

АДАПТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПУЛОВ АМИНОКИСЛОТ В МИОКАРДЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *UROCITELLUS UNDULATUS* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ГИБЕРНАЦИИ

© 2023 г. М. В. Каранова^{1,*}, Н. М. Захарова¹

¹Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
“Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия

*e-mail: karanovari@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 26.05.2023 г.

Состояние гибернации характеризуется повышенной устойчивостью к воздействию длительного глубокого охлаждения, гипоксии, отсутствию пищи и воды. В то же время, перестройка адаптационных механизмов животных при низких температурах даже на непродолжительное время вызывает значительные изменения метаболизма, отражающиеся в паттерне аминокислот. Изменение метаболизма свободных аминокислот миокарда во время гибернации практически не изучалось, но представление о нем необходимо для понимания механизмов гибернационного состояния, актуального для клинической медицины. В связи с этим, задача данной работы состояла в изучении изменения состава свободных аминокислот миокарда суслика *U. undulatus* на разных стадиях зимней спячки. Выявлена отрицательная взаимозависимость пулов глутаминовой кислоты и аланина на разных стадиях оцепенения. Снижение уровня глутаминовой кислоты по сравнению с летним контролем (5.08 ± 0.44 мкмоль/г сырой массы) отмечалось в начале баута спячки, продолжалось при длительном оцепенении (до 1.57 ± 0.14 мкмоль/г) и сопровождалось соответствующим увеличением пула аланина. Во время зимнего пробуждения пул глутаминовой кислоты возрастал выше летнего уровня; пул аланина падал ниже летнего, но их суммарный уровень не изменялся. Пулы аспарагиновой кислоты и глицина снижались параллельно с уменьшением пулов глутамата и аспартата, но во время зимнего пробуждения глицин даже не обнаруживался. Учитывая участие глутаминовой кислоты и аспартата в анаэробных реакциях цикла Кребса и реципрокную связь глутаминовой кислоты и аланина, делается вывод, что изменение содержания этих метаболитов на разных стадиях баутов связано с постепенным переходом аэробного гликолиза (цикл Кребса и окислительное фосфорилирование) на анаэробный, а во время эутермии, напротив, – с возвращением к аэробному.

Ключевые слова: гибернация, бауты, якутский суслик, миокард, аминокислоты, энергетический метаболизм

DOI: 10.31857/S0044452923040034, **EDN:** OTXJCSJ

ВВЕДЕНИЕ

Спячка гетеротермных млекопитающих (зимняя спячка, оцепенение, торпидное состояние) – это адаптивное снижение скорости метаболизма и расхода энергии до минимального уровня. Адаптация к зимней спячке выработана в ходе эволюции для выживания в периоды нехватки пищи и в неблагоприятных условиях окружающей среды, когда температура тела животных во время оцепенения падает до очень низких положительных температур, опускаясь даже ниже 0°C, когда потребление кислорода снижается более чем на порядок, скорость метаболизма падает до 1–2% от нормальных значений, а расход энергии снижается на 80–90% [1, 2]. Для проталкивания медленно теку-

щей при низкой температуре крови сердечной мышце необходимы большие усилия, поэтому вместе с увеличением силы сокращения происходит ее гипертрофия, а ее окислительная способность повышается [3].

Основные энергетические потребности сердца млекопитающих при нормальной температуре достигаются за счет аэробных процессов окислительного фосфорилирования, включающих цикл Кребса и дыхательную цепь переноса электронов [4–6]. В миокарде млекопитающих в норме в процессе аэробного окисления, в присутствии кислорода, основным энергетическим субстратом являются кетоновые тела жирных кислот. Продукт их метаболизма, ацетил-КоА, поступает в ЦТК, участни-

ком которого является и глутаминовая кислота, вступающая для пополнения α -кетоглутаровой кислоты в анаплеротическую реакцию через дезаминирование, а также анаплеротическая аспарагиновая кислота, которая превращается в важнейший ключевой субстрат ЦТК, оксалоацетат [5]. Важную роль в другом энергетическом процессе, анаэробном гликолизе, играет аланин, который наиболее активно образуется в отсутствие кислорода, приходя на смену окислительному фосфорилированию.

Стабильный баланс аминокислот во взрослом организме создает нормальный метаболический фон в тканях и органах, определяющий адаптационные возможности организма и их регуляцию [7–9]. Изменение соотношения аминокислот этого метаболического фона связано со значительными перестройками адаптационных механизмов зимнеящих животных, однако нам не удалось найти ни одной работы, посвященной изучению изменения паттерна свободных аминокислот в сердце зимнеящих во время гипометаболического состояния. В то же время представление об изменении содержания свободных аминокислот, отражающем фундаментальные события адаптации сердца во время гибернации, могло бы инициировать появление новых идей для дальнейших исследований в этом направлении, способствовать решению определенных задач в клинике сердечных патологий, созданию методов хирургии сердца при более низких, чем используемых в настоящий момент, температурах, созданию более эффективных кардиоплегиических растворов. Популярным способом защиты миокарда во время операции на сегодняшний день является снижение температуры, на короткое время продлевающей период ишемии без существенных последствий. Более глубокая гипотермия позволяла бы отключать сердце от кровообращения на более длительный период, и понимание биохимических механизмов, лежащих в основе естественного гипометаболического состояния во время гибернации зимнеящих, является условием реализации этого перспективного метода.

