



УДК 612.8.015:577.150.8:591.543.42

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ВПАДЕНИИ В ЗИМНЮЮ СПЯЧКУ И ПРИ ПРОБУЖДЕНИИ

ВОРОНОВА И. П., ПОПОВА Н. К.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Определена активность ключевого фермента синтеза серотонина—триптофангидроксилазы в гипоталамусе, гиппокампе, полосатом теле и среднем мозгу краснощеких сусликов *Citellus erythrogenus* в различные фазы цикла бодрствование-спячка. Обнаружено, что в различных отделах мозга активность фермента меняется не синхронно. В большинстве отделов она повышается при впадении в спячку и понижается при выходе из нее, причем повышение активности фермента предшествует впадению животных в зимнюю спячку. В среднем мозгу и гиппокампе более высокая, чем у бодрствующих, активность фермента у животных в состоянии спячки отмечена и при температуре инкубации 7°, близкой к реальной температуре тела находящегося в спячке животного. Это повышение, по-видимому, связано с увеличением количества фермента, поскольку величина  $V$  во время спячки повышалась, а  $K_m$  оставалась постоянной. Полученные данные свидетельствуют о функциональной активности серотониновой системы мозга при погружении в зимнюю спячку и подтверждают представление о существенной роли этой системы в механизмах последней.

Изучение нейрохимических механизмов зимней спячки важно не только для понимания этого уникального адаптивного состояния, но и для выявления регуляторных механизмов, функционирующих и у незимоспящих животных. Ранее в наших исследованиях было установлено, что при впадении в спячку происходит существенное увеличение в мозгу числа мест специфического рецепторного связывания серотонина 1 и 2 типов [1], а также количества серотонина, сочетающееся с понижением уровня его основного метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты и активности MAO [2, 3]. Было предположено, что серотонин мозга участвует в изменении поведения и в развитии сноподобного состояния и что наступление зимней спячки связано с усилением серотонинергических влияний [2, 4]. Однако вопрос о функциональном состоянии серотониновой системы мозга при впадении в спячку и в спячке оставался открытым, так как повышение количества серотонина в мозгу могло быть пассивным следствием понижения активности MAO.

Показателем функционального состояния серотониновой системы мозга может служить активность триптофангидроксилазы (ТПГазы)—триптофан-5-монооксигеназа: 1-триптофан, тетрагидроптеридин: кислородоксиредуктаза (5-гидроксилирующая) (КФ 1.14.16.4) [5], фермента, ограничивающего скорость синтеза серотонина [6]. Имеются данные о повышении активности ТПГазы в стволе мозга у находящихся в спячке хомяков [7] и сурков [8]. Наиболее информативным нам представляется изучение переходных состояний от бодрствования к спячке и от спячки к бодрствованию, когда происходят наиболее значительные изменения в регуляторных механизмах.

Целью настоящего исследования было изучение активности ТПГазы в различных отделах мозга при впадении в зимнюю спячку и при пробуждении от нее типичных зимоспящих—краснощеких сусликов.

### Материалы и методы

Исследование проводили на самцах и самках краснощеких сусликов (*Citellus erythrogenys*, Brandt) массой 200—350 г. Животных отлавливали в Новосибирской области и содержали в индивидуальных клетках на открытом воздухе. С наступлением холодов и впадением животных в состояние зимней спячки клетки переносили в специальное помещение, где поддерживали постоянную температуру 3—4°. Пробуждение животных вызывали, перенося их в помещение с температурой 22—25°.

Опыты проводили на бодрствующих животных в июне-июле, на готовых к залеганию в спячку (сентябрь), но еще активных нормотермных (температура тела не ниже 36°) животных, на впадающих в зимнюю спячку (сентябрь) при температуре тела 34—35° и 12°, на животных в состоянии зимней спячки (температура тела 2—4°) и на пробуждающихся животных при температуре тела 22 и 35°. Температуру тела измеряли в ободочной кишке с помощью электротермометра с чувствительностью 0,2°.

Животных декапитировали, быстро на холоде извлекали мозг и выделяли: гипоталамус, гиппокамп, полосатое тело и средний мозг. Отделы мозга помещали в жидкий азот, в котором хранили до момента определения. Активность ТПГазы в отделах мозга определяли флуорометрическим методом [9], основанным на определении количества серотонина, образующегося в результате гидроксилирования триптофана ТПГазой и последующего декарбоксилирования полученного 5-окситриптофана декарбоксилазой из почки свиньи. В качестве кофактора для ТПГазы использовали диметилтетрагидроптеридин («Calbiochem», Швейцария). При определении кинетических характеристик фермента ( $V$  и  $K_m$ ) 1-триптофан добавляли в пробу в диапазоне концентраций  $0,1 \cdot 10^{-3}$ — $1,6 \cdot 10^{-3}$  М. Для остальных опытов использовали 1-триптофан в концентрации, близкой к насыщающей ( $0,8 \cdot 10^{-3}$  М). Инкубацию проводили при 37° в отдельной серии экспериментов реакция гидроксилирования была поставлена при 7°—температуре, близкой к реальной температуре тела сусликов в состоянии зимней спячки. Активность фермента выражали в пмоль 5-окситриптофана/мин·мг белка.

