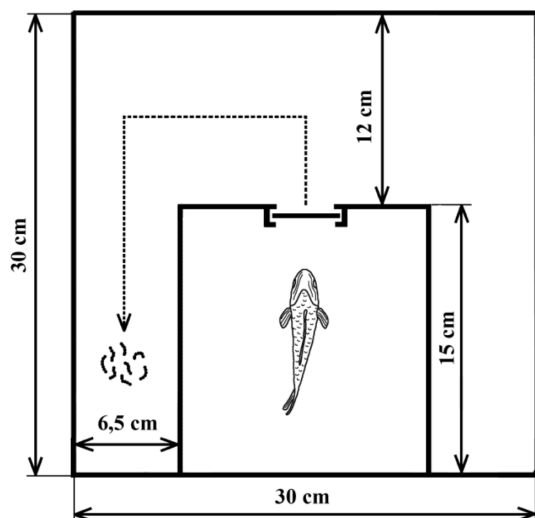


Рис. 1. Схема экспериментальной установки (вид сверху)

Эксперимент 2

Для второго эксперимента были сформированы две группы рыб, по три особи. Группы помещали в два одинаковых аквариума экспериментальной установки для адаптации к условиям эксперимента. Экспериментальная установка представляла собой два непроточных аквариума размером $116 \times 43 \times 23$ см, с укрепленными над ними зеркалами. Около левой стороны аквариума размещалась стартовая камера размером $13 \times 13 \times 16$ см, изготовленная из дели, натянутой на каркас. На дне аквариумов грунт – речной песок слоем 2–3 см. Освещение обеспечивалось лампами дневного света. Режим освещения: 12 час «свет» – 12 час «темнота». Температура воды $+21 \dots +23$ °C.

После адаптации в течение двух недель рыбам обеих групп делали инъекцию препаратов по схеме, описанной выше. Через 1 ч после инъекции начинали эксперимент. Корм (40 личинок хирономид) размещали на пяти ситечках (8 см в диаметре), по 8 экз. на каждом. Перед началом эксперимента «кормовые пятна» закапывали в грунт. После окончания эксперимента подсчитывали количество несъеденных личинок хирономид на ситечках. Последующие опыты проводили через 24, 48, 72 и 96 ч после инъекции. Через неделю после первой инъекции делали повторную инъекцию и проводили опыт по той же схеме и т.д. в течение пяти недель. Число

наблюдений для каждого временного интервала суммировалось и составило таким образом 5 значений. Рассчитывали среднее значение рациона для каждого временного интервала ($n = 5$) и всего периода наблюдения ($n = 10$ до инъекции и $n = 25$ после инъекции).

Данные обрабатывали статистически с использованием приложения Excel программы MS Office 2016 и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Статистическую значимость различий рационов рыб интактной, контрольной и опытной групп оценивали в первом эксперименте с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA; контрольной и опытной групп во втором эксперименте – с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни, при уровне значимости $0,05$ ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты первого эксперимента показывают, что на количество съеденного карасями корма в лабиринте инъекция DPYL2 не влияет. Так, средний рацион особи карася за 7 дней наблюдения составил $4,6 \pm 0,5$, $4,6 \pm 0,7$ и $4,3 \pm 0,7$ экз. хирономид у интактных, контрольных и опытных рыб соответственно ($F = 0,12$, $df = 2$, $p = 0,89$). Авторы проанализировали также с помощью двухфакторного дисперсионного анализа средние рационы у рыб трёх групп по дням. Было установлено, что инъекция белка не оказывает значимого эффекта на показатель: $F = 0,09$, $df = 2$, $p = 0,91$. Однако наблюдается достоверная связь количества съеденного корма с интервалом наблюдения: $F = 2,74$, $df = 6$, $p = 0,015$. У рыб всех трёх групп наблюдается постепенное возрастание рационов (рис. 2).

Результаты второго эксперимента также свидетельствуют о том, что DPYL2 не влияет на пищевую мотивацию рыб. Значения средних рационов у рыб интактных групп достоверно не различались: $24,1 \pm 1,0$ и $25,1 \pm 1,2$ экз. у первой и второй групп соответственно ($p > 0,05$). В то же время средний рацион рыб за весь период наблюдения составил $26,0 \pm 0,9$ и $27,4 \pm 0,9$ экз. в контроле и опыте соответственно ($p > 0,05$). Наименьшее значение показателя наблюдается через сутки после инъекции в опыте и через двое – в контроле: $25,0 \pm 2,7$ и $23,8 \pm 3,0$ экз. соответственно ($p > 0,05$) (рис. 3).