В настоящее время получены интересные результаты изучения тонких механизмов дифференциальной экспрессии генов гибернирующих животных [10–13], однако динамика изменения тех или иных метаболитов, в зависимости от стадии гибернации, исследована весьма не полно. В частности, не изучались такие важные, многозначительные показатели, как изменение состава свободных аминокислот в миокарде зимнеящих животных во время различных стадий гипометаболического состояния, несмотря на то, что эти изменения влияют и на биосинтез, и на поддержание электрической проводимости, и на стабильность сердца во время его дисфункции.

Цель данного, впервые проводимого исследования: выявление особенностей адаптационных изменений состава свободных аминокислот в миокарде зимнеящих сусликов в раннем торпидном, глубоком торпидном и зимнем активном состоянии (межбуртном пробуждении, эутермии) в сравнении с летними активными животными.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовались взрослые самцы длиннохвостых сусликов (*U. undulatus*), с массой тела 613 ± 60 г. Животных доставляли из Якутии в г. Пушкино Московской области в конце августа. До конца октября суслики содержались индивидуально в специально оборудованном виварии при естественной для Московского региона 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 буртов в гибернационный период часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики ($20 \times 20 \times 25$ см), на дно которых был установлен термистор (чувствительность, 0.2°C). Во время спячки температура подстилки достигала $1-4^\circ\text{C}$, тогда как при кратковременных периодах эутермии повышалась до 14°C .

Суслики были разделены на 4 группы:

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

2-я группа ($n = 6$) – торпор, 2–3 дня (начало спячки), при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C ;

3-я группа ($n = 6$) – торпор, 9–10 дней, при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C ;

4-я группа ($n = 5$) – спонтанно пробудившиеся зимой активные животные, температура тела 37.6°C .

Перед декапитацией торпидных животных взвешивали и измеряли ректальную температуру, после декапитации измеряли температуру в области сердца. После извлечения миокарда биоматериал гомогенизировали в 0.5н холодной хлорной кислоте (1:9) и центрифугировали при температуре 4°C 20 мин при 20000 об/мин на центрифуге Centricon (США). Супернатант нейтрализовали 2 н КОН и снова центрифугировали. Конечный супернатант хранили для дальнейшего анализа в Криобанке ИБК РАН.

Все процедуры на животных были одобрены Комиссией по биоэтике (Институт биофизики клетчатки РАН – Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Протокол 3/092021 от 08.09.2021 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Операции для активных сусликов проводились под наркозом с Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, i.m.); были предприняты

Таблица 1. Пулы свободных аминокислот и таурина в миокарде длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации (мкмоль/г сырой массы)

Аминокислота	Контроль (лето)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность
Таурин	7.31 ± 0.65	8.74 ± 0.67 [#]	9.64 ± 0.65	11.21 ± 0.82
Аспарагиновая кислота	1.11 ± 0.09	0.54 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.78 ± 0.06
Треонин	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Глутамин	3.54 ± 0.30	2.45 ± 0.21	1.88 ± 0.15	3.33 ± 0.28
Серин	0.26 ± 0.03	0.22 ± 0.03 [#]	0.49 ± 0.06	0.45 ± 0.03
Глутаминовая кислота	5.08 ± 0.44	3.38 ± 0.28	1.57 ± 0.14	6.12 ± 0.45
Глицин	0.45 ± 0.03	0.08 ± <0.01	0.06 ± <0.01	не обн.
Аланин	1.78 ± 0.15	3.26 ± 0.22	5.47 ± 0.42	0.53 ± 0.03
Цистин	0.28 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Тирозин	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.02 [#]	0.15 ± 0.02 [#]	0.21 ± 0.02
Гистидин	1.00 ± 0.10	0.06 ± 0.006	0.84 ± 0.08 [#]	0.85 ± 0.07 [#]
Лизин	0.61 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.89 ± 0.08	0.10 ± 0.01
ГАМК	следы	следы	следы	следы
Аргинин	0.41 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.02

Примечание. Контроль – летние активные животные в июне ($n = 6$); торпор (начало спячки) – торпидные животные ($n = 6$), 2–3 дня от начала спячки; торпор (конец спячки), 9–10 дней спячки, ($n = 6$); Зимняя активность – кратковременное пробуждение ($n = 5$). Ректальная температура спящих сусликов от 0.2 до 0.4°C; температура сердца от +1° до +2.5°C. Температура сердца активных зимних животных (эутермия) 37.6°C. ГАМК – гамма-аминоасляная кислота. Значения представлены как $M \pm SD$. [#]Различия по сравнению с контрольной группой (лето) статистически значимы при $p < 0.05$.