Расчет кинетических характеристик фермента проводили по методу Иогансена-Ламри [10], а статистическую обработку результатов—с применением t-критерия Стьюдента [11].

### Результаты исследований

Активность ТПГазы в большинстве исследуемых отделов мозга сусликов значительно изменялась в зависимости от фазы цикла бодрствование—спячка. Эти изменения были выражены по-разному в различных структурах мозга (рис. 1). Процесс впадения в спячку сопровождался

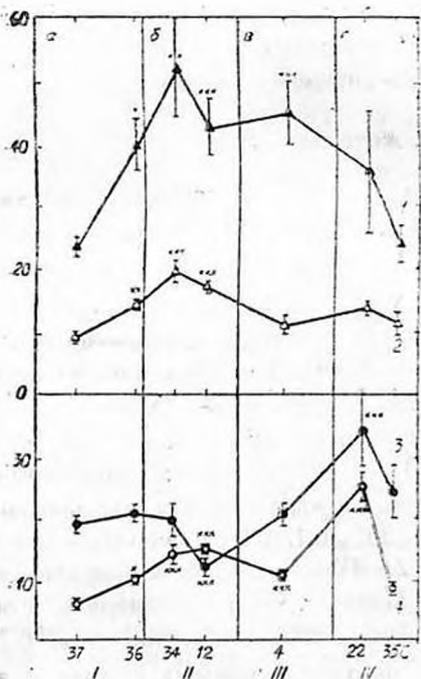


Рис. 1. Активность триптофангидроксилазы в разных отделах головного мозга сусликов в различные периоды цикла бодрствование—спячка. 1—средний мозг; 2—гиппокамп; 3—гипоталамус; 4—полосатое тело, а—активное бодрствование, б—впадение в спячку, в—спячка, г—пробуждение. По оси абсцисс—температура тела животных, по оси ординат—активность триптофангидроксилазы (μмоль/мин·мг), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с бодрствованием. В каждом опыте от 4 до 12 особей

повышением активности фермента в среднем мозгу, полосатом теле и гиппокампе. Важно подчеркнуть, что повышение активности ТПГазы в этих структурах наблюдали уже у сусликов, готовых к впадению в оячку, но находившихся еще в состоянии нормотермии; при дальнейшем впадении в спячку повышение усилилось. В то же время впадение в спячку сопровождалось кратковременным (при понижении температуры тела до 12°) снижением активности ТПГазы в гипоталамусе. Во время зимней спячки в среднем мозгу и полосатом теле активность ТПГазы оставалась повышенной ( $p < 0,001$ ), а в гиппокампе и гипоталамусе сохранялась на уровне бодрствующих животных.

Процесс пробуждения сопровождался постепенным снижением активности фермента в среднем мозгу до ее величины у бодрствующих животных. В полосатом теле наблюдали двукратное повышение активности фермента при достижении животными температуры тела 22° ( $p < 0,001$ ) и последующее быстрое ее падение. Сходную, хотя и менее выраженную

картину наблюдали в гипоталамусе. В гиппокампе во время пробуждения существенных изменений обнаружено не было.

Определение активности фермента при температуре инкубации  $7^{\circ}$  (рис. 2) показало, что в среднем мозгу и в гиппокампе, в пробах, взятых у находящихся в спячке сусликов, она оказалась выше, чем в пробах, взятых у активных животных. В полосатом теле и гипоталамусе различий в активности ТПГазы у находившихся в спячке и у бодрствовавших животных не обнаружено.

