

## ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ И АМИНОКИСЛОТЫ В НЕОКОРТЕКСЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *Urocitellus undulatus* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ГИБЕРНАЦИИ

© 2024 г. М.В. Каранова\*.,# , Н.М. Захарова\*

\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра  
«Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
ул. Институтская, 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: karanovari@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 07.12.2023 г.

Работа является продолжением проведенного авторами исследования изменения пулов аминокислот миокарда сусликов во время зимней спячки. Изучены нейрохимические профили аминокислот и вторичных метаболитов (таурина, фосфосерина и цистеиновой кислоты) в неокортексе суслика на разных стадиях оцепенения: в начале торпора (2–3 суток) и при длительном торпоре (9–10 суток), а также во время кратковременного зимнего пробуждения (зимней активности, эутермии). Во время оцепенения (в его начале и в конце соответственно) наблюдалось скоординированное снижение возбуждающих нейротрансмиттеров (глутамата – на 7 и 14%; аспартата – на 25 и 52%) и увеличение главного ингибитора трансмиссии – гамма-аминомасляной кислоты (на 50 и 67%). Количество аланина, незначительное в летнем неокортексе, в начальной стадии оцепенения и после длительного оцепенения увеличивалось (на 98 и 126% соответственно), свидетельствуя о частичном переключении на анаэробный гликолиз. Уровень названных субстанций во время кратковременной межбаутной эутермии возвращался к контрольному. Поведение участников анаплеротических реакций цикла трикарбоновых кислот, глутамата и аспартата, во время торпора и зимней активности было аналогично их ответам в миокарде, но отличалось количественно. Ответы нейромодуляторов глицина, треонина и лизина отличались радикально в сравнении с их ответами в миокарде. Изменения пулов таурина и фосфосерина не выявлены, но уровень цистеиновой кислоты снижался, по сравнению с летним контролем, от  $0.51 \pm 0.06$  мкмоль/г до  $0.07 \pm 0.01$  мкмоль/г в конце торпора, а во время зимней эутермии увеличивался и становился в 2 раза ниже летнего уровня. Полученные данные показывают, что метаболические пути, в которых участвуют анаплеротические аминокислоты неокортекса, сохраняют, по сравнению с миокардом, большую активность во время зимней спячки, при этом пулы нейромодуляторов, регулирующих процессы торможения, увеличиваются.

*Ключевые слова:* гибернация, оцепенение, длиннохвостый суслик, неокортекс, миокард, аминокислоты, энергетический метаболизм.

DOI: 10.31857/S0006302924010026, EDN: RJBVNH

Характерные для гетеротермов изменения биохимического и гормонального статуса, процессы погружения в спячку и пробуждения в конце баута находятся не только под контролем гормонов и нейропептидов, но и в первую очередь центральной нервной системы (ЦНС). Согласно литературным данным, амплитуда электроэнцефалограммы (ЭЭГ) начинает изменяться задолго до снижения температуры тела, и до начала спяч-

ки, соответственно, изменяется и метаболизм [1, 2]. Предполагается, что активность структур мозга изменяет не температура; напротив, изменение активности мозга инициирует снижение внутренней температуры [3]. В состоянии глубокого торпора электрическая активность в мозге не регистрируется, но при этом осуществляется скоординированная экспрессия множества белков, необходимых для обеспечения жизнеспособности мозга при пробуждении [4].

Основной мишенью для холодового воздействия гомойотермных млекопитающих является ЦНС, клетки которой теряют активность даже

*Сокращения:* ЦНС – центральная нервная система, ЭЭГ – электроэнцефалограмма, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

при непродолжительном (1,5 ч) охлаждении. Вслед за этим начинается глобальная дендритная регрессия: отек нейропиля, потеря очертаний клеточных тел дендритных отростков, исчезновение митохондриальных крист, синаптических пузырьков и разрушение клеточного скелета [5]. Однако нервная ткань гибернирующих сусликов в тех же условиях остается неповрежденной [6]. Предполагается, что нарушение нервной активности при охлаждении гомойотермных животных связано со значительным нарастанием концентрации  $K^+$  во внеклеточном пространстве [7]. Возможно, у гибернирующих животных регулятором экстраклеточного  $K^+$  может выступать глия, плотность которой у длиннохвостых сусликов в 3 раза выше, чем, например, у морских свинок [6, 8].

При гибернации наблюдаются значительные изменения не только в метаболизме, но и в экспрессии генов на уровне транскрипции, при этом сложную закономерность демонстрирует изменение экспрессии на протяжении нескольких стадий цикла оцепенения-пробуждения [9]. В головном мозге летучих мышей *Rhinolophus ferrumequinum* в состоянии спячки обнаружена сверхэкспрессия 41 гена; 17 из них известны, они имеют отношение к регуляции клеточного цикла и апоптоза, росту нейронов, переносу сигналов и нейропротекции [10].

Окислительно-восстановительные процессы тесно связаны с метаболизмом аминокислот. Аминокислоты служат строительными блоками белка; они функционируют во всем организме как ключевые метаболиты, предшественники других метаболитов и липидов, а также регуляторы экспрессии генов и клеточной сигнализации [11]. В ЦНС аминокислоты могут также играть специализированные роли — нейротрансмиттеров, нейромодуляторов, предшественников других низкомолекулярных нейротрансмиттеров [11]. Состав аминокислот в норме обладает высоким постоянством и специфичностью, но значительные перестройки защитно-адаптивных механизмов сопровождаются его изменением. Мозг формирует пул аминокислот, значительную часть которых он получает из печени через кровеносное русло. Благодаря наличию специфических транспортеров и избирательному активному переносу через гематоэнцефалический барьер, между кровью и мозгом имеется высокий концентрационный градиент аминокислот. Профиль свободных протеиногенных аминокислот, а также ряда вторичных метаболитов является уникальной характеристикой каждого органа для каждого вида животных; его изменение имеет закономерности в процессе эволюции и не только: каждая стадия гибернации зимнеящих животных и каждый их орган отличаются специфиче-

скими особенностями аминокислотного профиля [12–15].

Изучение механизмов естественной адаптации к низким температурам имеет большое теоретическое и практическое значение, так как гетеротермные млекопитающие переносят тяжелую гипоксию, а также различные поражения ЦНС лучше, чем гомойотермные. Толерантность к гипоксии и гипотермии заложена в фундаментальных основах работы мозга, и выяснение ее механизмов ждет применения в медицинских и биотехнологических целях [16]. Изучение поведения аминокислот в разных органах во время оцепенения и кратковременного пробуждения (эутермия) должно способствовать дополнительному пониманию глубинных процессов, происходящих во время зимней спячки.

Опубликовано несколько работ, посвященных изменению аминокислотных пулов мозга зимнеящих во время гибернации, но эти данные в основном не полные и отчасти противоречивые. В большинстве работ изучались профили небольшого числа аминокислот, или исследовались показатели только одной стадии оцепенения либо не использовался период изотермии у гетеротермов в качестве контроля [1, 17–19]. Кроме того, в литературе отсутствует информация об участии в гибернации серо- и фосфоросодержащих вторичных метаболитов, таких как фосфосерин, цистеиновая кислота или, возможно, другие.

Цель данного исследования состояла в получении уточняющей и дополнительной информации об участии свободных аминокислот мозга гетеротермов в адаптации к гипометаболическому состоянию в разных стадиях зимней спячки. Вторая цель заключалась в выявлении участия фосфоро- и серосодержащих вторичных метаболитов неокортекса в процессах оцепенения и кратковременной зимней эутермии.

Задача работы:

– Изучить и сравнить ответы свободных аминокислот в неокортексе гетеротермных длиннохвостых сусликов в начале оцепенения (на 2-3-и сутки), через 9-10 суток оцепенения и во время кратковременных пробуждений (эутермии), в сравнении с летним контролем.

– Изучить участие в процессах гибернации вторичных метаболитов.

– Сравнить полученные данные с аналогичными результатами, полученными ранее на миокарде и скелетных мышцах этих же сусликов в тот же исследуемый период.