все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Состав и количество свободных аминокислот определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии [14] на модульном хроматографе Infinity LC–1260 (Agilent 1260, США). Разделение смеси аминокислот осуществляли на колонке с трехступенчатым градиентом натрий-цитратного буфера: № 1 – 0.3н, рН 2.98, № 2 – 0.4н, рН 3.81, № 3 – 0.45н, рН 9.97. Диапазон температуры от 55° до 74°C. Стационарная фаза: сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.45 мл/мин. Послеколончатая 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 2.5 нмоль. Содержание свободных аминокислот выражали в виде мкмоль/г влажной массы. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 7 (GraphPad Software Inc., США). Тест Манна–Уитни *U* использовался для сравнения независимых измерений. Был проведен корреляционный анализ, оценивающий взаимосвязь между показателями содержания глутамата и аланина. Данные выражали как среднее значение параллельных данных,

собранных в ходе трех выборочных обследований; для каждого образца использовано два животных ($n = 6$). Данные представлены значениями среднего арифметического \pm стандартное отклонение $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные об изменении содержания свободных аминокислот в зависимости от этапа гибернации представлены в табл. 1; количественное соотношение взаимосвязи свободной глутаминовой кислоты и аланина на разных фазах гипометаболического состояния в сравнении с летним периодом – на рис. 1. Постоянство суммы глутамата и аланина в сердце гомейотермных млекопитающих, их тесная метаболическая взаимосвязь являются, вероятно, универсальным свойством сердца млекопитающих и не нарушаются даже в условиях ишемии миокарда [4, 9]. Существенное дополнение, в связи с этим, добавляют и наши данные о соотношении глутамата и аланина в миокарде зимоспящих сусликов на разных стадиях гибернации: при неизменной отрицательной корреляции динамики пулов аланина и глутамата (коэффициент корреляции составляет -0.96 ± 0.02) сумма их концентраций остается практически постоянной и одинаковой (табл. 1).

Особенностью миокарда в летний период (контроль) является почти трехкратное превышение уровня глутаминовой кислоты относительно аланина, 5.08 ± 0.44 и 1.78 ± 0.15 мкмоль/г сырой ткани (рис. 1). В начале зимней спячки (2-я колонка

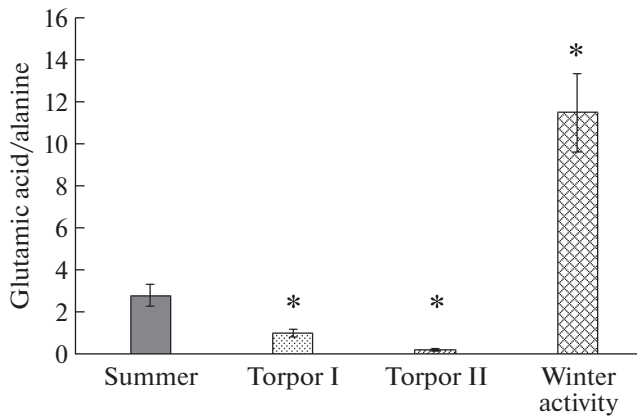


Рис. 1. Количественное соотношение глутаминовой кислоты и аланина (глутамат/аланин) в миокарде длиннохвостого суслика *U. undulatus* в период гибернации в сравнении с летним периодом (контроль) (см. табл. 1). Значения представлены как $M \pm SD$, $n = 6$; *Различия по сравнению с контрольной группой (лето) статистически значимы при $p < 0.05$.

табл., торпор I) пулы глутамата и аланина уравниваются за счет уменьшения глутамата и увеличения аланина (3.38 ± 0.28 и 3.26 ± 0.22 мкмоль/г). В середине января (торпор II, конец), т.е. после нескольких межбютных пробуждений (эутермий) и последующего состояния глубокой торпидности в течение 9–10 дней, уровень глутамата падает еще больше, до 1.57 ± 0.14 мкмоль/г, а аланина, напротив, увеличивается почти на такую же величину, составив 5.47 ± 0.42 мкмоль/г, и превосходя пул глутамата в 3.48 раза (рис. 1).

Межбютное пробуждение, или эутермия (в табл. 1 обозначена как “зимняя активность”), отличается высокой интенсивностью метаболизма в течение короткого срока и связано с наибольшими затратами энергии по сравнению с торпидным состоянием. Температура тела во время эутермии за несколько часов поднимается до $36\text{--}37^\circ\text{C}$, количество сокращений сердца достигает 350–400 ударов в минуту, цикл Кребса и дыхательная цепь активируются [1, 2]. В наших опытах во время эутермии (конец февраля) происходит противоположное и очень резкое изменение соотношения пулов глутамата к аланину. Интенсивность метаболизма в этой фазе отражается в том, что количество глутамата даже слегка превышает летнее, нормотермическое, достигая 6.12 ± 0.45 мкмоль/г (табл. 1, рис. 1). Уровень аланина, соответственно, понижается и становится ниже летнего (0.53 ± 0.03 мкмоль/г), в 11.5 раза меньше уровня глутамата. Особенно замечательно, что сумма концентраций обеих аминокислот даже во время эутермии, практически не изменяется, оставаясь не зависимой от температуры тела и длительности торпора.

