

На правах рукописи



Черных Алексей Анатольевич

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ОСТРОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА
УРОВНИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА**

03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Сыктывкар – 2020

Работа выполнена в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор

Бойко Евгений Рафаилович

Официальные оппоненты: **Хлыбова Светлана Вячеславовна,**

доктор медицинских наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры акушерства и гинекологии

Рылова Наталья Викторовна,

доктор медицинских наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, Центр спортивной медицины и реабилитации, заведующая лабораторией спортивной нутрициологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины)» Министерства Обороны Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится «17» марта 2021 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.038.01 в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, nivarlam@physiol.komisc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, и на сайте <http://www.physiol.komisc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 202__

Ученый секретарь диссертационного совет:



Варламова Н.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Гипоксия является актуальной проблемой биомедицинской науки, поскольку практически любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного гомеостаза организма (MacInnis et al., 2015, Новиков и др., 1998). Комплексные исследования проблемы гипоксии способствовали получению новых фундаментальных знаний в физиологии, развитию возможностей диагностики и лечения критических состояний у человека (Dempsey, Morgan, 2015). Физиология гипоксии также является основой высотной физиологии, занимающейся медицинскими и физиолого-гигиеническими аспектами альпинизма, трудовой деятельности на больших высотах, обеспечением безопасности полетов в современной авиации и космонавтике (Сороко, Бурых, 2004, Petrassi, et al., 2012).

Воздействие гипоксии приводит к сдвигам в биохимических показателях крови, вызванных изменениями функционирования метаболических путей. Такие изменения происходят, в том числе, в фундаментально важных для организма метаболических системах, в частности, в обмене углеводов (Бойко и др., 2010), обмене белков и аминокислот (Liao et al., 2016).

В организме аминокислоты (АК) используются для биосинтеза структурных и функциональных белков, некоторых биологически активных соединений (гормоны, медиаторы, и т.п.), участвующих в регуляции функций организма (Synober, L.A., 2004; Wu, G. 2013), а также сами участвуют в регуляции различных процессов (Chen et al., 2014, Yoshizawa, 2012, Kanazawa et al., 2004). Кроме этого, АК также играют роль катаболических субстратов, поддерживающих энергетический метаболизм (Synober et al., 2004; Ferrando, 2013).

Будучи гетерогенным классом соединений многие АК имеют свои специфические метаболические пути и свои специфические функции. Так, например, дикарбоновые АК и их амиды (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин и глутамин) играют важную роль в обмене других АК, обмене азота, синтезе мочевины и обеспечении энергетического метаболизма быстро делящихся тканей (Brosnan, J.T., 2003; Cruzat, V. et al., 2018). Глутамат является ключевым возбуждающим нейромедиатором в ЦНС (Hawkins, R.A., 2009). Заменяемая АК пролин служит компонентом ключевых структурных белков организма и участвует в регуляции экспрессии генов и дифференциации клеток (Чалисова и др., 2011, Servet et al., 2012), активации mTOR, синтезе активных форм кислорода (Donald et al., 2001; Phang, J.M., 2015). Заменяемая АК глицин, наряду с пролином и гидроксипролином (протеиногенной, но некодируемой АК), является ключевым компонентом коллагенов, а также вместе с серином и метионином, участвует в обмене одноуглеродных фрагментов (Ducker, G.S., Rabinowitz, J.D., 2017). АК с разветвлённой цепью (АКРЦ) – валин, лейцин, изолейцин – играют важную роль в метаболизме скелетных мышц и регуляции обмена белков (Blomstrand et al., 2006; Rennie et al., 2006). Ароматические АК (ААК) фенилаланин, тирозин, гистидин и триптофан служат предшественниками

нейромедиаторов и гормонов (дофамина, адреналина, норадреналина, гистамина, серотонина), и пигмента меланина (Krzysciak, 2011). Аланин играет важную роль в межорганном обмене субстратов глюконеогенеза (Felig, 1973; Layman, Baum, 2004). Аргинин служит субстратом для ферментативного синтеза оксида азота (NO) – одного из ключевых тканевых регуляторов сосудистого тонуса и кровотока (Morris, Sidney, 2016). Серосодержащая АК метионин участвует в реакциях метилирования и в работе антиоксидантных систем (Brosnan J.T., Brosnan, 2006).

Концентрации свободных АК в плазме крови – наиболее доступный показатель, отражающий изменение обмена АК в организме. У человека отсутствует истинное депо АК, и его функцию выполняют различные структурные и функциональные белки тканей и клеток (Суповер, 2004). По этой причине пул свободных АК плазмы играет очень важную роль в процессах обмена АК, и уровни свободных АК в крови достаточно жёстко контролируются (Вггер, Вггер, 2017). Изменения уровней свободных АК плазмы свидетельствуют о заметных метаболических перестройках в организме, в первую очередь в обмене конкретных АК.

На данный момент особенности метаболизма АК у человека в условиях острой гипоксии изучены недостаточно. Работы, выполненные на человека, в основном опирались на модели высотной гипоксии (Castell, L. M. et al., 2010; Liao, W. T. et al., 2016), нередко оценивали показатели только отдельных АК (Bailey et al., 2000; Bailey et al., 2001). Высотная гипоксия сопровождается воздействием других факторов: низкого барометрического давления, температуры, влажности воздуха – которые затрудняют анализ результатов и идентификацию эффектов «чистой» гипоксии. Это отчасти можно компенсировать, применив модель нормобарической гипоксии. Работы, анализировавшие полный профиль свободных АК в условиях нормобарической гипоксии, выполнялись в основном на различных животных, использовали различные протоколы и модели гипоксического воздействия (Albekairi, 1989; Bondoli et al., 1980; Muratsubaki, Yamaki, 2011). Отсутствие единой картины метаболизма АК в условиях гипоксии ограничивает наше понимание способов и механизмов адаптации организма человека к воздействию острой экзогенной гипоксии. Таким образом, можно заключить, что изучение изменений показателей метаболизма АК при гипоксии имеет большое теоретическое и практическое значение.