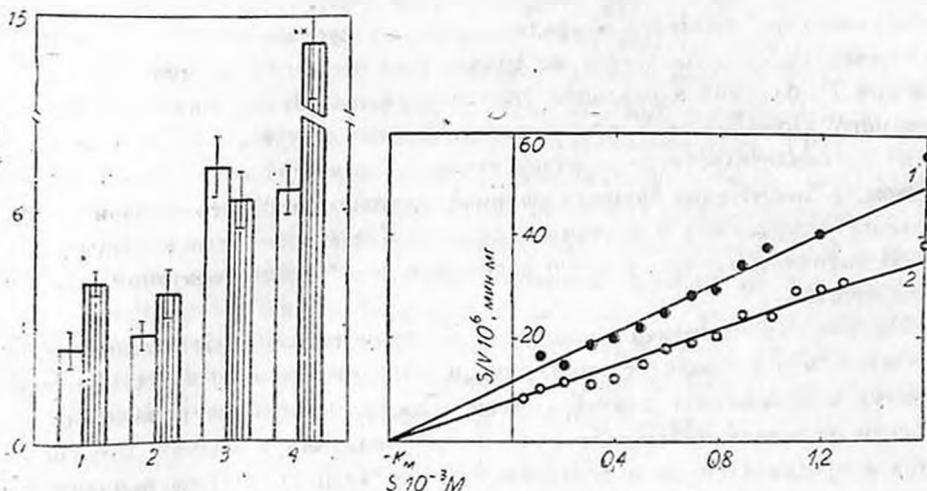


Рис. 2. Активность триптофангидроксилазы в отделах мозга бодрствовавших (светлые столбики) и находившихся в зимней спячке (заштрихованные столбики) сусликов при температуре инкубации  $7^{\circ}$ . 1—средний мозг, 2—полосатое тело, 3—гипоталамус, 4—гиппокамп. По оси ординат — активность триптофангидроксилазы (пмоль/мин·мг), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . В каждом опыте по 6 особей

Рис. 3. Линейная анаморфаза графика Михаэлиса-Ментен для активности триптофангидроксилазы в среднем мозгу у бодрствовавших (1) и находившихся в зимней спячке (2) сусликов.  $V_1 = 42,7 \pm 3,10$  пмоль/мин·мг;  $V_2 = 60,8 \pm 2,78$  пмоль/мин·мг ( $p < 0,001$ );  $K_{m1} = 0,52 \pm 0,07 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ;  $K_{m2} = 0,49 \pm 0,04 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  ( $p > 0,05$ ). По оси абсцисс —  $S \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , по оси ординат —  $S/V \cdot 10^6$  мг·мин

При определении кинетических характеристик фермента достоверных отличий в кажущейся  $K_m$  обнаружено не было, а величина  $V$  у животных, находившихся в спячке, значительно превышала такую у бодрствовавших ( $p < 0,001$ ) (рис. 3).

### Обсуждение результатов

Обнаруженные изменения активности ТПГазы существенно дополняют ранее высказанное предположение о повышении функциональной активности серотонинергической системы головного мозга при впадении животных в зимнюю спячку [2, 3].

Повышение активности ТПГазы в среднем мозгу, где локализовано основное скопление перикарионов серотониновых нейронов, в гиппокампе

# ALTERED ACTIVITY OF BRAIN TRYPTOPHAN HYDROXYLASE IN HIBERNATION AND AROUSAL

VORONOVA I. P., POPOVA N. K.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the USSR  
Academy of Sciences, Novosibirsk

We measured the activity of tryptophan hydroxylase (TPH), a key enzyme of serotonin biosynthesis, in hypothalamus, hippocampus, striatum and midbrain of red-cheeked *ground squirrels* at different phases of the wakefulness—hibernation cycle. TPH activity in different brain regions changed in uncoordinated manner. In most regions TPH activity increased soon after the onset of hibernation and decreased in arousal. The rise in TPH activity preceded the onset of hibernation. TPH activity in the midbrain and hippocampus of hibernating animals was higher even we used the assay temperature of 7 °C, which is close to the body temperature of the hibernating animal. The higher TPH activity appears to be associated with the increased amount of the enzyme, since  $V_{max}$  increases during hibernation, whereas  $K_m$  remains unchanged. These data provide evidence for the persistence of the functional activity of brain serotonin system during the onset of hibernation and support concept about its important role in hibernation.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пак Д. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 186—192, 1987.
2. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, с. 302, Новосибирск, Наука, 1978.
3. Попова Н. К., Voitko N. N. Pharm. Biochem. and Behav., v. 14, p. 773—777, 1981.
4. Попова Н. К., Кудрявцева Н. Н. Biogenic Amines, v. 2, № 3, p. 203—210, 1985.
5. Boadle-Biber M. C., Johannessen G. N., Narasimhachari N., Tam-Huo Phan. Biochem. Pharmacol., v. 32, № 1, p. 185—188, 1983.
6. Lovenberg W., Jequier E., Sjoerdsma A. Science, v. 155, p. 217—219, 1967.
7. Duncan R. J. S., Tricklebank M. D. J. Neurochem., v. 31, p. 553—556, 1978.
8. Young R. A., Robinson D. S., Vagenakis A. G., Saavedra J. M., Lovenberg W., Крып Р. Р., Danforth E. Comp. Biochem. and Physiol., v. 63 C, p. 319—323, 1979.
9. Куликов А. В. Вopr. мед. химии, т. 29, с. 135, 1982.
10. Корниш-Бюден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
11. Закс А. Статистическое оценивание, М., Статистика, 1976.
12. Штарк М. Б. Мозг зимнеявщих, Новосибирск, Наука, 1970.
13. South F., Heath J., Luecke R., Mihailovic L., Myers R., Panuska J., Williams R.—In: Hibernation and hypothermia, perspectives and challenges, p. 629—633, Amsterdam, 1972.
14. Кудрявцева Н. Н., Попова Н. К. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 78, № 4, с. 44—47, 1973.
15. Кудрявцева Н. Н. Об участии серотонина в механизмах зимней спячки. Канд. дис., Новосибирск, 1976.
16. Попова Н. К., Lobacheva I. I., Karmanova I. G., Shilling N. V. Pharm. Biochem. and Behav., v. 20, p. 653—657, 1984.
17. Колпаков В. Г., Куликов А. В., Барыкина Н. Н., Алекина Т. А., Попова Н. К. Biogenic Amines, v. 2, № 2, p. 131—136, 1985.