Существенным показателем ответа на гипометаболическое состояние большинства представ-

ленных в табл. 1 протеиногенных аминокислот, за исключением аланина, является снижение их количества, т.е. уменьшение пулов. Изменение пула аспарагиновой кислоты осуществляется параллельно с изменением уровня глутаминовой, но не как отрицательное соотношение их концентраций, а как положительное. В летний период уровень аспартата в 4.6 раза ниже уровня глутамата. После длительного оцепенения в середине января пул аспарагиновой кислоты уменьшается в 3 раза по сравнению с летним и составляет всего лишь 0.35 ± 0.03 мкмоль/г, при этом соотношение с уровнем глутаминовой кислоты не изменяется (табл. 1). Это снижение может быть вызвано транспортом аспарагиновой кислоты в печень для глюконеогенеза, но, в принципе, возможны и другие реакции с ее участием, однако ее превращение в аспарагин в условиях гибернации кажется менее вероятным вследствие большей сложности и энергоёмкости реакции, требующей участия АТФ.

Во время эутермии пул аспарагиновой кислоты возрастает, но в меньшей степени, чем глутамат, и не достигает летнего уровня; теперь он в 7.8 раза меньше уровня глутамата (летом — в 4.6). Поскольку аспарагиновая кислота участвует в анаплеротической реакции превращения в оксалоацетат в цикле трикарбоновых кислот, следует принимать во внимание роль в этом сложном процессе малат/аспартатного челнока, переносящего субстраты из цитозоля через мембрану в митохондрии [15]. В то же время функционирование этого челночного механизма в торпидном состоянии (сопровождающимся изменением состава мембран при низкой температуре), возможно, несколько отличается от механизма, действующего при нормальной температуре.

Вызывает большой интерес динамика изменения концентрации глицина, резко падающая в самом начале торпидного состояния (торпор I), от 0.45 до 0.08 мкмоль/г, и сохраняющая то же самое мизерное количество (0.06 мкмоль/г) в январском торпоре (торпор II, табл. 1). Особенно удивительно, что во время межбютного пробуждения (зимняя активность, табл. 1) глицин вообще не обнаруживается. Известно, что межбютное пробуждение сопровождается окислительным стрессом, вызванным огромным потреблением кислорода в этом статусе. В таких условиях антиоксидантная защита приобретает особое значение, и исчезновение глицина может быть обусловлено его участием в антиоксидантном механизме, обеспечивающем “безболезненный”, без окислительных повреждений тканей, переход от оцепенения к пробуждению, который сопровождается множеством реакций синтеза протеинов и метаболитов. С другой стороны, глицин является глюкостатической аминокислотой, и падение его уровня может быть вызвано превращением в глюкозу в процессе глюконеогенеза. Однако, имея в виду достаточно большое ко-

личество глюкопластичных аминокислот и предполагаемое отсутствие их дефицита, более востребованным в данных условиях кажется участие глицина в синтезе крайне необходимого в условиях гибернации антиоксидантного трипептида глутатиона, осуществляемого из глицина, глутаминовой кислоты и цистеина.

Аналогично можно рассматривать и менее значительное, чем у глицина, снижение уровня цистина (табл. 1), который образуется во время хроматографической процедуры анализа аминокислот, вследствие соединения двух молекул цистеина. Цистеин, также являясь предшественником глутатиона и сам обладая антиоксидантными свойствами, участвует и в биосинтезе кофермента А — участника переноса ацильных групп при синтезе и окислении жирных кислот. Вероятно, цистеину отведена не единственная роль в сложных взаимодействиях свободных аминокислот в цитоплазме и компартментах миокарда; также, как и глицин, он может быть задействован в синтезе глутатиона или других метаболитов.

Вторичный метаболит, непротеиногенная сульфаминокислота таурин, перед зимним наступлением холода в органах пойкилотермных животных, — особенно в скелетных мышцах рыб-телеостов, — многократно увеличивает свое количество [16]. В миокарде суслика уровень таурина на всех стадиях — и летом, и в гипометаболическом состоянии (при ректальной температуре в пределах 0.2–0.4°C) выше, чем у других аминокислот, и на протяжении трех месяцев гипобииа постепенно и понемногу увеличивается (табл. 1). В летний период таурин составляет 7.31 мкмоль/г; у спящих сусликов (торпор I, декабрь, табл. 1) он повышается до 8.74 ± 0.67 кмоль/г и продолжает немного, но достоверно, повышаться, достигнув у активных зимних (эутермия, конец февраля) 11.21 ± 0.82 мкмоль/г, т.е. в сравнении с летним периодом возрастает в 1.53 раза. Этот факт представляет особенный интерес, так как у пойкилотермных животных пул метаболически малоактивного таурина обычно увеличивается очень медленно на протяжении нескольких месяцев и в процессе сезонного понижения температуры, достигая максимума при положительных температурах, близких к нулю [16]. Более того, в условиях холодового шока и наблюдения в течение четырех суток, таурин скелетных мышц прудовых рыб не увеличивает свой пул [17]. Таким образом, медленное увеличение количества таурина в миокарде сусликов в процессе зимней спячки подтверждает инертность метаболизма этой сульфаминокислоты, но, с другой стороны, обозначает его какую-то роль (вероятно, протекторную) в механизмах гибернации миокарда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Энергетический метаболизм поперечнополосатых мышц миокарда гибернирующих и гомойотермных животных имеет преимущественно аэробный характер: около 70–85% энергии образуется с участием кислорода в процессе β -окисления жирных кислот, 15–30% — за счет анаэробного гликолиза или глюконеогенеза, в котором участвуют различные субстраты, включая глюкогенные аминокислоты, лактат, пируват, кетокислоты, глицерол [18, 19]. Различные жиры, накопленные к концу лета, на протяжении зимней спячки расходуются неодинаково, и метаболизм резко замедляется из-за подавления как аэробных процессов (цикла Кребса и окислительного фосфорилирования), так и анаэробного гликолиза [18, 19]. К снижению скорости гликолиза приводит фосфорилирование протеинкиназами пируваткиназы и фосфофруктокиназы, ключевого фермента гликолиза, лимитирующего его скорость в зависимости от концентрации АТФ [20]. Подавление окисления в цикле Кребса, имеющем центральное значение не только в производстве энергии, но и в биосинтезе множества метаболитов, также достигается за счет ингибирования пируватдегидрогеназы с помощью фосфорилирования протеинкиназами [20]. Жирные кислоты, образующиеся за счет липолиза триглицеридов, — главный источник энергии во время оцепенения на начальных стадиях баута, и их использование в этот период резко возрастает [18, 19, 21]. В результате β -окисления жирных кислот в митохондриях образуется ацетилкоэнзим А, с которого начинается цикл Кребса.