Цель исследования. Изучить влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободных аминокислот в плазме крови добровольцев-мужчин.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Изучить влияние острой нормобарической гипоксии (ГТС-9) на уровни свободных аминокислот плазмы крови у здоровых добровольцев-мужчин в динамике гипоксического периода при гипоксическом тестировании натошак и не натошак.

- 2) Оценить динамику уровней свободных аминокислот плазмы крови у здоровых добровольцев-мужчин, участвовавших в исследовании натошак и не натошак, в восстановительном периоде после острой нормобарической гипоксии (ГГС-9).
- 3) Выявить различия в динамике уровней свободных аминокислот в гипоксическом и восстановительном периодах при воздействии острой нормобарической гипоксии (ГГС-9) натошак и не натошак.

Научная новизна исследования. Впервые в исследовании на молодых добровольцах-мужчинах (возраст 22-32 года) получены данные о влиянии острой нормобарической гипоксии (с использованием гипоксической газовой смеси, содержащей 9% O₂ – ГГС-9) на уровни свободных аминокислот плазмы крови человека в период острого гипоксического воздействия и в восстановительный период.

Впервые продемонстрированы различия в динамике изменений ряда свободных АК – глутамина, серина, треонина и гистидина – в первые 20 минут острой нормобарической гипоксии между группами, проходившими исследование натошак и не натошак (после лёгкого низкожирового завтрака).

Впервые в исследовании на добровольцах показано повышение уровней ряда свободных аминокислот – пролина, гидроксипролина, глицина, фенилаланина и тирозина – плазмы крови добровольцев в гипоксический период при остром гипоксическом воздействии натошак (25 мин гипоксии, ГГС-9).

Впервые продемонстрировано повышение уровня свободной глутаминовой кислоты плазмы крови в восстановительном периоде у добровольцев-мужчин после воздействия острой нормобарической гипоксии натошак (25 мин гипоксии, ГГС-9).

Впервые у человека показано снижение уровня свободного метионина плазмы крови в восстановительном периоде после воздействия острой нормобарической гипоксии натошак (25 мин гипоксии, ГГС-9) и не натошак (45 мин гипоксии, ГГС-9).

У добровольцев, подвергавшихся воздействию острой нормобарической гипоксии не натошак (45 мин гипоксии, ГГС-9), не наблюдалось изменений уровней свободных аминокислот плазмы крови во время гипоксии. В то же время в этой группе было выявлено снижение уровней свободных глутамина, аланина и гистидина плазмы крови в восстановительном периоде, чего не наблюдалось у добровольцев, участвовавших в исследовании натошак (25 мин гипоксии, ГГС-9).

Теоретическая и практическая значимость. Установлена роль алиментарного фактора и длительности острой гипоксии в различиях динамики уровней свободных аминокислот плазмы крови при гипоксическом воздействии и в восстановительном периоде после гипоксического воздействия у добровольцев-мужчин, участвовавших в исследовании.

Полученные в настоящем исследовании результаты указывают, что в отсутствии истинного депо аминокислот в организме человека при острой нормобарической гипоксии и в восстановительном периоде после гипоксического

воздействия происходят изменения в работе ряда метаболических путей отдельных аминокислот, которые могут иметь адаптивное значение при воздействии острой гипоксии.

Результаты нашей работы указывают, что в отсутствии истинного депо аминокислот в организме человека, ряд аминокислот, вероятно, мобилизируются из тканей организма в ответ на острое гипоксическое воздействие натошак.

Наблюдаемые изменения уровней свободных аминокислот позволяют заключить, что в восстановительном периоде после острого гипоксического воздействия натошак происходят изменения в процессах транс- и дезаминирования аминокислот, что может свидетельствовать об изменениях метаболизма аминокислот и белков, и повышенной утилизации мобилизованных при гипоксии свободных аминокислот.

Выявленные сходные изменения уровней свободного метионина плазмы у добровольцев, участвовавших в исследовании натошак и не натошак, могут быть свидетельством того, что в условиях гипоксии обмен серосодержащих аминокислот играет важную роль в работе антиоксидантных систем организма и реакции на оксидативный стресс вне зависимости от статуса питания добровольцев.

Изменения уровней аминокислот в восстановительном периоде в ненатошачевой группе позволяют предположить, что доступность различных нутриентов может влиять на специфические метаболические системы различных АК, включая работу глюкозо-аланинового челнока, утилизацию глутамин в тканях и метаболизм гистидина. Это может иметь важное значение для обеспечения физической работоспособности, функционирования висцеральных систем и нейрогуморальной регуляции организма при гипоксическом воздействии.

Полученные результаты позволяют дополнить имеющиеся сведения о воздействии гипоксии на обмен аминокислот у человека, создать базу референтных значений уровней свободных аминокислот у молодых здоровых мужчин вне гипоксического воздействия; закладывают основу для оценки изменений метаболизма аминокислот у человека в будущих исследованиях с использованием различных моделей гипоксии у испытуемых. Результаты данной работы могут быть использованы для разработки новых подходов реабилитации человека в гипоксическом и постгипоксическом периодах.

Методология и методы исследования. Как модель острого гипоксического воздействия нами была использована нормобарическая гипоксия, которая достигалась дыханием через маску гипоксической газовой смесью, содержавшей 9% O₂ в N₂ по объёму (ГГС-9). Проводился комплексный анализ содержания свободных АК в плазме крови в динамике гипоксии и восстановления. Работа выполнена с использованием адекватных лабораторных, инструментальных, аналитических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту.