Поступила 7. IV 1988

# ALTERED ACTIVITY OF BRAIN TRYPTOPHAN HYDROXYLASE IN HIBERNATION AND AROUSAL

VORONOVA I. P., POPOVA N. K.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the USSR  
Academy of Sciences, Novosibirsk

We measured the activity of tryptophan hydroxylase (TPH), a key enzyme of serotonin biosynthesis, in hypothalamus, hippocampus, striatum and midbrain of red-cheeked *ground squirrels* at different phases of the wakefulness—hibernation cycle. TPH activity in different brain regions changed in uncoordinated manner. In most regions TPH activity increased soon after the onset of hibernation and decreased in arousal. The rise in TPH activity preceded the onset of hibernation. TPH activity in the midbrain and hippocampus of hibernating animals was higher even we used the assay temperature of 7 °C, which is close to the body temperature of the hibernating animal. The higher TPH activity appears to be associated with the increased amount of the enzyme, since  $V_{max}$  increases during hibernation, whereas  $K_m$  remains unchanged. These data provide evidence for the persistence of the functional activity of brain serotonin system during the onset of hibernation and support concept about its important role in hibernation.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пак Д. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 186—192, 1987.
2. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, с. 302. Новосибирск, Наука, 1978.
3. Popova N. K., Vottenko N. N. Pharm. Biochem. and Behav., v. 14, p. 773—777, 1981.
4. Popova N. K., Kudryavtseva N. N. Biogenic Amines, v. 2, № 3, p. 203—210, 1985.
5. Boadle-Biber M. C., Johannessen G. N., Narasimhachari N., Tam-Hao Phan. Biochem. Pharmacol., v. 32, № 1, p. 185—188, 1983.
6. Lovenberg W., Jequier E., Sjoerdsma A. Science, v. 155, p. 217—219, 1967.
7. Duncan R. J. S., Tricklebank M. D. J. Neurochem., v. 31, p. 553—556, 1978.
8. Young R. A., Robinson D. S., Vagenakis A. G., Saavedra J. M., Lovenberg W., Krupp P. P., Danforth E. Comp. Biochem. and Physiol., v. 63 C, p. 319—323, 1979.
9. Куликов А. В. Вопр. мед. химии, т. 29, с. 135, 1982.
10. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
11. Закс Л. Статистическое оценивание, М., Статистика, 1976.
12. Штарк М. Б. Мозг зимнеящих, Новосибирск, Наука, 1970.
13. South F., Heath J., Luecke R., Mihailovic L., Myers R., Panuska J., Williams R.—In: Hibernation and hypothermia, perspectives and challenges, p. 629—633, Amsterdam, 1972.
14. Кудрявцева Н. Н., Попова Н. К. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 78, № 4, с. 44—47, 1973.
15. Кудрявцева Н. Н. Об участии серотонина в механизмах зимней спячки. Канд. дис., Новосибирск, 1976.
16. Popova N. K., Lobacheva I. I., Karmanova I. G., Shilling N. V. Pharm. Biochem. and Behav., v. 20, p. 653—657, 1984.
17. Колпаков В. Г., Куликов А. В., Барикина Н. Н., Алекина Т. А., Попова Н. К. Biogenic Amines, v. 2, № 2, p. 131—136, 1985.

Поступила 7. IV 1988