– Обсудить ответы аминокислот на разных стадиях, учитывая литературные данные о функции каждой из них в мозге.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовались взрослые длиннохвостые суслики (*U. undulatus*) мужского пола, масса тела  $613 \pm 60$  г. Животных доставляли из Якутии в конце августа. До конца октября сусликов содержали индивидуально в специально оборудованном виварии при естественной фотопериодичности с достаточным запасом пищи и воды. В период спячки животные находились в темном помещении при температуре окружающей среды от 0 до  $2^\circ\text{C}$ . Для мониторинга баутов в гибернационный период часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики ( $20 \times 20 \times 25$  см), в дно которых был установлен термистор (чувствительность  $0.2^\circ\text{C}$ ). Во время спячки температура подстилки достигала  $1-4^\circ\text{C}$ , тогда как при кратковременных периодах эутермии повышалась до  $14^\circ\text{C}$ .

Суслики состояли из 4 групп:

1-я группа ( $n = 6$ ) – бодрствующие активные животные в летний период (июнь), контроль;

2-я группа ( $n = 6$ ) – торпор, 2–3 суток (начало спячки), при ректальной температуре от 0.2 до  $0.4^\circ\text{C}$ ; декабрь, январь;

3-я группа ( $n = 6$ ) – торпор, 9–10 суток, при ректальной температуре от 0.2 до  $0.4^\circ\text{C}$ ; декабрь–январь;

4-я группа ( $n = 5$ ) – спонтанно пробудившиеся зимние активные животные, температура тела  $37,6^\circ\text{C}$  (зимняя эутермия).

Перед декапитацией торпидных животных взвешивали и измеряли ректальную температуру, после декапитации измеряли температуру в области сердца и мозга. Регистрацию ректальной температуры осуществляли с помощью специализированного датчика RET-2, температуру в области сердца и мозга измеряли с помощью датчика RET-3 (Physitemp, США, точность  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). После извлечения неокортекса биоматериал гомогенизировали в 0.5 н холодной хлорной кислоте (1 : 9) и центрифугировали при температуре  $4^\circ\text{C}$  20 мин при 20000 об/мин на центрифуге Centricon (США). Супернатант нейтрализовали 2 н раствором КОН и снова центрифугировали. Конечный супернатант хранили для дальнейшего анализа в Криобанке ИБК РАН.

Операции для активных сусликов проводили под наркозом с Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг внутримышечно); были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Состав и количество свободных аминокислот определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии [20] на модульном хроматографе Infinity LC-1260 (Agilent, США). Разделение смеси аминокислот осуществляли на колонке с трехступенчатым градиентом натрий-цитратного бу-

фера: № 1 – 0.3 н, рН 2.98; № 2 – 0.4 н, рН 3.81; № 3 – 0.45 н, рН 9.97. Диапазон температуры от 55 до  $74^\circ\text{C}$ . Стационарная фаза: сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.45 мл/мин. Послеклоночная модификация аминокислот выполнялась с нингидрином; интенсивность окрашивания измеряли при 570 нм. Для каждой серии экспериментов делали хроматограмму стандартной смеси аминокислот; концентрация каждой из вносимых аминокислот составляла 2.5 нмоль. Содержание свободных аминокислот выражали в мкмоль/г влажной массы. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Для сравнения независимых измерений использовали *U*-тест Манна–Уитни. Данные выражали как среднее значение параллельных измерений, собранных в ходе трех выборочных анализов; для каждого анализа (пробы) использовано 2 животных ( $n = 6$ ). Значения представлены как средние  $\pm$  SEM.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольшее количество в содержании всех аминокислот головного мозга приходится на долю главного возбуждающего нейромедиатора – глутамата, участвующего в проведении основных потоков информации в ЦНС и обслуживающего около 40% всех нейронов. Вследствие эксайтотоксичности прохождение глутамата через гематоэнцефалический барьер имеет некоторые ограничения на аблюминальной мембране эндотелиальных клеток внутренней оболочки сосудов [21], и в экстрацеллюлярном пространстве мозга поддерживается низкая концентрация глутамата. Транспорт глутамата – энергозависимый процесс, осуществляемый как минимум пятью  $\text{Na}^+$ -зависимыми транспортными системами, располагающимися, в зависимости от типа переносчика, в различных клетках мозга: эндотелии, астроцитах, нейронах [22]. С помощью переносчиков глутамат и глутамин перемещаются между клетками, причем глутамат для поддержания низкой внеклеточной концентрации аккумулируется внутри астроглии, где и метаболизируется [23].

Специфику метаболизма каждого вида животных и каждого органа определяют устойчивые количественные соотношения между свободными аминокислотами. Особенность метаболизма мозга млекопитающих, в частности длиннохвостого суслика, отражена в нейрохимическом профиле аминокислот неокортекса в изотермическом статусе, представленном в табл. 1. Сравнение этих

**Таблица 1.** Пулы заменимых аминокислот в неокортексе длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации

Аминокислота	Контроль (июнь)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность (активные)
Аспаргат	1.80 ± 0.15	1.35 ± 0.10*	0.86 ± 0.07*	1.82 ± 0.16
Серин	0.25 ± 0.2	0.34 ± 0.03*	0.38 ± 0.03*	0.30 ± 0.03
Глутамат	9.20 ± 0.70	8.55 ± 0.71	8.05 ± 0.58	9.08 ± 0.75
Глицин	0.50 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.06
Аланин	0.53 ± 0.04	1.05 ± 0.06*	1.73 ± 0.15*	0.24 ± 0.02*
Цистин	0.25 ± 0.02	следовое количество	следовое количество	следовое количество
ГАМК	2.12 ± 0.25	3.17 ± 0.20*	3.55 ± 0.25*	1.90 ± 0.16

Примечание. Значения даны в мкмоль/г сырой массы. Контроль – летние активные животные в июне ( $n = 6$ ); торпор I (2–3 суток от начала спячки,  $n = 6$ ); торпор II (9–10 суток спячки,  $n = 6$ ); зимняя активность – кратковременное пробуждение, эутермия ( $n = 5$ ). Температура мозга сусликов от 1.6 до 2.0°C. \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь). Глутамин и фенилаланин не обнаружены по техническим причинам.

профилей на разных стадиях оцепенения выявляет значительные изменения содержания вышеназванных метаболитов, связанных одновременно и с энергетикой, и с синаптической передачей – глутаминовой кислоты, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и аспартата. Для этого профиля в норме (в данном случае это летние измерения) характерно очень высокое содержание глутамата ( $9.20 \pm 0.70$  мкмоль/г) и в 17.3 раза ниже – содержание аланина. Аспаргат составляет 1/5 часть пула глутамата, а количество ГАМК – в 4.3 раза меньше глутамата. Уровень глицина находится на уровне аланина ( $0.50 \pm 0.04$  мкмоль/г). Приблизительно такое же соотношение характерно в норме и для миокарда этих животных [12], за исключением отсутствующей ГАМК (рис. 1–4). Такое сходство в пропорции основных аминокислот в неокортексе и миокарде примечательно с учетом того, что источники энергии в сердце и мозге разные: преобладание  $\beta$ -окисления жирных кислот – в сердце [24], окисление глюкозы – в мозге [25].

Характер ответов наиболее ярких участников энергетического метаболизма, глутамата и аспартата, в разные периоды гибернации аналогичен наблюдаемому в миокарде [12], но отличается количеством (табл. 2). Обе аминокислоты уменьшают свои пулы во время торпора: глутамат от летнего уровня  $9.20 \pm 0.70$  мкмоль/г снижается соответственно до  $8.55 \pm 0.71$  и  $8.05 \pm 0.58$  мкмоль/г в начале и в конце торпора, а во время эутермии возвращается к исходному уровню, до  $9.08 \pm 0.75$  мкмоль/г.

Концентрация аспарагиновой кислоты падает от летней,  $1.80 \pm 0.15$  мкмоль/г, до  $1.35 \pm 0.10$  и  $0.86 \pm 0.07$  на разных стадиях оцепенения и возвращается к исходному уровню при зимнем пробуждении ( $1.82 \pm 0.16$  мкмоль/г). Снижение активности аспартата может быть следствием снижения активности цикла Кребса, точнее, производства оксалоацетата и его переаминирования с образованием аспарагиновой кислоты. Снижение глутамата можно интерпретировать таким же образом, хотя оно может быть связано и с увеличением концентрации глутамина, который образуется в астроглии.