1) Острая нормобарическая гипоксия (ГГС-9) у здоровых молодых добровольцев-мужчин вызывает изменения уровней ряда свободных аминокислот плазмы крови, как в гипоксическом, так и в восстановительном периодах.

2) Воздействие острой нормобарической гипоксии (ГГС-9) не натошак не вызывает значимых изменений в динамике показателей свободных аминокислот плазмы в гипоксическом периоде, а в восстановительном периоде после гипоксии приводит к снижению уровней свободных глутамина, аланина и гистидина.

3) Острая нормобарическая гипоксия (ГГС-9) натошак приводит к повышению уровней свободных пролина, гидроксипролина, глицина, фенилаланина и тирозина плазмы крови в гипоксическом периоде.

4) После острой нормобарической гипоксии (ГГС-9) натошак в восстановительном периоде происходит повышение уровней свободной глутаминовой кислоты плазмы крови.

5) В восстановительном периоде после острой нормобарической гипоксии (ГГС-9) натошак и не натошак наблюдается значимое снижение уровней свободного метионина плазмы крови.

6) У здоровых добровольцев подвергавшихся воздействию острой нормобарической гипоксии (ГГС-9) натошак и не натошак имеются различия в обмене свободных аминокислот.

Внедрение. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедры биохимии и физиологии Медицинского института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина» в курсе лекция по дисциплине «Биохимия» (акт внедрения от 28.09.2020).

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов исследования подтверждается объёмом фактического материала и использованием современных методов статистической обработки данных. Основные результаты исследования представлены на X, XI, XIII Всероссийских молодёжных конференциях «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (2011-2012, 2014 гг., Сыктывкар), II Всероссийской (XVII) молодёжной научной конференции «Молодёжь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2013 г.), II Всероссийской междисциплинарной молодёжной научной конференции «Информационная школа молодого учёного» УрО РАН (Екатеринбург, 2012 г.), II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012 г.), XIV Конференции по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием (Москва, 2013 г.), 6th International Congress of Medicine in Space and Extreme Environments (Берлин, 2014 г.), XIV Конференции молодых учёных, специалистов и студентов (Москва, 2015 г.).

Апробация диссертации состоялась 30 июня 2020 г. (протокол № 4) на заседании Учёного совета ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

Личное участие автора в получении результатов. Автор лично участвовал во всех этапах обследования добровольцев. Все процедуры анализа уровней АК плазмы крови, обработка результатов выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в представляемую работу, обсуждались и публиковались лично и совместно с научным руководителем, другими участниками исследовательской группы.

Легитимность исследования. Протоколы исследований соответствовали положениям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association, 2013) и были одобрены независимым комитетом по этике ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (заключение от 23 ноября 2009 г.).

Структура и объём диссертации. По материалам исследования опубликовано 17 научных работ, из них 2 статьи в журналах, индексируемых Scopus, 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Диссертация изложена на 209 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 таблицами и 33 рисунками, работа состоит из введения, четырёх глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования), заключения, выводов, списка литературы (28 отечественных и 342 зарубежных источников).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из шести основных разделов, содержащих сведения об отдельных АК, пуле свободных АК плазмы крови у человека, классификации гипоксии, экспериментальных моделях гипоксии, свободных АК плазмы крови у человека при гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе Отдела экологической и медицинской физиологии ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар) в рамках программы совместных работ с межинститутской Лабораторией сравнительных эколого-физиологических исследований Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (ИЭФБ РАН, г. Санкт-Петербург). В исследовании участвовали добровольцы – здоровые мужчины молодого возраста (22-32 года). Дизайн исследования и протокол гипоксического воздействия соответствовали положениям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association, 2013) и были одобрены комитетом по этике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (протокол №13 от 23 ноября 2009 г.). Перед началом исследования добровольцы получили всю необходимую информацию об исследовании, о возможных последствиях гипоксии, подписали информированное согласие на участие. Гипоксическое воздействие могло быть остановлено в любой момент по медицинским показаниям или по желанию испытуемого.

В рамках данной работы представлены результаты исследований в двух группах. В связи с тяжестью и длительностью гипоксии добровольцы из первой

группы (45 минут нормобарической гипоксии), проходили обследование после лёгкого низкожирового завтрака. С учётом полученного опыта и результатов, во второй группе длительность гипоксии была сокращена до 25 минут, исследования проводились с утра строго натощак.

В первой группе исследование включало 15 минутную подготовку (сидя в кресле после установки всех датчиков и венозного катетера), 45 минут нормобарической гипоксии (ГГС-9) и 50 минут восстановления. Во второй группе – аналогично 15 минут подготовки, 25 минут нормобарической гипоксии (ГГС-9) и 15 минут восстановления.

Первая группа насчитывала 21 добровольца, вторая – 18 добровольцев. По причине преждевременного завершения теста по желанию добровольца или по объективным показаниям в данную работу включены результаты 9 испытуемых из первой группы (n=9) и 13 испытуемых из второй группы (n=13).

На данный момент существуют различия в нормативах показателей свободных АК плазмы крови у человека у различных исследователей (Cynober et al., 2004; Furst, Stehle, 2004; Klassen et al., 2001; Tan, Gajra, 2006), вероятно, обусловленные различиями изучаемых групп и различными методиками анализа. Для установки референтных значений была рекрутирована группа добровольцев, по характеристикам соответствовавшая экспериментальным группам (22-32 года, n=21); у добровольцев из этой группы был произведён анализ уровней свободных АК плазмы натощак.