Таким образом, авторы проанализировали эффект инъекции DPYL2 на пищевую мотивацию рыб в двух экспериментах с различными схемами и в обоих получили отрицательные результаты.

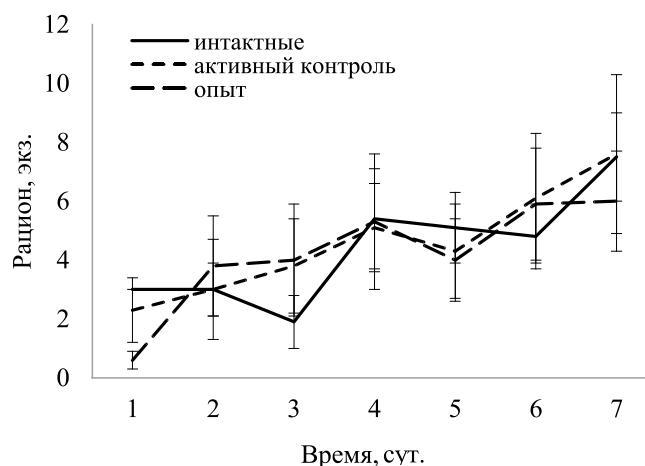


Рис. 2. Динамика изменения рационов у карасей различных групп в первом эксперименте

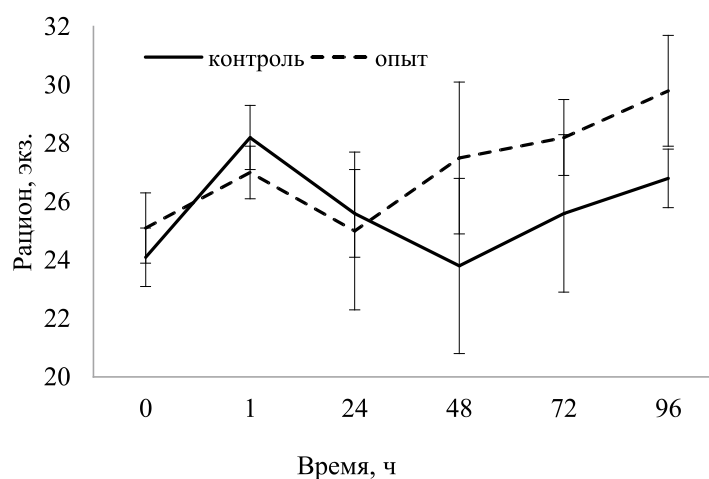


Рис. 3. Динамика изменения рационов у карасей различных групп во втором эксперименте

Влияние DPYL2 на формирование пространственной памяти у молоди серебряного карася было описано нами ранее. Было продемонстрировано, что на динамику выработки пространственного навыка у рыб – нахождение корма в определённом месте лабиринта, – инъекция белка оказывает выраженное негативное воздействие. Так, если среднее за всё время обучения число рыб, находивших корм в лабиринте, составило 53% и 42% в интактной и контрольной группах соответственно, то в опытной – только 16% [3]. Исходя из этого, авторы предположили, что в первом эксперименте способность рыб к обучению и запоминанию маршрута к корму могла повлиять на количество съеденного карасями корма. Тем не менее динамика прироста среднего рациона у рыб контрольной и опытной групп в лабиринте по мере обучения сви-

детельствует о том, что существенных различий по этому показателю у особей двух групп нет. Возможно, некоторое снижение потребления пищи у рыб, визуально наблюдаемое в экспериментах по влиянию DPYL2 на обучение и долговременную память, было связано с самой процедурой инъекции, что авторы и проверили во втором эксперименте: у рыб опытной группы незначительное снижение рациона происходило на первые сутки, а у рыб контрольной группы – на вторые сутки, и это снижение было статистически недостоверным в обоих случаях.