Суть этих фактов согласуется с нашими данными, поскольку на разных стадиях гибернации и при межбаутном пробуждении существенно изменяется пул глутаминовой кислоты, участника анаэротической реакции превращения в α -кетоглутарат для цикла Кребса путем обратимого дезаминирования при участии глутаматдегидрогеназы. Самый богатый пул глутамата у летнего суслика, 5.08 мкмоль/г; пул аланина в то же время почти в три раза меньше, 1.78 ± 0.15 мкмоль/г (табл. 1). Эта пропорция отражает значительное преобладание на данном этапе аэробных процессов, происходящих в митохондриях, и, соответственно, достаточно высокое содержание АТФ.

В условиях гипоксии в период гибернации происходит ослабление метаболизма миокарда. Для окисления жирных кислот, поступающих в митохондрии, кислорода не хватает, в связи с чем в кардиомиоцитах накапливаются недоокисленные активные формы жирных кислот в виде ацилкарнитина и ацилкоэнзима А, разрушающие клеточные мембраны и блокирующие доставку АТФ к органеллам клетки. Количество жирных кислот в плазме крови, скелетных мышцах, сердце и печени якутских сусликов увеличивается в сезон гиберна-

ции и растет при выходе из оцепенения [19, 20]. Резонно предположить, что уменьшение доставки АТФ находит отражение и в постепенном снижении количества анаэробных глутамата и аспартата (табл. 1).

Помимо сказанного, в процессе длительного оцепенения происходит переход от окисления жирных кислот и кетоновых тел, — соответственно, от цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, — к более экономичному анаэробному окислению глюкозы. Вероятно, именно этот переход и вызывает, в зависимости от длительности торпора, соответствующие изменения соотношения глутаминовой кислоты и аланина в сторону повышения аланина и эквивалентного уменьшения глутамата (табл. 1; рис. 1). Таким образом, соотношение количества глутамата и аланина в миокарде гибернаторов может быть свидетельством преобладания или аэробного окисления (цикл Кребса и окислительное фосфорилирование), или, соответственно, анаэробного гликолиза.

Ярко выраженные на стадиях гибернации реципрокные отношения между уровнем аланина и глутаминовой кислоты и неизменность их суммарного количества обеспечиваются изоферментом обратимо действующей аланинаминотрансферазы (АЛТ 1), переносящей аминокруппу от глутамата в пируват при участии пиридоксальфосфата, превращая в цитоплазме пируват в аланин. В митохондриях в обратном направлении действует АЛТ 2 [22]. Свойства АЛТ в разных температурных режимах в мозге гибернирующих сусликов изучены Эмирбековым и Мукайловым, определившими, что активность АЛТ при низких температурах выше, чем при нормальных [23]. При низких температурах функционирует, вероятно, изофермент АЛТ [22].

Образование аланина необходимо не только для нейтрализации пирувата, создающего опасное закисление среды, но и для последующего участия в глюконеогенезе. Для этого аланин выделяется в кровь и транспортируется в печень, где захватывается гепатоцитами и где высокая активность АЛТ 1 и, наряду с другими глюкостатическими аминокислотами, значительное количество аланина.

Может ли повышение уровня аланина в миокарде (табл. 1) являться не результатом процессов, происходящих в энергетическом метаболизме, а следствием длительного голодания гибернирующих животных? Литературные данные предлагают целесообразность отрицательного ответа на этот вопрос, сообщая о балансе синтеза и распада белков, существующего в гипертрофированном миокарде, о том, например, что масса сердечной мышцы сусликов *Spermophilus lateralis* до зимовки и после шести месяцев спячки увеличивается на 21% [3]. Помимо этого, установлено, что фракция полисом уменьшается на стадии торпора и снова уве-

личивается при пробуждении, соответствуя активации биосинтеза белка в период выхода животного из спячки [24]. Целый ряд механизмов вносит вклад в устойчивость гибернаторов к мышечной атрофии, включая повышенный уровень антиоксидантов [25], пониженный уровень миостатина, регуляцию транскрипционных факторов, связанных с мышечной активностью [26, 27]. Таким образом, несмотря на невероятно низкий уровень метаболизма в течение оцепенения, экспрессия некоторых генов и синтез белков усиливаются, обеспечивая в каждый конкретный момент потребности организма [27].