Острая нормобарическая гипоксия создавалась путём подачи для дыхания гипоксической газовой смеси (ГГС-9, дыхательная смесь, содержащая 9% O₂ в N₂ по объему) через маску. Гипоксическую газовую смесь ГГС-9 получали, смешивая атмосферный воздух и чистый азот в мешке-резервуаре. Смесь перемешивалась в мешке в течение 30 минут, контроль концентрации кислорода в смеси осуществлялся с помощью газоанализатора.

Добровольцы в ходе исследования находились в положении сидя в медицинском кресле. В локтевую вену устанавливали периферический венозный катетер. С целью предупреждения свертывания крови и сохранения объема циркулирующей крови между заборами крови осуществлялась внутривенная капельная инфузия физиологического раствора NaCl. В ходе исследования сотрудниками Межинститутской лаборатории сравнительных эколого-физиологических исследований ИЭФБ РАН проводился непрерывный контроль функционального состояния организма испытуемых согласно протоколу исследования; полный протокол мониторинга был описан ранее (Сороко и др., 2012; Бойко, Бурых, 2012). Критерием развития у добровольцев острой нормобарической гипоксии считалось снижение показателей насыщения гемоглобина крови кислородом (SpO₂) с 99-98% до 63-65% (Бойко и др., 2010).

Забор образцов венозной крови осуществляли через катетер: по 3 мл крови в пробирку-вакутайнер с антикоагулянтом (гепарином). Протокол предусматривал забор крови перед подачей гипоксической смеси (фон); во время гипоксии и в восстановительном периоде после. В первой группе кровь забирали

на 5-ой, 10-ой, 20-ой и 40-ой минуте гипоксии, и на 10-ой и 50-ой минутах восстановления. Во второй группе – на 5-ой, 10-ой, 20-ой минутах гипоксии и на 5-ой и 15-ой минутах восстановления.

Подготовку проб производили, как было описано ранее (Aristoy, Toldra, 1991; Gu et al., 2012; Kamaura et al., 2010). После подготовки анализ свободных АК плазмы проводили на специализированном аминокислотном анализаторе Agacus (MembraPure GmbH, ФРГ) с градиентным элюированием и постколоночной дериватизацией нингидрином и спектрофотометрическим детектированием окрашенных производных АК. Обсчёт хроматограмм проводили с помощью программы AminoPeak.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения R (v.3.6.1.) (R Development Core Team, 2018). Поскольку не выполнялись допущения, необходимые для применения параметрических методов анализа, были применены непараметрические критерии.

Для расчёта статистической достоверности различий использовали критерий Баумгартнера-Вайса-Шиндлера (для двух независимых выборок), критерий Скиллингс-Мэк (для нескольких зависимых выборок), для оценки значимости множественных сравнений – критерий Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг. Анализ корреляций проводили с помощью робустного коэффициента корреляции. Выявленные различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В тексте, таблицах и графиках данные, полученные в ходе исследования, представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентиля (Me (25%; 75%)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В **таблице 1** представлены данные по фоновым уровням свободных АК плазмы крови у добровольцев из обеих гипоксических групп в сравнении с референтной группой. Нами не было выявлено значимых различий.

При сравнении профилей АК в первой и второй группе в гипоксическом периоде (первые 20 мин гипоксии) на 10-й минуте гипоксии в первой группе было выявлено значимое снижение показателей свободных глутамина, серина, треонина и гистидина по сравнению со второй группой (рисунок 1).

У добровольцев из **первой группы**, проходивших гипоксическое тестирование после легкого низкожирового завтрака (ГГС-9, 45 мин), было выявлено статистически значимое снижение **уровней свободных глутамина, аланина и гистидина** на 10-ой минуте восстановительного периода ($p < 0,05$, рисунок 2).

У добровольцев из второй группы (ГГС-9, 25 мин, натошак), в гипоксическом периоде были обнаружены статистически значимые повышения уровней пролина, гидроксипролина, глицина, фенилаланина, тирозина ($p < 0,05$).

Показатели **уровней свободного пролина во второй группе** в динамике исследования приведены на рисунке 3. Было выявлено значимое повышение в гипоксическом периоде ($p < 0,05$), с последующим значимым снижением ($p < 0,05$).

Таблица 1.

Уровни свободных аминокислот плазмы крови у добровольцев из референтной группы и у добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании в догипоксическом периоде (фон), мкмоль/л, (медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль)).

АК	Референтная группа (n=21)	Первая группа (n=9)	Вторая группа (n=13)
Аспарагин	79,1 (66,3; 89,0)	78,9 (66,5; 93,8)	71,9 (53,9; 84,8)
Глутамат	58,5 (40,1; 79,3)	45,4 (42,6; 71,6)	53,8 (35,2; 76,8)
Глутамин	475,4 (412,1; 550,2)	439,0 (369,2; 460,0)	416,1 (326,0; 533,9)
Аланин	323,9 (261,3; 402,4)	324,4 (307,5; 380,8)	308,7 (221,2; 401,7)
Глицин	236,3 (217,6; 274,5)	215,9 (195,5; 247,9)	226,6 (206,1; 273,9)
Серин	76,9 (70,3; 101,2)	82,2 (60,7; 88,6)	76,9 (67,9; 92,5)
Треонин	141,6 (120,5; 163,9)	132,2 (92,4; 135,1)	138,5 (113,4; 150,6)
Валин	190,0 (170,2; 201,9)	157,5 (150,0; 189,5)	183,4 (159,3; 194,1)
Лейцин	89,5 (81,2; 101,2)	76,3 (69,3; 93,3)	88,3 (73,7; 100,3)
Изолейцин	55,8 (51,5; 71,9)	59,9 (47,7; 60,7)	54,0 (49,3; 60,9)
Метионин	20,9 (18,3; 24,8)	17,5 (14,7; 21,4)	20,1 (17,5; 23,4)
Тирозин	49,3 (39,7; 62,6)	46,4 (40,8; 52,3)	47,9 (38,8; 56,8)
Фенилаланин	44,8 (42,0; 48,7)	50,4 (38,2; 51,6)	44,5 (41,0; 47,2)
Гистидин	63,2 (56,3; 70,7)	54,4 (51,3; 58,7)	58,1 (53,9; 69,7)
Триптофан	30,1 (26,8; 33,6)	30,3 (23,6; 33,1)	29,9 (25,7; 31,2)
Лизин	177,8 (137,6; 210,1)	138,3 (131,7; 180,1)	165,6 (122,5; 196,3)
Аргинин	32,8 (25,3; 35,3)	30,3 (25,9; 33,3)	30,2 (23,7; 34,7)
Пролин	215,5 (197,2; 252,1)	182,9 (164,4; 218,1)	206,0 (182,8; 230,1)
Гидроксипролин	58,9 (49,7; 64,9)	58,3 (42,5; 65,0)	55,9 (40,8; 60,7)