Конечно, в неокортексе нет и быть не может «сердечного» свойства реципрокного соотношения глутамата и аланина, постоянства суммы их количества. Глутамат убывает во время торпора в начале и конце гипотермии на 7 и 12% (рис. 1), при этом сохраняется его большой пул, поддерживающий необходимый уровень метаболизма мозговой ткани во время оцепенения. Как и в миокарде [12], снижение глутамата в неокортексе коррелирует с нарастанием аланина: от летнего уровня  $0.53 \pm 0.44$  мкмоль/г до  $1.05 \pm 0.06$  в начале торпора и до  $1.73 \pm 0.15$  мкмоль/г к концу оцепенения, т.е. на 98 и 226% соответственно (табл. 2, рис. 1). Во время кратковременной эутермии между оцепенениями уровень аланина падает и становится даже меньше, чем летом ( $0.24 \pm 0.02$  мкмоль/г).

Тормозные процессы требуют от нейронов значительной мобилизации энергетических за-

**Таблица 2.** Пулы незаменимых аминокислот в неокортексе длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации

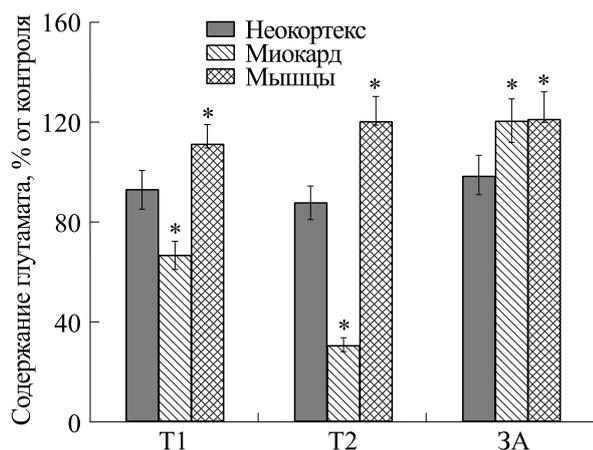
Аминокислоты	Контроль (июнь)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность (эутермия)
Треонин	0.114 ± 0.010	0.195 ± 0.030*	0.260 ± 0.020*	0.080 ± 0.006*
Гистидин	0.130 ± 0.009	0.101 ± 0.017*	0.0410 ± 0.0036*	0.110 ± 0.010*
Валин	0.165 ± 0.024	0.138 ± 0.016	0.154 ± 0.015	0.145 ± 0.014
Метионин	0.184 ± 0.016	0.1400 ± 0.0147*	0.150 ± 0.022	0.185 ± 0.020
Изолейцин	0.0200 ± 0.0017	0.0090 ± 0.0009*	0.0760 ± 0.0071*	0.0900 ± 0.0093*
Лейцин	0.0440 ± 0.0035	0.044 ± 0.004	0.035 ± 0.003	0.0400 ± 0.0035
Тирозин	0.057 ± 0.006	0.035 ± 0.003*	0.0270 ± 0.0023*	0.0470 ± 0.0049
Лизин	0.180 ± 0.016	0.303 ± 0.025*	0.390 ± 0.033*	0.133 ± 0.012*

Примечание. Значения даны в мкмоль/г сырой массы. Контроль – летние активные животные в июне ( $n = 6$ ); торпор I (2–3 суток от начала спячки,  $n = 6$ ); торпор II (9–10 суток спячки,  $n = 6$ ); зимняя активность – кратковременное пробуждение, эутермия ( $n = 5$ ). Температура мозга сусликов от 1.6 до 2.0°C. \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь). Глутамин и фенилаланин не обнаружены по техническим причинам.

трат. В мозге ГАМК – универсальный тормозной нейромедиатор высших и низших позвоночных животных, функционирование которого связывают с подавлением метаболизма. ГАМК востребован постоянно и присутствует в значительном количестве, составляя четвертую-пятую часть от количества глутамата. В неокортексе суслика при

нормотермии уровень ГАМК составляет  $2.12 \pm 0.25$  мкмоль/г (табл. 2); во время оцепенения возрастает до  $3.55 \pm 0.25$  мкмоль/г. Межаутная эутермия уменьшает пул ГАМК более чем до исходного уровня, до  $1.90 \pm 0.16$  мкмоль/г.

Простейшая аминокислота глицин является тормозным нейротрансмиттером спинного мозга, ствола головного мозга и мозжечка, при этом она присутствует во всех отделах мозга, но с другими функциями, выполняя, например, роль коагониста глутамата, модулятора ионотропных глутаматных *N*-метил-*D*-аспаратных рецепторов (NMDA-рецепторов) и способствуя передаче сигнала от нейромедиаторов глутамата и аспартата [26]. Кроме того, глицин стимулирует выделение ГАМК. Глициновые рецепторы имеются во многих участках головного мозга. В летнее время глицин присутствует в неокортексе в существенном количестве,  $0.50 \pm 0.04$  мкмоль/г (табл. 1), сопоставимом с пулом глицина в миокарде [12], причем во время оцепенения и в активное летнее время баланс глицина практически одинаков (табл. 2), в отличие от миокарда, где во время торпора (вероятно, даже перед его началом) пул глицина снижается до минимального значения. При гипометаболическом состоянии отсутствие изменения или повышение внеклеточной концентрации тормозных нейромедиаторов может быть одним из важных звеньев подавления электриче-



**Рис. 1.** Содержание глутамата в неокортексе, миокарде и скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 – начало торпора; T2 – конец торпора; ЗА – зимняя активность (эутермия). \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь).

**Таблица 3.** Вторичные метаболиты в неокортексе длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации

Вторичные метаболиты	Контроль (июнь)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность (эутермия)
НВ	следы	следы	следы	следы
Цистеиновая кислота	0.51 ± 0.06	0.12 ± 0.02*	0.07 ± 0.01*	0.25 ± 0.02*
Фосфосерин	1.42 ± 0.10	1.43 ± 0.16	1.22 ± 0.11	1.05 ± 0.07*
Таурин	1.52 ± 0.14	1.60 ± 0.15	1.70 ± 0.16	1.65 ± 0.16

Примечание. Значения даны в мкмоль/г сырой ткани. Контроль – летние активные животные в июне ( $n = 6$ ); торпор I (2–3 суток от начала спячки,  $n = 6$ ); торпор II (9–10 суток спячки,  $n = 6$ ); зимняя активность – кратковременное пробуждение, эутермия ( $n = 5$ ). Температура мозга сусликов от 1.6 до 2.0°C. \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь). Глутамин и фенилаланин не обнаружены по техническим причинам. НВ – неизвестное вещество, высота пика которого составляет приблизительно 1/10 от высоты пика цистеиновой кислоты.

ской активности, позволяющим снижать потребление энергии.

Динамика изменения пулов незаменимых аминокислот в неокортексе во время зимней спячки представлена в табл. 2. Глюкогенная гидроксикаминокислота треонин регулирует нейротрансдукцию в головном мозге и используется для синтеза глицина во время эндогенной выработки L-карнитина. Аналогично другой гидроксикаминокислоте, серину (табл. 1), треонин увеличивается во время торпора от летнего уровня  $0.114 \pm 0.010$  мкмоль/г до  $0.195 \pm 0.030$  и  $0.260 \pm 0.020$  мкмоль/г (табл. 2). При кратковременном пробуждении уровень треонина падает до  $0.080 \pm 0.006$  мкмоль/г.

Среди других незаменимых аминокислот ярко выражено увеличение количества лизина, от летнего  $0.180 \pm 0.016$  до  $0.390 \pm 0.033$  мкмоль/г при длительном торпоре (табл. 2). При кратковременных пробуждениях пул лизина уменьшился в 3 раза и составил  $0.133 \pm 0.012$  мкмоль/г. Содержание других незаменимых аминокислот менялось незначительно или оставалось постоянным, что еще раз доказывает эффективность гомеостатического механизма пула свободных аминокислот мозга.