Первичная причина снижения уровня глутамата при увеличении длительности торпора является, на наш взгляд, отражением цепи следующих событий: накопление кетонов и недоокисленных жирных кислот в виде ацилкарнитина и ацилкоэнзима А, блокирующих доставку АТФ к органеллам клетки; последующий за этим событиям переход к гликолизу; накопление пирувата и его утилизация при помощи трансаминирования в аланин из “отработавшего” глутамата. Однако изменение пулов глутаминовой кислоты от снижения до возрастания на разных стадиях гибернации (табл. 1) отражает, несомненно, не только ее участие в поддержании уровня α -кетоглутарата для цикла Кребса. В сердечной мышце существует большой внутриклеточный пул глутамата — и, в меньшей степени, аспартата, — которые в нормальных условиях определяют равновесие метаболического фона [5, 7, 8]. Эти метаболиты, согласованно участвуя в важнейших анаэробных реакциях цикла Кребса, поддерживают необходимое количество субстратов; при этом между уровнем АТФ, аспартатом и глутаматом существует положительная метаболическая взаимосвязь [5, 9]. Однако, помимо энергетической роли, у этих аминокислот при нормальных температурах существует множество других функций [7, 8]. В наших опытах снижение уровня глутаминовой кислоты сопровождается снижением уровня глутамината; следовательно, ее убыль не связана с синтезом глутамината. Весьма активная в метаболизме глутаминовая кислота может участвовать во множестве других реакций, включая синтез белка, синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, синтез глутатиона и т.д. Она глюкостатична, и не только сама превращается в глюкозу, но и ускоряет ее образование из других веществ в печени и почках (глюконеогенез), по своей способности к стимуляции глюконеогенеза уступая лишь аланину. В состоянии гибернации, возможно, реализуются не все реакции или же происходит изменение степени их участия в том или ином метаболическом процессе.

Не удивительно, что снижение уровня глутаминовой кислоты по мере увеличения длительности торпора коррелирует со снижением уровня аспарагиновой кислоты (табл. 1). Обе аминокислоты яв-

ляются участницами ключевых анаэробных реакций и, в связи с этим, действуют солидарно. Глутамат при участии аланинаминотрансферазы отдает аминокетогруппу пирувату, превращаясь в альфа-кетоглутаровую кислоту, а аспарат в результате трансаминирования превращается в оксалоацетат. Так как эти ключевые реакции взаимосвязаны в цикле Кребса, уменьшение пула оксалоацетата (следовательно, и аспартата) влечет уменьшение пула альфа-кетоглутарата (следовательно, и глутамата). Обе реакции обратимы, и наличие определенного уровня этих дикарбоновых аминокислот является маркером удовлетворительного состояния миокарда.

Как следует из результатов нашей предыдущей работы, метаболизм аминокислот в скелетных поперечнополосатых мышцах гибернирующих сусликов в сравнении с миокардом отличается кардинально [28]. В отличие от миокарда, во время зимней спячки минимальные энергетические затраты скелетных мышц обеспечивает анаэробный гликолиз и, вероятно, по этой причине изменение глутамата, аланина и глицина, активно изменяющихся в миокарде, на соответствующих баутах мало заметны. В то же время аккумуляция пула аспарагиновой кислоты в мышцах выглядит феноменальной: в начале баута ее пул увеличивается более чем в 20 раз, а в конце баута — более чем в 40. В количестве, сопоставимом с пулом аспартата, на этих же стадиях торпора в скелетных мышцах аккумулируется цистин (0.45 и 0.60 мкмоль/г в начале и в конце торпора), не выявляемый в мышцах контрольных животных и имеющий тенденцию на снижение в миокарде (табл. 1). Помимо этих различий, в скелетных мышцах сусликов, в отличие от миокарда (табл. 1), в период зимней спячки пул таурина практически не изменяется [29]. Этот факт может свидетельствовать о дополнительной востребованности таурина в функционирующем, хотя и малоактивном, сердце. Таурин, не имея четко определенной функции, выполняет множество разнообразных функций: модулирует в сердце транспорт кальция, продукцию цитокинов, эйкозаноидов и т.д.; его истощение связано с развитием кардиомиопатии [29]. Между количеством таурина и частотой сердечных сокращений существует корреляция, причем самое высокое содержание таурина обнаружено у видов с самой высокой частотой сердечных сокращений [29]. Радикальные различия механизмов адаптации к экстремальному состоянию зимней спячки скелетных и сердечных мышц неизбежны и вызваны не только различием их морфологии, но и функции.