Уровень свободного гидроксипролина также повышался на 10-й минуте гипоксии ($p < 0,05$), но затем не демонстрировал значимых изменений ($p > 0,05$). (рисунок 4).

Уровень свободного глицина у добровольцев во второй группе демонстрировал значимое повышение на 10-й минуте гипоксии ($p < 0,05$, рисунок 5).

Также во второй группе были выявлены значимые изменения **уровней свободного фенилаланина плазмы крови** в динамике гипоксии и восстановительного периода ($p < 0,05$, рисунок 6).

Динамика уровней свободного тирозина во второй группе была сходна с динамикой показателей свободного глицина – значимое повышение на 10-й минуте гипоксии по сравнению с 5-й минутой ($p < 0,05$, рисунок 7).

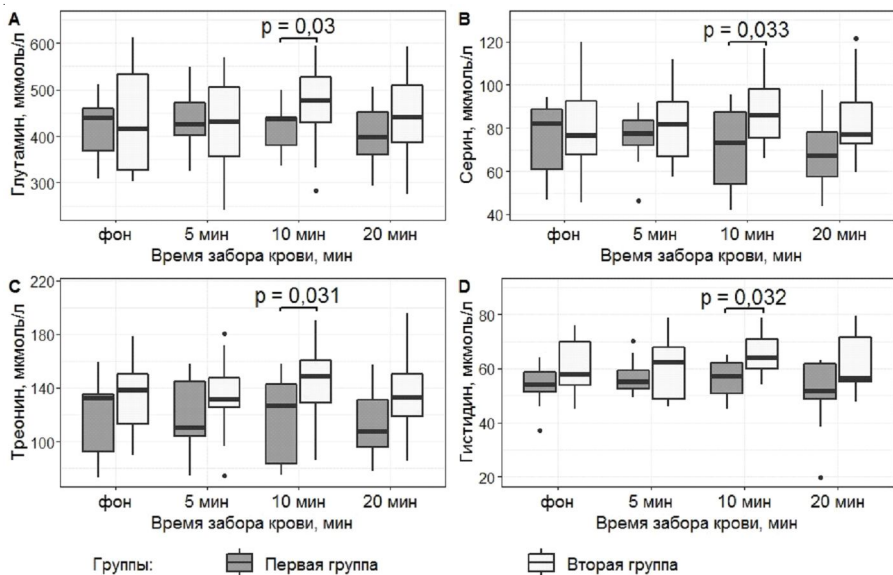


Рисунок 1 – Различия в динамике свободных глутамина, серина, треонина и гистидина между первой и второй группами в первые 20 минут исследования.

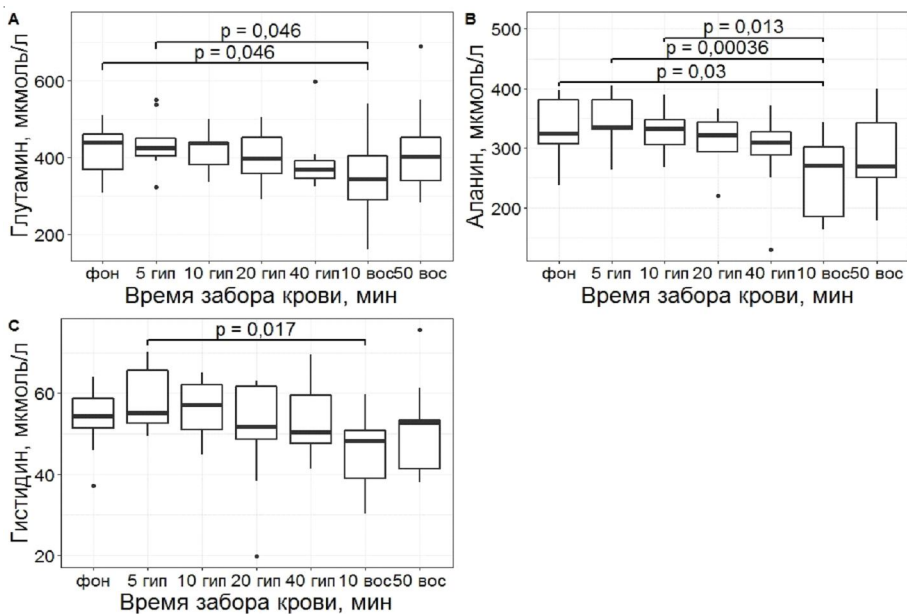


Рисунок 2 – Динамика уровней свободных глутамина (А), аланина (В) и гистидина (С) у добровольцев в первой группе.