Вторичные метаболиты, наблюдаемые в данной работе, выходят первыми из хроматографической колонки в последовательности: цистеиновая кислота, фосфосерин, таурин. Изменения их пулов на разных стадиях представлено в табл. 3. Сульфаминокислота таурин (табл. 3) известна как низкотемпературный протектор многих органов беспозвоночных и позвоночных, включая рыб и рептилий [27, 28]. Часть адаптогенных

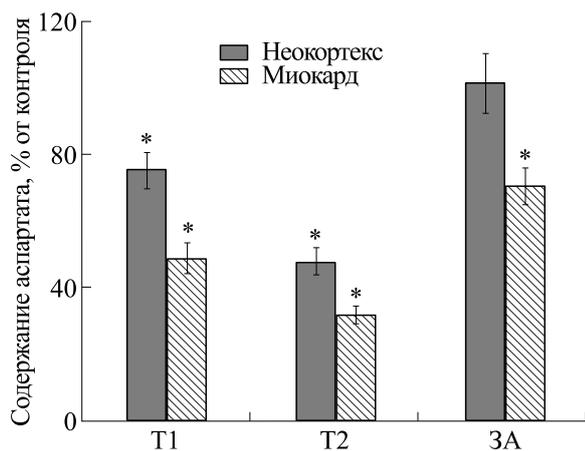
функций таурин сохраняет и у млекопитающих, но, вероятно, уже в модифицированном виде. Несмотря на то что таурин проходит через гематоэнцефалический барьер, в мозге рыб его количество в зимнее время снижается, в отличие от мышечной ткани, в несколько раз увеличивающей пул [27]. У гетеротермных сусликов летний и зимний уровни таурина в мозге довольно высокие, но практически не изменяются на протяжении зимней спячки:  $1.52 \pm 0.14$ ,  $1.70 \pm 0.16$  и  $1.65 \pm 0.16$  мкмоль/г летом, в период длительного торпора и во время зимней эутермии соответственно (табл. 3).

Не изменяет пулы фосфосерин, сложный эфир серина и фосфорной кислоты (табл. 3). Известно, что в синапсах мозга из фосфосерина образуется D-серин, составляющий в мозге 1/3 от L-серина и играющий важную роль в процессах обучения и памяти [29].

Значительно снижается концентрация цистеиновой кислоты:  $0.51 \pm 0.06$ ,  $0.12 \pm 0.02$ ,  $0.07 \pm 0.01$  и  $0.25 \pm 0.02$  мкмоль/г летом, в начале и в конце торпора и во время эутермии соответственно (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

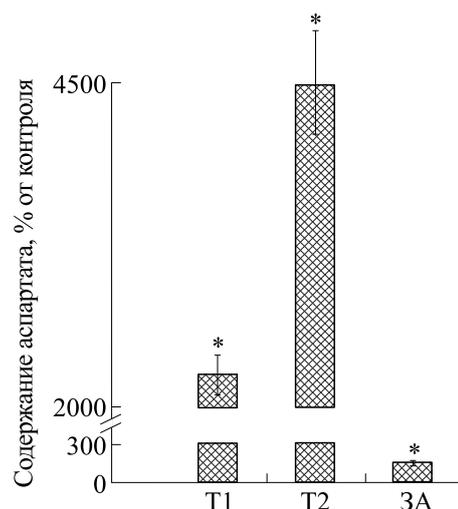
Высокая интенсивность энергетического метаболизма мозга существенно отличается от энергетики сердца, которая на 65–70% поддерживается за счет окисления жирных кислот [24, 30]. В отличие от сердца, основным источником генерации АТФ в мозге служит аэробное окисление глюкозы, запасы которой в нем невелики (2.5–4.0 мкмоль/г), а потребности мозга в энер-



**Рис. 2.** Содержание аспартага в неокортексе и миокарде длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 – начало торпора; T2 – конец торпора; 3A – зимняя активность (эутермия). \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь).

гии очень высоки [25], поэтому глюкоза, синтезированная в печени, с помощью транспортеров с высоким сродством (GLUT1), постоянно поступает в мозг [31]. Лишь при продолжительном голодании клетки мозга начинают использовать дополнительный источник энергии — кетоновые тела [32].

Несмотря на очень низкую скорость метаболизма во время оцепенения,  $^{14}\text{C}$ - и  $^{13}\text{C}$ -глюкоза, поступающая в кровь, транспортируется через гематоэнцефалический барьер и менее чем через 1 ч после внутривенной инфузии метаболизируется до лактата [19]. В присутствии кислорода лактат превращается в пируват, который поступает в митохондрии, в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Таким образом, мозговая ткань гибернаторов во время торпора сохраняет функциональный пируватдегидрогеназный комплекс и, следовательно, функцию ЦТК. Несмотря на то что расход энергии торпидного мозга низок (в отличие от эутермного) и отсутствуют потенциалы действия, как и многие процессы биосинтеза, синтез лактата и его использование в ЦТК для производства глутамата, ГАМК и глутамина является непрерывным метаболическим процессом [11]. Взаимосвязанное снижение в начальной стадии торпора и в его конце содержания глутамата и аспартага, участников анаэробных реакций ЦТК, подтверждает этот вывод (табл. 1). Важно отметить, что характер ответов глутамата и аспартага на низкие температуры в неокортексе аналогичен их ответам в миокарде, вследствие участия в аэробном ЦТК, несмотря на то что их источники энергии различны: жирные кислоты (для миокарда) и глюкоза (для мозга). Однако в количественном отношении различия значительны: во время оце-



**Рис. 3.** Содержание аспартага в скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 – начало торпора; T2 – конец торпора; 3A – зимняя активность (эутермия). \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь) [13].

пенения уровень глутамата в миокарде падает на 33 и 69% (рис. 1), а аспартага — на 51 и 68% (рис. 2) [12]. Следует учесть, что нейротрансмиттерная функция глутамата и аспартага составляет около одного процента всех остальных их функций, и количественный вклад этой доли трансмиттеров в уменьшение пулов вряд ли ощутим. Но как же радикально отличается характер ответов этих аминокислот в неокортексе от их ответов в мышечной ткани! Глутамат на обеих стадиях оцепенения практически не изменяется (рис. 1), отражая фундаментальное отличие путей синтеза АТФ (гликолиз) от путей, доминирующих в неокортексе и миокарде (ЦТК). И, наряду с этим, сенсационный и непредсказуемый взлет количества аспартага в скелетных мышцах: в 22.5 раза в начальной стадии торпора и в 45 раз в его конце (рис. 3) [13]. Имея в виду состояние покоя, в котором находятся мышцы во время длительного оцепенения, и низкий уровень метаболизма, предполагающий активацию процессов образования активных форм кислорода, можно достаточно уверенно предположить антиоксидантную функцию аспартага в мышечной ткани во время торпора и ее исключительное значение.

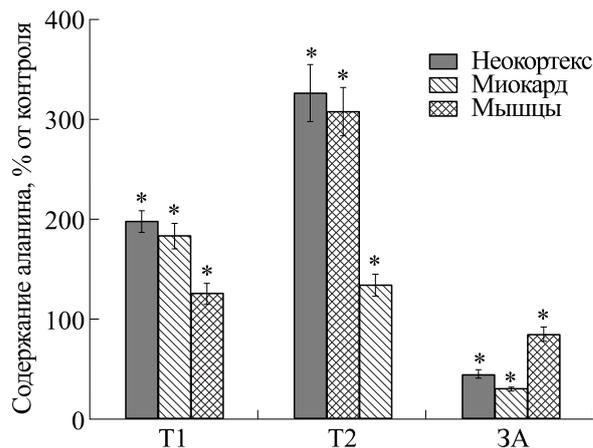
Ткани неокортекса, миокарда и мышц во время оцепенения в той или иной степени испытывают состояние гипоксии, вероятно, возрастающее по мере увеличения продолжительности торпора. Небольшая потребность в АТФ во время гипоксии обеспечивается гликолизом, а изменение уровня аланина характеризует интенсивность гликолиза. На рис. 4 представлено количественное участие аланина (в процентах от контроля),

отражающее вклад гликолиза в поддержание энергетического равновесия этих тканей.

Кажется удивительным и, может быть, даже парадоксальным: высокий процент увеличения аланина (98 и 226% в неокортексе, 83 и 207% в миокарде) наблюдается именно в тех органах, где в норме идет аэробное окисление (ЦТК и окислительное фосфорилирование). Но во время оцепенения эти органы все равно функционируют, хотя и в замедленном режиме, для которого необходимо меньшее количество АТФ, и оно обеспечивается в процессе гликолиза. Однако мышцы, для которых гликолиз в норме является доминирующим источником АТФ, во время оцепенения бездействуют, их метаболизм находится на более низком уровне, чем в неокортексе и миокарде, и небольшое увеличение содержания аланина (максимум на 34%) отражает вялотекущий процесс анаэробного окисления.