Кажется удивительным, но нет принципиальных различий метаболизма глутамата, аспартата и аланина в мозге хомяка [30], по сравнению с сердцем суслика во время торпора и эутермии (табл. 1). По данным Осборна и Хашимото [30] в тканях переднего и среднего мозга хомяков *Mesocricetus auratus*

оцепенение, длившееся от 29 до 62 часов при +5°C, было, как и в наших экспериментах, связано с более низким, по сравнению с эутермией, содержанием аспартата и глутамата и с соответствием более высоким уровнем аланина. Напрашивается вывод, что такое сходство обусловлено равноценными потребностями в количестве АТФ функционирующего миокарда и мозга, — несмотря на “мнимое” оцепенение, сохраняющее его активность.

Изучение ответов аминокислот миокарда зимне-спящих сусликов *U. undulatus* на разных стадиях гибернации выявило взаимосогласованные и противоположно направленные изменения пулов глутаминовой кислоты и аланина на всех стадиях гибернации, включая эутермию. Объяснение этих реципрокных и ярко выраженных изменений дается с позиций соответствующего переключения энергетических путей: с аэробного гликолиза на анаэробный и, во время эутермии, напротив, с анаэробного гликолиза на аэробный (цикл Кребса и окислительное фосфорилирование). Резкое падение содержания глицина на всех стадиях гибернации, — возможно, определяющее специфику метаболизма гибернации, — предполагает его исключительно активное участие в процессах адаптации и, возможно, этот факт следует учитывать при составлении кардиоплегических растворов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и были одобрены Комиссией по биоэтике (Институт биофизики клетки РАН — Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Протокол 3/092021 от 08.09.2021 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа выполнена в рамках Государственного задания Института биофизики клеток РАН “Механизмы естественного и искусственного гипобиоза”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.В.К.), сбор данных (М.В.К.), обработка данных (М.В.К.,

Н.М.З.), написание и редактирование манускрипта (М.В.К., Н.М.З.).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают искреннюю благодарность А.С. Аверину, который выделял биоматериал, использованный в этом исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carey HV, Andrews MT, Martin SL* (2003) Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature. *Physiol Rev* 83: 1153–1181. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2003>
2. *Geiser F* (2004) Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annl Rev Physiol* 66: 239–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>
3. *Wickler SJ, Hoyt DF, Breukelen F* (1991) Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 261: 1214–1217. <https://doi.org/10.1152/ajpregu>
4. *Pisarenko O, Solomatina E, Ivanov V, Studneva I, Kapelko V, Smirnov V* (1985) On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardio* 180(2): 126–134. <https://doi.org/10.1007/BF01910459>
5. *Arsenian M* (1998) Potential cardiovascular applications of glutamate, aspartate, and other amino acids. *Clin Cardiol* 21(9): 620–624. <https://doi.org/10.1002/clc.4960210904>
6. *Stanley W, Recchia F, Lopaschuk G* (2005) Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00006.2004>
7. *Taegtmeier H, Harinstein ME, Gheorghide M* (2008) More than bricks and mortar: Comments on protein and amino acid metabolism in the heart. *Am J Cardiol* 101(11): S3–S7. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.064>
8. *Bröer S, Bröer A* (2017) Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. *Biochem J* 474(12): 1935–1963. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160822>
9. *Pisarenko O* (1996) Mechanisms of myocardial protection by amino acids: Facts and hypotheses. *Clin Exp Pharm Physiol* 23: 627–633. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb01748.x>
10. *Vermillion KL, Anderson KJ, Hampton M, Andrews MT* (2015) Gene expression changes controlling distinct adaptations in the heart and skeletal muscle of a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 47 (8): 58–74. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00108.2014>
11. *Fahlman A, Storey J, Storey K* (2000) Gene Up-Regulation in Heart during Mammalian Hibernation. *Cryobiol* 40: 332–342. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2254>
12. *Tessier S, Storey K* (2012) Myocyte enhancer factor-2 and cardiac muscle gene expression during hibernation in thirteen-lined ground squirrels. *Gene* 501: 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.004>
13. *Zhang Y, Aguilar OA, Storey KB* (2016) Transcriptional activation of muscle atrophy promotes cardiac muscle remodeling during mammalian hibernation. *Peer J* 4: e2317. <https://doi.org/10.7717/peerj.2317>
14. *Spackman D, Stein W, Moore S* (1958) Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal Chem* 30: 1190–1206.
15. *Ralphe JC, Bedel KI, Segar JL, Scholz TD* (2005) Correlation between myocardial malate/aspartate shuttle activity and eaat1 protein expression in hyper- and hypothyroidism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5): H2521–H2526. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00991.2004>
16. *Karanova M* (2018) Impact of Seasonal Temperature Decrease and Cold Shock on the Composition of Free Amino Acids and Phosphomonoethers in Various Organs of Amur Sleeper *Percottus glenii* (Eleotridae). *J Ichthyol* 58 (4): 570–579. <https://doi.org/10.1134/S0032945218040069>
17. *Karanova M* (2018) Effects of Cold Shock Responses of Phosphomonoesters and Free Amino Acids in Phospholipid-Rich Organs in the Amur Sleeper *Percottus glenii*. *Neurosci Behav Physiol* 48(5): 528–533. <https://doi.org/10.1007/s11055-018-0595-3>
18. *Izrailova GR, Khalilov RA, Adieva AA* (2014) Modern approaches to the investigation of hypothermia. *Biol Sci* 11 (5): 1046–1059.
19. *Andrews M, Russeth K, Drewes L, Henry P-G* (2009) 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: 383–393. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90795.2008>
20. *Storey K* (1997) Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations. *Comp Biochem Physiol A* 118 (4): 1115–1124. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(97\)00238-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(97)00238-7)
21. *Suozi A, Malatesta M, Zancanaro C* (2009) Subcellular distribution of key enzymes of lipid metabolism during the euthermia-hibernation arousal cycle. *J Anat* 214 (6): 956–962. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01086.x>
22. *Yang R-Z, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong D-W* (2009) Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology* 49(2): 598–607. <https://doi.org/10.1002/hep.22657>
23. *Эмирбеков ЭЗ, Мукайлов МИ* (1971) Глутаминсинтезная, глутаминовая, аспартат- и аланинаминотрансферазная активность головного мозга сусликов при зимней спячке. *Вопр биохим нерв сист* 1: 8–13. [*Emirbekov EZ, Mukailov MI* (1971) Glutamine synthetase, glutaminase, aspartate and alanine amino transferase activity of the brain of ground squirrels during hibernation. *Quest biochem nervn syst* 1: 8–13. (In Russ)].