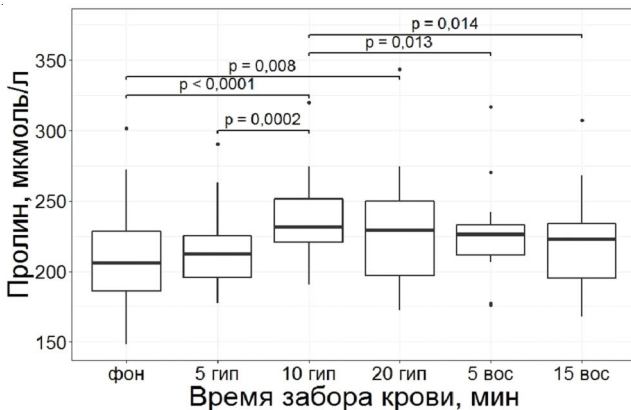


Рисунок 3 – Динамика уровней свободного пролина плазмы у добровольцев во второй группе.

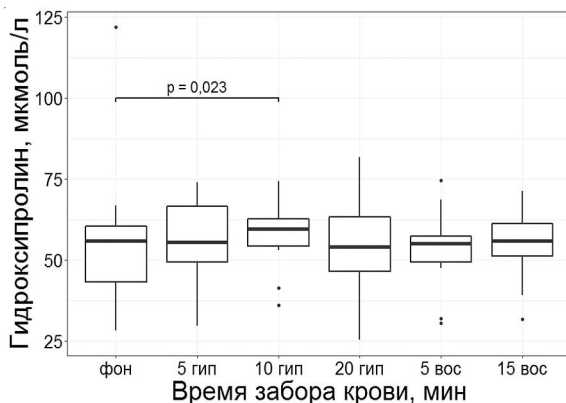


Рисунок 4 – Динамика уровней свободного гидроксипролина плазмы у добровольцев во второй группе.

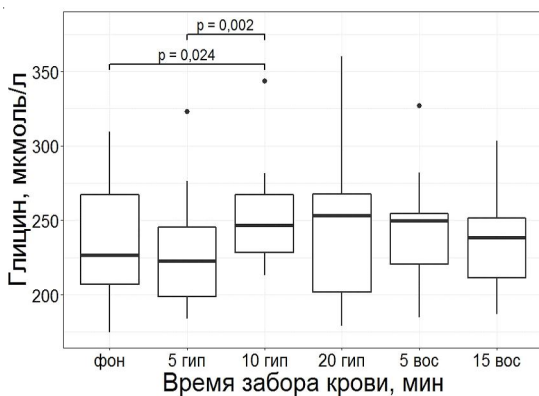


Рисунок 5 – Динамика уровней свободного глицина плазмы у добровольцев во второй группе.

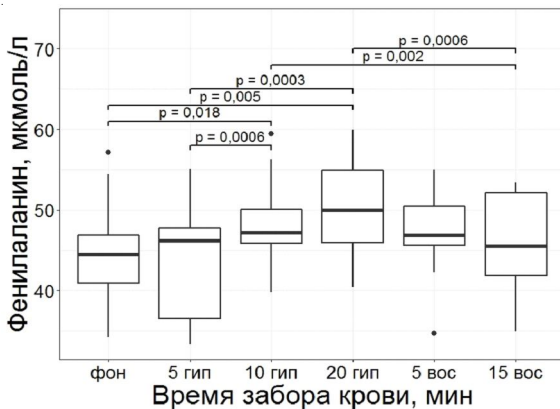


Рисунок 6 – Динамика уровней свободного фенилаланина плазмы у добровольцев во второй группе.

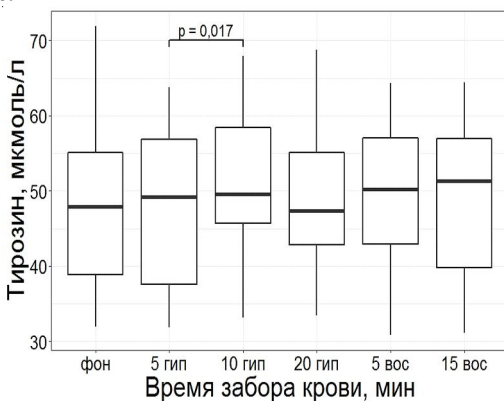


Рисунок 7 – Динамика уровней свободного тирозина плазмы у добровольцев во второй группе.

Уровень свободной глутаминовой кислоты плазмы крови (рисунок 8) у добровольцев из второй группы в гипоксическом периоде значимо не изменялся ($p > 0,05$). В восстановительном периоде отмечалось значимое повышение уровней свободного глутамата по сравнению с фоновым и гипоксическим периодами ($p < 0,05$).

В обеих группах уровни свободного метионина плазмы крови в гипоксическом периоде значимо не изменялись ($p > 0,05$). В восстановительном периоде наблюдалось значимое снижение уровней свободного метионина по сравнению с гипоксическим периодом ($p < 0,05$, рисунок 9).

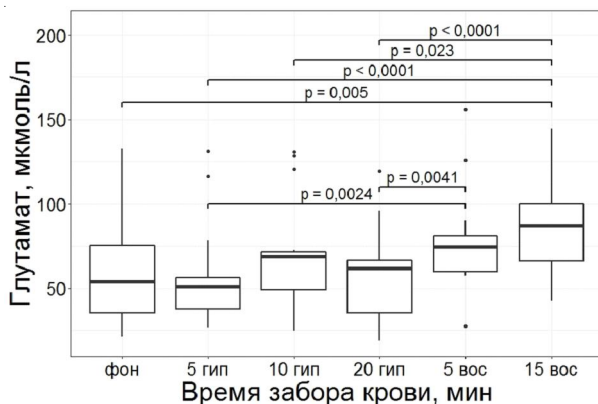


Рисунок 8 – Динамика уровней свободной глутаминовой кислоты плазмы крови у добровольцев во второй группе.