Другой особенностью энергетики мозга является ГАМК-шунт — альтернативный вариант и важный этап [33, 34]. Превращения ГАМК-шунта состоят в трансаминировании  $\alpha$ -кетоглутарата в глутамат, в декарбоксилировании глутамата с образованием ГАМК, в образовании янтарного полуальдегида из ГАМК и его окислении до сукцината, который далее окисляется в ЦТК. Таким образом, в этом шунте ГАМК может использоваться в качестве энергетического субстрата. ГАМК-шунт отличается от универсальной последовательности ЦТК отсутствием реакции образования сукцинил-КоА, связанной с субстратным фосфорилированием, но характеризуется появлением возможности синтезировать нейромедиатор ГАМК [35]. Подобные механизмы наиболее ярко проявляются в глутамат- и ГАМК-эргических нейронах и окружающих их астроцитах [36].

Торможение — активный процесс, требующий собственных нервных клеток, собственных синопсов, собственных медиаторов и модуляторов. На торможение мозг тратит энергии, возможно, даже больше, чем на возбуждение. Учитывая реципрокные и количественно одинаковые изменения глутамата и ГАМК во время торпора (табл. 1) и постоянную конкуренцию ГАМК с глутаматом, можно полагать, что ГАМК-шунт работает и во время оцепенения, но с меньшей скоростью, а взаимосвязанное снижение глутамата и увеличение ГАМК играют важную роль в защите мозга от эксайтотоксического повреждения, вызываемого глутаматом [37]. Контроль за экстраклеточными концентрациями глутамата и ГАМК — одна из фундаментальных функций клеток глии [38]. Баланс концентраций этих двух нейротрансмиттеров решающий, он характеризует активность метаболических процессов. В связи с этим, поскольку для превращения ГАМК в сукцинат требуется активность ЦТК, увеличение ГАМК, на-

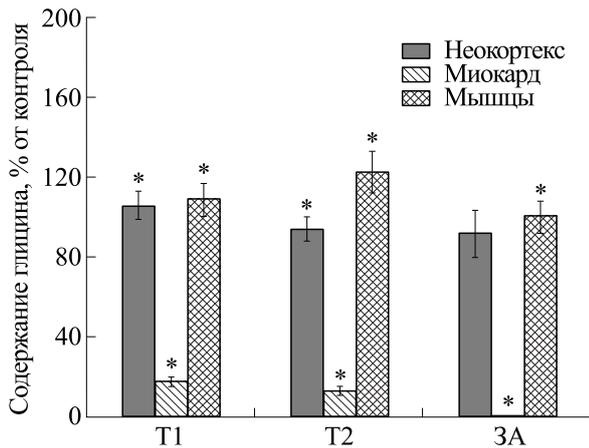


**Рис. 4.** Содержание аланина в неокортексе, миокарде и скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 — начало торпора; T2 — конец торпора; 3A — зимняя активность (эутермия). \* —  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь).

блюдаемое в настоящем исследовании, может быть результатом снижения активности цикла ЦТК [37].

Заслуживает упоминания давняя, но очень интересная работа [39], в которой было показано, что в результате искусственно вызванного охлаждения тела крысы (до 18–20°C) аминокислотный профиль коры мозга, изменявшийся стихийно, как ответ на стресс, радикально отличался от наблюдаемого в наших опытах у сусликов: уровень глутамата снижался в 2 раза — намного больше, чем у сусликов во время торпора (табл. 1, рис. 1); аспарат демонстрировал не снижение, а увеличение в 1.5 раза; концентрация ГАМК повышалась едва заметно (на уровне 10%). На фоне этой «авральной» перестройки сбалансированный, рассчитанный на длительный срок аминокислотный гомеостаз сусликов во время оцепенения выглядит как математическая формула.

Потребность мозга в кислороде исключительно велика [40], и оксигенация мозговой ткани сохраняется во время оцепенения, несмотря на низкий мозговой кровоток [19]. Тем не менее в мозге зимне спящих животных в период торпора имеет место и анаэробный гликолиз [36, 41]. Увеличение количества аланина, коррелирующее с уменьшением глутамата во время торпора, является одним из подтверждений этого важного вывода (табл.1, рис. 4). Однако отметим, что в неокортексе количество аланина во время торпора, особенно в конце оцепенения, существенно меньше, чем в это же время в миокарде (табл. 1, рис 4). С учетом высокого спроса мозга на кислород этот факт подтверждает, что анаэробный гликолиз даже во время длительного гипометаболического состояния играет менее существенную



**Рис. 5.** Содержание глицина в неокортексе, миокарде и скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 – начало торпора; T2 – конец торпора; ЗА – зимняя активность (эутермия). \* –  $P < 0.05$  относительно контрольной группы (июнь).

роль в энергетике неокортекса, чем в энергетике миокарда [42]. Интересно упомянуть в связи с этим гипотезу авторов работы [37] о роли гипоксии в эволюции, которая, возможно, оказывала избирательное давление и сыграла положительную роль в сохранении ГАМК и глутамата как основных тормозящих и возбуждающих нейротрансмиттеров у позвоночных и беспозвоночных. Динамика изменения концентрации ГАМК, наблюдаемая в нашей работе (табл. 1), в основном совпадает с данными других авторов, различаясь степенью увеличения в начальной стадии оцепенения и степенью достижения прежнего уровня в статусе эутермии [17, 18, 43].

Глутамат участвует в поддержании метаболизма ЦТК на определенном высоком уровне, в снабжении митохондриальных синтетических процессов восстановительными эквивалентами. Одним из вариантов образования глутамата является перенос аминокислотной группы с аланина или аспартата на  $\alpha$ -кетоглутарат в результате обратимого трансаминирования; направление реакции зависит от количества того или иного субстрата. При участии многочисленных аминотрансфераз аминокислотных групп различных аминокислот переносятся на глутаминовую кислоту, которая переаминируется с щавелевоуксусной кислотой с образованием аспартата. В связи с этим бесполезно отметить, что аспаргат, рассматриваемый как вторичный возбуждающий нейротрансмиттер в ЦНС, появился в мозге на довольно поздних этапах эволюции. В мозге прудовой рыбы *P. glenii* он отсутствовал летом, но вдруг «зачем-то» возник в минимальном количестве зимой при температуре воды  $4^{\circ}\text{C}$  [27]. Как бывает в ходе эволюции, вещества, вдруг возникшие «зачем-то» в каких-то ор-

ганах именно при низких температурах, обнаруживаются в большем количестве уже на последующей стадии эволюции. Интересно, что аспаргат, который совместно локализован в ГАМКергических нейронах, в экспериментах с зимнеспящими никогда не метился ни  $^{14}\text{C}$ , ни  $^{13}\text{C}$ , несмотря на высокое обогащение этими метками ГАМК [19]. Отсутствие метки предполагает, что превращение аспартата из оксалоацетата (участвует аспараттрансфераза) имеет очень низкую активность как в нейронах, так и в астроцитах, а это подразумевает специфическую для оцепенения инактивацию малат-аспаратного челнока, на которую может влиять снижение количества аспартата и глутамата в тканях мозга, а также гипоксия.

Наши результаты относительно дикарбоновых аминокислот и ГАМК в самых общих чертах соответствуют данным дагестанских ученых, работавших только с четырьмя аминокислотами, для неокортекса гибернирующих сусликов *Citellus pigmaeus* [1, 17], а также данным работы [19] для хомяка *Mesocricetus auratus*. Однако неудивительно, что количественно эти данные существенно различаются: использовались разные виды животных и разные режимы содержания, а авторы работы [19] исследовали только период торпора и эутермии, тогда как летний контроль, сравнение с которым делает результаты более выразительными, у них отсутствовал. Исключение относится к ответам аспартата: при пробуждении уровень аспартата у *C. pigmaeus* не достигал контрольного [17].