24. Knight JE, Narus EN, Martin SL, Jacobson A, Barnes BM, Boyerm BB (2000) RNA stability and polysome loss in hibernating arctic ground squirrels (*Spermophilus parryii*). *Mol Cell Biol* 20 (17): 6374–6379. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6374-6379.2000>
25. Allan ME, Storey KB (2012) Expression of NF-κB and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Cell Biochem Funct* 30: 166–174. <https://doi.org/10.1002/cbf.1832>
26. Brooks NE, Myburgh KH, Storey K (2011) Myostatin levels in skeletal muscle of hibernating ground squirrels. *J Exp Biol* 214 (15): 2522–2527. <https://doi.org/10.1242/jeb.055764>
27. Eddy SF, Storey KB (2007) p38 MAPK regulation of transcription factor targets in muscle and heart of hibernating bats, *Myotis lucifugus*. *Cell Biochem Function* 25: 759–765. <https://doi.org/10.1002/cbf.1416>
28. Karanova M, Zakharova N (2022) Pools of Amino Acids of Skeletal Muscle in Yakutian Ground Squirrel *Urocitellus undulatus* during Different Hibernation Stages. *Biophysics* 67(2): 288–293. <https://doi.org/10.1134/S0006350922020105>
29. Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, Azuma J (2010) Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J Biomed Sci* 17(S1): S2.
30. Osborne PG, Hashimoto M (2008) Mammalian cerebral metabolism and amino acids neurotransmission during hibernation. *J Neurochem* 106: 1888–1899. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05543.x>

ADAPTIVE MODIFICATION OF AMINO ACID POOLS IN THE MYOCARDIUM OF THE LONG-TAILED GROUND SQUIRREL *UROCITELLUS UNdulatus* AT DIFFERENT STAGES OF HIBERNATION

M. V. Karanova^{a,#} and N. M. Zakharova^a

^a*Institute of Cell Biophysics, FRC PSCBR, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

[#]*e-mail: karanovari@mail.ru*

The state of hibernation is characterized by increased resistance to the effects of prolonged deep hypothermia, hypoxia, lack of food and water. At the same time, the restructuring of the adaptive mechanisms of animals at low temperatures, even for a short time, causes significant changes in metabolism, reflected in the pattern of amino acids. The change in the metabolism of free myocardial amino acids during hibernation has not yet been studied by anyone, but the idea of it is necessary to understand the mechanisms of the hibernation state, which is relevant for clinical medicine. In this regard, the task of this work was to study the changes in the composition of free amino acids of the myocardium of the ground squirrel *U. undulatus* at different stages of hibernation. A negative interdependence of glutamic acid and alanine pools at different stages of torpor was revealed. The decrease in the level of glutamic acid compared to the summer control ($5.08 \pm 0.44 \mu\text{mole/g}$ wet weight) began in the first, December bout, continued with prolonged torpor (up to $1.57 \pm 0.14 \mu\text{mole/g}$) and was accompanied by a corresponding increase in the alanine pool. During the winter awakening, the glutamic acid pool rose above the summer level; The pool of alanine fell below the summer level, but their total level did not change. The pools of aspartic acid and glycine decreased in parallel with the decrease in pools of glutamate and aspartate, but during the winter awakening, glycine was not even detected. Taking into account the participation of glutamic acid and aspartate in the anaplerotic reactions of the Krebs cycle and the reciprocal relationship of glutamic acid and alanine, it is concluded that the change in the content of these metabolites at different stages of bouts is associated with a gradual transition of aerobic glycolysis (Krebs cycle and oxidative phosphorylation) to anaerobic, and during euthermia, on the contrary, with a return to aerobic.

Keywords: hibernation, bout, ground squirrel, myocardium, amino acids, energy metabolism