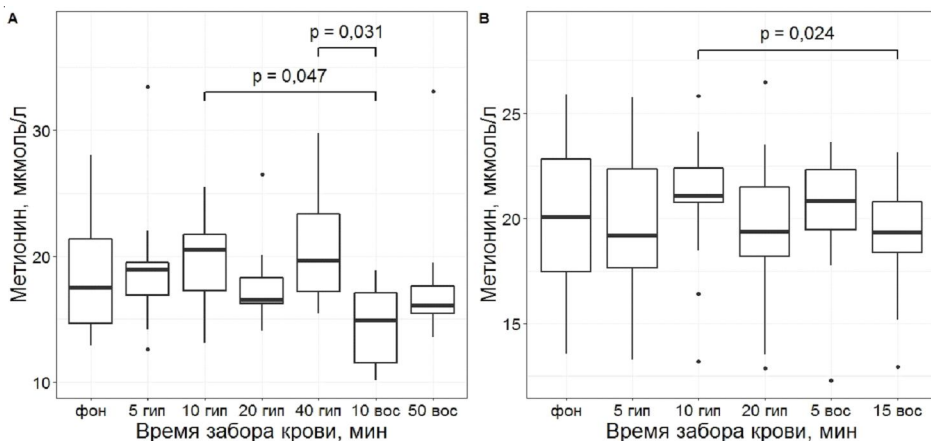


Рисунок 9 – Динамика уровней свободного метионина плазмы крови у добровольцев в первой (А) и второй (В) группах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наблюдаемые различия динамики свободных глутамина, серина, треонина и гистидина между группами, были, вероятно, обусловлены различиями в работе ряда транспортёров АК: ASCT1, ASCT2 и LAT1. Эти переносчики играют очень важную роль в поддержании гомеостаза АК в клетках. Они работают по механизму антипорта, а указанные АК являются их обменными субстратами. Наблюдаемое на 10-й минуте гипоксии снижение показателей этих АК в первой группе по сравнению со второй может говорить о различиях в работе этих транспортных систем вследствие воздействия алиментарного фактора.

Характер изменений профиля свободных АК плазмы крови у добровольцев в первой группе (ГГС-9, 45 мин) отличался от второй группы. Мы полагаем, что наблюдаемое значимое снижение уровней свободных глутамина, аланина и гистидина было связано с большей длительностью гипоксии в первой группе и вкладом алиментарного фактора (участие в исследовании после лёгкого низкожирового завтрака). Наблюдаемое снижение, вероятно, было вызвано изменениями в утилизации глутамина в тканях, модификацией работы глюкозо-аланинового челнока и изменениями в специфических метаболических путях гистидина.

Пролин, гидроксипролин, глицин. Мы полагаем наиболее вероятным объяснением динамики уровней этих АК во второй группе активацию коллагенолиза на фоне острой гипоксии. У человека отсутствует истинное депо АК. Пролин, гидроксипролин и глицин составляют значительную часть массы коллагена (Di Lullo et al., 2002; Szpak, 2011). Коллаген разрушается под действием ферментов - матриксных металлопротеиназ (ММП, Ottino et al., 2004). Ряд ММП синтезируется конститутивно, а их активность регулируется с помощью тканевых ингибиторов ММП – ТИМП (Turner, Porter, 2012). Дополнительным подтверждением нашей гипотезы является значимая положительная корреляция между показателями пролина и глицина. Мы предполагаем, что повышение высвобождения перечисленных АК при воздействии гипоксии могло играть роль в адаптации организма к гипоксии за счёт их метаболических, цитопротективных и регуляторных эффектов.

Повышение уровня незаменимой АК **фенилаланина** может быть вызвано либо поступлением из ЖКТ, либо высвобождением из собственных белков организма. Вторая группа участвовала в исследовании натошак, поэтому мы полагаем вероятной причиной наблюдаемых изменений уровней свободного фенилаланина (и тирозина) у добровольцев активацию аутофагии – разрушения собственных белков клетки (Meijer, A.J. et al., 2015). Аутофагия играет роль в онтогенезе, в антиоксидантной защите (Giordano et al., 2013), формировании адаптивного ответа на стресс и гипоксию (Meijer, Codogno, 2009). В литературе есть сообщения о том, что гипоксия вызывает активацию аутофагии (Lai, M.-C., et al., 2016).

Некатаболические пути утилизации фенилаланина – синтез белка и синтез тирозина. Метаболическая связь подтверждается наличием значимой положительной корреляции между показателями этих АК во второй группе. Согласно представлению об иерархии метаболических процессов при гипоксии, синтез белка подавляется (Connolly, E. et al., 2006). Синтез тирозина из фенилаланина также требует молекулярного кислорода (Jones, D.P., 1986). Вероятно, поэтому динамика тирозина не дублирует динамику фенилаланина, а корреляция исчезает на 20-й минуте гипоксии и 5-й минуте восстановления.