В отличие от миокарда [12], в котором количество глицина оказалось минимальным уже в начале торпора (рис. 5), возможно даже до его наступления, уровень глицина в неокортексе, в летней норме соответствующий уровню аланина (0.50 и 0.53 мкмоль/г), во время оцепенения и во время кратковременной эутермии практически не изменялся (табл. 1; рис. 4, 5). Поразительно иным, как и ответ аспартата в мышечной ткани (рис. 2), был ответ цистина в мышцах, наблюдаемый в предыдущей работе: после летнего отсутствия цистин в начальной стадии гипотермии возник в количестве, равном аспартату (0.45 мкмоль/г), а после длительной торпидности вырос еще до 0.6 мкмоль/г [13]. Глицин – тормозной нейротрансмиттер, и можно было бы ожидать его повышения во время оцепенения, но тормозную функцию он выполняет в спинном мозге, стволе мозга и мозжечке [44, 45]. В других отделах мозга (по крайней мере, в неокортексе) он играет роль нейромодулятора ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов, эндогенными лигандами которых являются глутамат и аспаргат, и для эффективной активации которых, помимо двух молекул глутамата, необходимы две

молекулы глицина [46]. Большая часть глицина синтезируется в головном мозге, особенно в неокортексе. Последним отделом мозга, в котором глицин переключается с функции активирующего медиатора развивающегося мозга на тормозной медиатор взрослого, является неокортекс. Основные источники глицина в ЦНС – серин и глюкоза [47].

Небольшое, по сравнению с миокардом [12], увеличение аланина в мозге (табл. 1, рис. 4), возможно, объясняется наличием небольшой гипоксии, на существовании которой во время торпора настаивают некоторые авторы, несмотря на то что дефицита кислорода у гибернаторов не наблюдается [48, 49]. Наши данные относительно соотношения аланина и глутамата заметно различаются с данными работы [19], полученными на переднем мозге хомяков, но эти различия не имеют принципиального значения. Аланин, совсем малое количество которого характерно для мозга суслика (0.53 мкмоль/г), после длинного торпора возрастал, по нашим данным, более чем в 3 раза по сравнению летним контролем (1.73 мкмоль/г) и обрушивался до 0.24 мкмоль/г во время зимней эутермии (табл. 1, рис. 4). Возрастал аланин и по данным работы [19], но неизвестно, во сколько раз, из-за отсутствия летнего контроля, однако количество глутамата во время оцепенения у этих авторов было намного ниже по сравнению с эутермией (5.85 и 9.02 мкмоль/г соответственно) и с нашими данными (8.05 и 9.08 мкмоль/г). Такие различия можно объяснить индивидуальными различиями этих животных, разницей в температуре тела во время оцепенения (у хомяков около 5°C, у сусликов около 0°C), а также длительностью нахождения в состоянии гипотермии.

Вполне вероятно, что значительные изменения в тканевых уровнях аминокислот происходят еще до вхождения в оцепенение, но не во время оцепенения. Наши данные показывают, что значительные изменения аминокислот, участвующих в энергоснабжении, происходят именно во время торпора (табл. 1). Таким изменениям подвержены прежде всего участники анаплеротических реакций ЦТК (глутамат, аспартат), а также аланин, пул которого находится в зависимости от уровня глутамата, от наличия и уровня гипоксии.

Серин напоминает о себе увеличением пула во время торпора (табл. 1). Эта крайне важная гидроксиминокислота синтезируется из глюкозы в астроцитах [50]. Биосинтез в нейронах мембранных липидов – фосфатидилсерина, фосфатидилэтанолamina, сфинголипидов и цереброзидов – полностью зависит от L-серина [50]. L-Серин участвует в синтезе глицина, цистеина, метионина, триптофана и является метаболическим предшественником предполагаемого глиотрансмит-

тера D-серина, эндогенного коагониста NMDA-рецепторов [51].

Другая гидроксиминокислота, треонин, также относится к категории аминокислот, увеличивающих присутствие во время торпора (табл. 2). Сведения о метаболизме и роли этой незаменимой аминокислоты в мозге крайне ограничены. Основная небелковая роль треонина в мозге может быть связана с тем, что он является предшественником глицина: введение треонина увеличивает концентрацию глицина в ЦНС крысы [52].

Увеличение пула незаменимой аминокислоты лизина, отличающейся необыкновенно интересным метаболизмом и промежуточными продуктами, таит немало неразгаданных смыслов (табл. 2). Не так много сведений о действиях, которые выполняет лизин в мозге, но известны его нейромодулирующие эффекты. Например, влияние на ГАМКергическую передачу и ингибирование связывания серотонина (5-НТ) с 5-НТ<sub>4</sub> рецепторами [53, 54].

Вторичные метаболиты (табл. 3) синтезируются из первичных; они не принимают непосредственного участия в нормальном росте, развитии и размножении организма, но выполняют другие важные функции. Присутствие небольшого количества фосфосерина в мозге рыб *Perccottus glenii* было обнаружено нами ранее, но обнаружено в мозге, а не в крови и мышцах, причем только зимой, а также в результате воздействия холодового шока летом [27]. Как упоминалось выше, появление при низких температурах метаболита, нового для данного органа, – знак того, что на последующих этапах эволюции он может появиться уже при нормальных температурах. Таким образом, низкотемпературные адаптогены – таурин, цистеиновая кислота, фосфосерин – в тех или иных органах млекопитающих, действительно, оказались участниками специфического метаболизма [55].

Фосфосерин, сложный эфир серина и фосфорной кислоты, присутствует в неокортексе в значительном количестве и в летнее время, и на обеих стадиях торпора (табл. 3). Фосфосерин является побочным продуктом гликолиза и последующим промежуточным звеном в биосинтезе серина. Известно, что добавление фосфорильной группы к аминокислоте или ее удаление играет роль в передаче сигналов клетки и в метаболизме. Фосфосерин имеет близкое структурное сходство с глутаматом и является мембранным метаболитом, обладающим острым ингибирующим эффектом, но замедленным возбуждающим действием. Предполагается, что ингибирование фосфосерином опосредовано пресинаптическим ингибированием высвобождения L-глутамата. Механизм замедленного возбуждения может за-

ключаться в тенденции фосфосерина имитировать действие L-2-амино-4-фосфономасляной кислоты, блокатора транспорта L-глутамата, чувствительного к хлоридам и кальцию. Также было обнаружено, что фосфосерин является конкурентным антагонистом в сайте распознавания NMDA-рецепторов и антагонистом гидролиза инозитол-фосфолипидов, опосредуемого метаболитными рецепторами [56]. С учетом такой характеристики фосфосерина можно представить его роль в качестве тонкого, почти ювелирного, регулятора нейрональных процессов. Эта роль востребована и при нормальной температуре, и в состоянии оцепенения.

Аминокислоты, содержащие серу, имеют особое адаптогенное значение. Возможно, это связано с большим диапазоном окислительно-восстановительных превращений серы: на внешнем энергетическом уровне ее атома 6 электронов. В то же время отсутствие количественных изменений серосодержащих соединений в разных метаболических состояниях не означает отсутствия участия в происходящих событиях. Таурин, малоактивный в нормальных условиях, не обнаруживал заметных изменений ни во время гипотермии, ни во время эутермии (табл. 4), однако известно, что функции таурина заложены в основе его ионно-мембранных взаимодействий, модулирующего влияния на возбуждающую и тормозную нейротрансмиссию [57, 58]. Ингибирование возбуждения нейронов внеклеточным таурином осуществляется через рецепторы ГАМК и глицина (таурин — агонист глициновых рецепторов) [57, 59]. Таурин регулирует в нейронах гомеостаз кальция и кальций-зависимую активность протениназы С [58]. Неведомо, какие из названных характеристик используются во время оцепенения, но многие метаболиты изменяют свойства в зависимости от среды, и, возможно, во время зимней спячки таурин действует иначе, чем в активном состоянии.

Содержание цистеиновой кислоты, предшественника таурина, снижается в неокортексе торпидных сусликов (табл. 3), и не исключено, что снижение связано с ее возбуждающим действием [60].

## ВЫВОДЫ

Панорама изменений аминокислот в неокортексе во время зимней спячки сусликов и сравнение с миокардом и скелетными мышцами [12, 13] показывают специфическую для каждого органа роль аминокислот в гомеостазе гипометаболического состояния.

Согласованные изменения на разных стадиях спячки таких участников энергоснабжения, как глутамата, аспартата и аланина, в общих чертах

аналогичны изменениям, обнаруженным ранее в миокарде [12]. В то же время уменьшение пула глутамата (не аспартата) в неокортексе существенно меньше, чем в миокарде, и отражает более значительную, чем в миокарде, роль кислорода и большую потребность в АТФ в неокортексе во время оцепенения. Пул аланина увеличивался эквивалентно изменениям пула глутамата, был небольшим в сравнении с изменением в миокарде и, вероятно, отражал переключение с аэробного энергоснабжения на гликолиз, стимулированный появлением в результате длительного оцепенения небольшой гипоксии.