В регуляции энергетического гомеостаза и потребления пищи у животных задействованы несколько популяций нейронов, локализованных преимущественно в структурах гипоталамуса. Существуют ориксигенные, возбуждающие аппетит, и анориксигенные,

снижающие потребление пищи и вес тела, нейропептиды. К первой группе относится агути-родственный пептид, AgRP, нейроны которого локализованы в аркуатном ядре гипоталамуса [5, 6]. Этими же нейронами синтезируется другой пептид, нейропептид Y (NPY), оказывающий стимулирующее действие на потребление пищи животным с помощью другого, отличного от AgRP механизма. Активность AgRP- и NPY-нейронов ингибируется гормонами лептином, инсулином и PYY3-36 и стимулируется гормоном грелином [6]. Рядом с этими клетками находятся нейроны, которые экспрессируют проопиомеланокортин (ПОМС), предшественник полипептида, из которого синтезируются меланокортины, такие как α -меланоцит стимулирующий гормон (α -MSH). Активация меланокортиновых рецепторов приводит к ингибированию потребления пищи [7]. Список биологически активных веществ, участвующих в регуляции пищевого поведения животных, в последние десятилетия постоянно расширяется. Несмотря на эволюционную консервативность механизмов, регулирующих потребление пищи животными, нейроэндокринные регуляторные механизмы рыб имеют свою специфику [8]. К настоящему времени опубликовано уже достаточно много обзоров, в которых авторы обобщают сведения, касающиеся регуляции пищевого поведения и энергетического гомеостаза у костистых рыб [8–10]; в то же время экспериментальная работа по получению новых сведений продолжается.

В доступной им литературе авторы не нашли свидетельств того, что DPYL2 может прямо или косвенно влиять на пищевые реакции рыб. В опытах на крысах в условно-рефлекторной модели чередования побегов с пищевым подкреплением, в эксперименте с регистрацией количества съеденных пищевых шариков также не было выявлено влияния DPYL2 на уровень пищевой мотивации [2]. Таким образом, корм как подкрепляющий стимул может быть использован без ограничений в опытах по исследованию влияния DPYL2 на обучение и формирование памяти у рыб. Использование различных подходов и схем поведенческих экспериментов на разных видах животных позволит получить более полные сведения относительно роли этого белка в механизмах формирования долговременной памяти.

Заключение

1. Введение белка DPYL2 в желудочек мозга серебряным карасем в дозе, вызывающей выраженное негативное воздействие на долговременную память, не влияет на их пищевую мотивацию.

2. Полученные результаты позволяют обоснованно использовать корм как стимул обучения для рыб в опытах по исследованию белка на формирование памяти.

Авторы выражают благодарность за техническую помощь в работе канд. биол. наук А.К. Смирнову.

Работа выполнена за счёт средств федерального бюджета на выполнение госзадания № АААА-А19-119102890013-3.

Список литературы

- Guseinov Sh.B., Mekhtiev A.A. Studies of the role of serotonin-modulating anticonsolidation protein in memory formation in rats in a shuttle box. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013. Vol. 43. No. 5. P. 551–556. DOI: 10.1007/s11055-013-9770-8.
- Mekhtiev A.A., Panakhova E.N., Rashidova A.M., Guseynov Sh.B. Engagement of serotonin-modulating anticonsolidation protein in memory formation and suppression of drug addiction and epileptic seizures / Ming D. Li (ed). *New developments in serotonin research*. 2015. Nova Science Publishers, New York. P. 123–143.
- Garina D.V., Bolshakov V.V., Toropygin I.Y., Mekhtiev A.A., Andreeva A.M. The role of neuro-specific dihydropyrimidinase-related protein 2 (dpyl2) in spatial memory formation in teleosts. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018. Vol. 9. No. 1. P. 11–14. DOI: 10.15421/021802.
- Schmidt E.F., Strittmatter S.M. The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007. Vol. 600. P. 1. DOI: 10.1007/978-0-387-70956-7.
- Flier J.S. AgRP in energy balance: will the real AgRP please stand up? *Cell Metabolism*. 2006. Vol. 3. No. 2. P. 83–85. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.01.003.
- Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S., Schwartz M.W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006. Vol. 443. No. 7109. P. 289–295. DOI: 10.1038/nature05026.
- Zhan C. POMC neurons: feeding, energy metabolism, and beyond. In: Wu Q., Zheng R. (eds) *Neural Regulation of Metabolism*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. Vol. 1090. Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-1286-1_2.
- Kuzmina V.V. The regulatory mechanisms of feeding behavior in fish. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2019. Vol. 55. No. 1. P. 1–13. DOI: 10.1134/S0022093019010010.
- Volkoff H. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Frontiers in Neuroscience*. 2016. Vol. 10. article 540. DOI: 10.3389/fnins.2016.00540.
- Soengas J.L., Cerdá-Reverter J.M., Delgado M.J. Central regulation of food intake in fish: an evolutionary perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018. Vol. 60, No. 4. P. 171–199. DOI: 10.1530/JME-17-0320.