Не очень значительные изменения пулов возбуждающих трансмиссиверов, глутамата и аспартата, предполагают сохранение неокортекса в состоянии «боевой» готовности для продолжения активной жизнедеятельности. Вероятно, в этой готовности к возбуждению во время торпора участвуют нейромодуляторы глицин и таурин, сохранившие свой уровень, а также лизин и треонин, повысившие уровень.

Специфику метаболизма в неокортексе во время зимней спячки определяли цистеиновая кислота, глицин и лизин, ответы которых в неокортексе и миокарде были противоположны. Можно предположить, что в неокортексе их роль состоит в обеспечении различных видов торможения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность А.В. Петрову и В.В. Меркулову за помощь в выполнении хроматографического анализа аминокислот.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме государственного задания «Механизмы природного и искусственного гипобиоза» НИОКТР: 122041100276-0.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с сусликами были одобрены Комиссией по биоэтике Института биофизики клетки РАН (протокол № 3/092021 от 08 сентября 2021 года) и проведены в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Demin N. N., Shortanova T. H., and Emirbekov E. Z. *Neurochemistry of hibernation in mammals* (Science, Leningrad, 1988).
- Drew K. L., Buck C. L., Barnes B. M., Christian S. L., Rasley B. T., and Harris M. B. Central nervous system regulation of hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *Neurochemistry*, **102**, 1713–1726 (2007). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04675.x
- Белоусов А. В. Роль центральной нервной системы в контроле зимней спячки. *Успехи физиол. наук*, **2**, 109–123 (1993).
- Giroud S., Hahndel C., Nespolo R. F., Mejías C., Terrien J., Logan S. M., Henning R. H., and Storey K. B. The Torpid State: Recent Advances in Metabolic Adaptations and Protective Mechanisms. *Front. Physiol.*, **11**, 623665 (2021). DOI: 10.3389/fphys.2020.623665
- Fan T. T., Ni J. J., Dong W. C., An L. Z., Xiang Y., and Cao S. Q. Effect of low temperature on profilins and ADFs transcription and actin cytoskeleton reorganization in *Arabidopsis* et al., *Biol. Plant.*, **59**, 793–796 (2015). DOI: 10.1007/s10535-015-0546-6
- Mednikova Yu. S., Zakharova N. M., Pasikova N. V., and D. N. Voronkov. Comparative Analysis of Morphofunctional Features of Cortical Neurons in Ground Squirrels and Guinea Pigs under Hypothermia. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **53** (4), 331–339 (2017). DOI: 10.1134/S002209301704010X
- Largo C., Cuevas P. P., Somjen G. G., Martín del Río R., and Herreras O. The effect of depressing glial function in rat brain in situ on ion homeostasis, synaptic transmission, and neuron survival. *J. Neurosci.*, **16** (3), 1219–1229 (1996). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-03-01219.1996
- Zakharova N. M., Voronkov D. N., Khudoerkov R. M., Pasikova N. V., and Mednikova Yu. S. Glia–Neuron Interactions in the Sensory-Motor Cortex of Warm-Blooded Animals (Guinea Pigs and Ground Squirrels) with Different Habitat Conditions and the M-Cholinergic Reaction of the Brain. *Biophysics*, **63** (2), 207–214 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918020264
- Schwartz C., Hampton M., and Andrews M. T. Seasonal and Regional Differences in Gene Expression in the Brain of a Hibernating Mammal. *PLoS One*, **8** (3), e58427 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0058427
- Chen J., Yuan L., Sun M., Zhan L., and Zhan S.. Screening of hibernation-related genes in the brain of *Rhinolophus ferrumequinum* during hibernation. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **149** (2), 388–393 (2008). DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.10.011
- Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, **37** (1), 1–17 (2009). DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0
- Karanova M. V. and Zakharova N. M. Adaptive Modification of Amino Acid Pools in the Myocardium of a Long-Tailed Ground Squirrel *Urocyon undulatus* at Different Stages of Hibernation. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **59** (4), 1027–1036 (2023). DOI: 10.1134/S0022093023040038
- Karanova M. V. and Zakharova N. M. Pools of Amino Acids of Skeletal Muscle in Yakutian Ground Squirrel *Urocyon undulatus* during Different Hibernation Stages. *Biophysics*, **67** (2), 288–293 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922020105
- Al-Badry K. S. and Taha H. M. Hibernation hypothermia and metabolism in hedgehogs--changes in free amino acids and related compounds. *Comp. Biochem. Physiol.*, **72** (3), 541–547 (1982). DOI: 10.1016/0300-9629(82)90120-7
- Raheem K. A. and el Mosallamy N. Metabolism of hibernating reptiles. Changes of free amino acids in blood, liver and brain. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **64** (3), 305–308 (1979). DOI: 10.1016/0305-0491(79)90149-4
- Forreider B., Pozivilko D., Kawaji Q., Geng X., and Ding Y. Hibernation-like neuroprotection in stroke by attenuating brain metabolic dysfunction. *Prog Neurobiol.* **157**, 174–187 (2017). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.03.002
- Emirbekov E. Z. and Meilanov I. S. *Neurochemical changes during hibernation* (Pushchino, 1992).
- Henry P. G., Russeth K. R., Tkac I., Drewes L. R., Andrews M. T., and Gruetter R. Brain energy metabolism and neurotransmission at near-freezing temperatures: in vivo (1)H MRS study of a hibernating mammal. *J. Neurochem.*, **101**, 1505–1515 (2007). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04514.x
- Osborne P. G. and Hashimoto M. Mammalian cerebral metabolism and amino acids neurotransmission during hibernation. *J. Neurochem.*, **106**, 1888–1899 (2008). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05543.x
- Spackman D., Stein W., and Moore S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190–1206 (1958).
- Ezza H. S. A. and Khadrawy Y. A., Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. *J. Mol. Genet. Med.*, **8**, 141 (2014). DOI: 10.4172/1747-0862.1000141
- Andersen J. V., Markussen K. H., Jakobsen E., Schousboe A., Waagepetersen H. S., Rosenberg P. A., and Aldana B. I. Glutamate Metabolism and Recycling at the Excitatory Synapse in Health and Neurodegeneration. *Neuropharm.*, **196**, 108719 (2021). DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108719
- Watford M. Glutamine and Glutamate: Nonessential or Essential Amino Acids? *Anim. Nutr.*, **1**, 119–122 (2015). DOI: 10.1016/j.aninu.2015.08.008
- Grynberg A. and Demaison L. Fatty Acid Oxidation in the Heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28** (1), 11–17 (1996). DOI: 10.1097/00005344-199600003-00003
- Zhang S., Lachance B. B., Mattson M. P., and Jia X.. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. *Progr. Neurobiol.*, **204**, 102089 (2021). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2021.102089

26. Salceda R. Glycine neurotransmission: Its role in development. *Front. Neurosci.*, **16**, 947563 (2022). DOI: 10.3389/fnins.2022.947563
27. Karanova M. V. Impact of Seasonal Temperature Decrease and Cold Shock on the Composition of Free Amino Acids and Phosphomonoethers in Various Organs of Amur Sleeper *Perccottus glenii* (Eleotridae). *J. Ichthyol.*, **58** (4), 570–579 (2018). DOI: 10.1134/S0032945218040069
28. Karanova M. V. Secondary Metabolites and Aspartic Acid in the Brain of the Frog *Rana temporaria* as Low-Temperature Adaptogens. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **56**, 218–223 (2020). DOI: 10.1134/S0022093020030047
29. R. Marion, V. Horn, M. Sild, and Ruthazer E. S. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 39 (2013). DOI: 10.3389/fncel.2013.00039
30. Lionetti V., Stanley W. C., and Recchia F. A. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc. Res.*, **90** (2), 202–209 (2011). DOI: 10.1093/cvr/cvr038
31. Benarroch E. E. Brain glucose transporters: Implications for neurologic disease. *Neurol.*, **82** (15), 1374–1379 (2014). DOI: 10.1212/WNL.0000000000000328
32. Andrews M. T., Russeth K. R., Drewes L. R., and Henry P. G. Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **296** (2), R383–R 393 (2009). DOI: 10.1152/ajpregu.90795.2008
33. Watanabe M., Maemura K., Kanbara K., Tamayama T., and Hayasaki H. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *Int. Rev. Cytol.*, **213**, 1–47 (2002). DOI: 10.1016/S0074-7696(02)13011-7
34. Andersen J. V. and Schousboe A. Milestone Review: Metabolic dynamics of glutamate and GABA mediated neurotransmission - The essential roles of astrocytes. *J. Neurochem.*, **166** (2), 109–137 (2023). DOI: 10.1111/jnc.15811
35. Petroff O. A. C. GABA and Glutamate in the Human Brain. *Neuroscientist*, **8** (6), 562–573 (2002). DOI: 10.1177/107385840223851
36. Popov V. A., Semenov D. V., Amakhin N. P., Veselkin N. P. Interaction of glutamate and GABA receptors in the receptors of the central nervous system. *Rus. J. Physiol.*, **102** (5), 529–539 (2016).
37. Nilsson G. E. and Lutz P. L. Role of GABA in hypoxia tolerance, metabolic depression and hibernation—possible links to neurotransmitter evolution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C. Comp. Pharmacol.*, **105** (3), 329–336 (1993). DOI: 10.1016/0742-8413(93)90069
38. Pellerin L. and Magistretti P. J., Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** (22), 10625–10629 (1994). DOI: 10.1073/pnas.91.22.10625
39. Turinsky J., Mukherji B. and Sloviter H. A.. Effects of induced hypothermia on amino acids and glycogen in rat brain. *J. Neurochem.*, **18**, 233–235 (1971). DOI: 10.1111/j.1471-4159.1971.tb00561.x
40. Drew K., Harris M., LaManna J., Smith M., Zhu X., and Ma Y. Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *J. Exp. Biol.*, **207**, 3155–3162 (2004). DOI: 10.1242/jeb.01114
41. Dave K. R., Christian S. L., Perez-Pinzon M. A., and Drew K. L. Neuroprotection: lessons from hibernators. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **162** (1–3), 1–9 (2012). DOI: 10.1016/j.cbpb.2012.01.008
42. Frerichs K. U. and Hallenbeck J. M.. Hibernation in ground squirrels induces state and species-specific tolerance to hypoxia and aglycemia: an in vitro study in hippocampal slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**, 168–175 (1998). DOI: 10.1097/00004647-199802000-00007
43. Bekshokov K. S., Emirbekov E. Z. and Emirbekova A. A. Severo-Kavkazskij region. *Estestvennye nauki. Prilozhenie*, **56**, 42(2004).
44. Langosch D., Becker C. M., and Betz H. The inhibitory glycine receptor: A ligand-gated chloride channel of the central nervous system. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 1–8 (1990). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19419.x
45. Lynch J. W. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiol. Rev.*, **84**, 1051–1095 (2004). DOI: 10.1152/physrev.00042.2003
46. Bonhaus D. W., Burge B. C., and McNamara J. O. Biochemical evidence that glycine allosterically regulates an NMDA receptor-coupled ion channel. *Eur. J. Pharmacol.*, **142** (3), 489–490 (1987). DOI: 10.1016/0014-2999(87)90096-3
47. Kurbat M. N. and Lelevich V. V. Metabolism of Amino Acids in the Brain. *Neurochem. J.*, **3** (1), 23–28 (2009).
48. Reis D. J., Golanov E. V., Galea E., and Feinstein D. L. Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **835**, 168–186 (1997). DOI: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48628.x
49. Ma Y. L., Zhu X., Rivera P. M., Tøien Ø., Barnes B. M., LaManna J. C., Smith M. A., and Drew K. L. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **289**, R1297–R1306 (2005). DOI: 10.1152/ajp-regu.00260.2005
50. Hirabayashi Y. and Furuya S. Roles of l-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival. *Progr. Lipid Res.*, **47** (3), 188–203 (2008). DOI: 10.1016/j.plipres.2008.01.003
51. Murtas G., G. Marcone L., Sacchi S., and Pollegioni L. L-serine synthesis via the phosphorylated pathway in humans. *Cell Mol. Life. Sci.*, **77** (24), 5131–5148 (2020). DOI: 10.1007/s00018-020-03574-z
52. T Maher. J. and Wurtman R. J. L-Threonine administration increases glycine concentrations in the rat central nervous system. *Life Sci.*, **26**, 1283–1286 (1980). DOI: 10.1016/0024-3205(80)90086-7

53. Dalangin R., Kim A. and Campbell R. E. The role of amino acids in neurotransmission and fluorescent tools for their detection. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (17), 6197 (2020). DOI: 10.3390/ijms21176197
54. Severyanova L. A., Lazarenko V. A., Plotnikov D. V., Dolgintsev M. E., and Kriukov A. A. L-Lysine as the Molecule Influencing Selective Brain Activity in Pain-Induced Behavior of Rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (8), 1899 (2019). DOI: 10.3390/ijms20081899
55. Karanova M. V. Influence of low temperature on the evolution of amino acid pools adaptive modifications in poikilothermal animals. *Int. J. Biochem. Biophys.*, **1** (2), 33–40 (2013). DOI: 10.13189/ijbb.2013.010202
56. Klunk W. E., McClure R. J., and Pettegrew J. W. Possible roles of L-phosphoserine in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **15** (1), 51–73 (1991). DOI: 10.1007/BF03161056
57. Oja S. S. and Saransaari P. Significance of Taurine in the Brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **975** (1), 89–94 (2017). DOI: 10.1007/978-94-024-1079-2\_8
58. El Idrissi A. and Trenkner E. Taurine as a Modulator of Excitatory and Inhibitory Neurotransmission. *Neurochem. Res.*, **29**, 189–197 (2004). DOI: 10.1023/b:ne-re.0000010448.17740.6e
59. Hilgier W., Oja S. S., Saransaari P., and Albrecht J. Taurine prevents ammonia-induced accumulation of cyclic GMP in rat striatum by interaction with GABAA and glycine receptors. *Brain Res.*, **1043** (1–2), 242–246 (2005). DOI: 10.1016/j.brainres.2005.02.066
60. Iwata H., Yamagami S., and Baba A. Cysteine Sulfinic Acid in the Central Nervous System: Specific Binding of [<sup>35</sup>S] Cysteic Acid to Cortical Synaptic Membranes—An Investigation of Possible Binding Sites for Cysteine Sulfinic Acid. *J. Neurochem.*, **38** (5), 1275–1279 (1982). DOI: 10.1111/j.1471-4159.1982.tb07901.x

## Secondary Metabolites and Amino Acids in the Neocortex of the Long-Tailed Ground Squirrel *Urocyon undulatus* at Different Stages of Hibernation

M.V. Karanova\* and N.M. Zakharova\*

\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

This study is a continuation of our previous research aimed at investigating changes in the pools of amino acids in the myocardium of the ground squirrel during winter torpor. Neurochemical profiles of amino acids and the secondary metabolites (taurine, phosphoserine, and cysteic acid) were explored in the neocortex of the ground squirrel at different stages of torpor: in the beginning of torpor (2–3 days) and during prolonged torpor (9–10 days), as well as during short-term winter arousal (winter activity, euthermia). Reduced excitatory neurotransmitter levels (glutamate by 7% and 14%; aspartate by 25% and 52% in a coordinated manner and the increased level of GABA, the main transmission inhibitor (by 50% and 67%) were observed from the onset of the torpor entry and at the end of the torpor arousal, respectively. Alanine, which was formed in negligible amounts in the neocortex in the summer season, increased at the initial stage of hibernation and after multiday torpor bout (by 98% and 126%, respectively), indicating a partial switch to anaerobic glycolysis. Short-term inter-bout euthermia returned levels of these substances back to normal. The behavior of glutamate and aspartate, the anaplerotic substrates, that supported cycling of the tricarboxylic acid cycle during torpor and winter activity periods was like their responses in the myocardium, though differed quantitatively. The responses of the neuromodulators such as glycine, threonine, and lysine differed radically when compared to their responses in the myocardium. No changes in taurine and phosphoserine pools were detected, but the level of cysteic acid decreased compared to the summer control from  $0.51 \pm 0.06 \mu\text{mol/g}$  to  $0.07 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$  at the end of torpor, while during winter euthermia it became 2 times lower than the summer level. Our data suggest that metabolic pathways, involving anaplerotic amino acids of the neocortex, are more active than the myocardium during winter torpor, while the pools of neuromodulators that regulate inhibition processes, increase.

**Keywords:** hibernation, torpor, long-tailed ground squirrel, neocortex, myocardium, amino acids, energy metabolism