Глутаминовая кислота – ключевой метаболит важных метаболических путей (рисунк 10), направляющий субстраты из одних метаболических систем в другие (Synober et al., 2018). Она также главный продукт/субстрат ферментов-

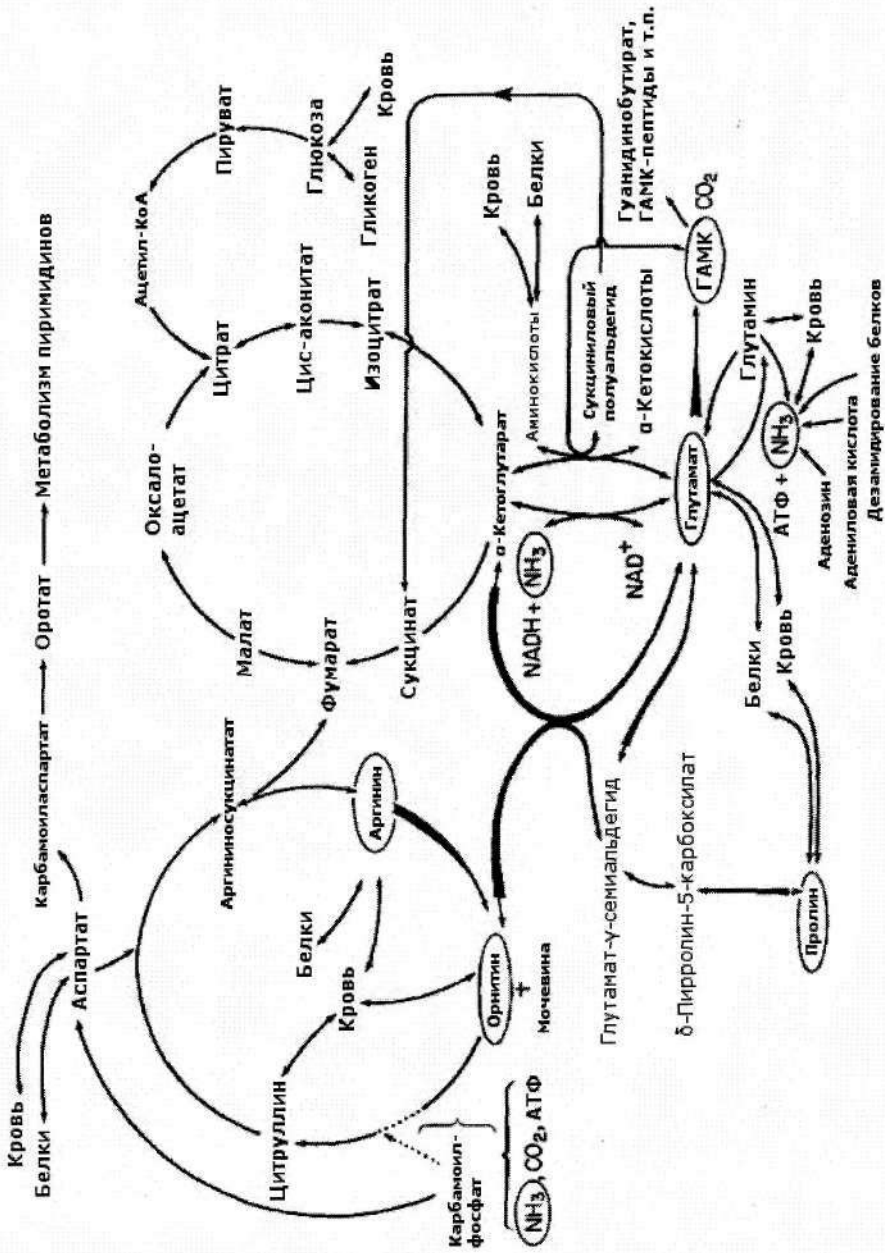


Рисунок 10. – Метаболические пути глутаминовой кислоты (по Е.М. Izhikevich, 2007, с изменениями).

трансаминаз, а катаболизм АК включает трансаминирование. Известно, что гипоксия подавляет активность трансаминаз (Cepelak et al., 2006). Это могло быть одной из причин, по которой уровень глутамата в гипоксию не менялся в обеих группах. Ещё одной причиной могла быть трансформация избытка глутамата в α -кетоглутарат и последующая его утилизация в цикле Кребса. Активизация этого метаболического пути при гипоксии была показана ранее (Mudge et al., 1976).

В восстановительном периоде во второй группе мы наблюдали значимое повышение уровня свободного глутамата, вызванное, вероятно, активацией трансаминирования свободных АК для их утилизации после восстановления оксигенации тканей.

В литературе имеются противоречивые данные о влиянии гипоксии на профиль **серосодержащих АК плазмы крови** – незаменимых АК, играющих важную роль в антиоксидантной защите (Albekairi, 1989; Bondoli et al., 1980; Muratsubaki, Yamaki, 2011; Liao, W.T. et al., 2016). Гипоксия активизирует процессы перекисного окисления (Debevec, T. et al., 2017), снижает содержание глутатиона в клетках вследствие активного расходования, а также подавления ферментов, синтезирующих глутатион (Jackson, Gupta, 2010).

Субстрат синтеза глутатиона, цистеин, поступает из двух источников: клеточного пула цистеина и катаболизма метионина (рисунок 11) (Mosharov et al., 2000). Цикл метионина контролируется по принципу отрицательной обратной связи: отношение транссульфурируемой и реметилируемой фракций гомоцистеина зависит от уровня продуктов катаболизма, в частности цистеина (Di Buono et al., 2003). Также гипоксия ингибирует ключевые ферменты цикла метионина (Avila et al., 1998; Corrales et al., 1999) и предотвращает его катаболизм в цистеин.

Значимое снижение уровня свободного метионина в восстановительном периоде в обеих группах ($p < 0,05$) можно объяснить формированием «отсроченного запроса» на синтез глутатиона вследствие снижения его запасов при гипоксии. Восстановление резервов глутатиона в клетках произошло после восстановления нормального парциального давления кислорода в тканях. Концентрация метионина снизилась вследствие уменьшения регенерации из гомоцистеина. Изменения уровней метионина не зависели от алиментарного фактора и наблюдались и в первой, и во второй группах.

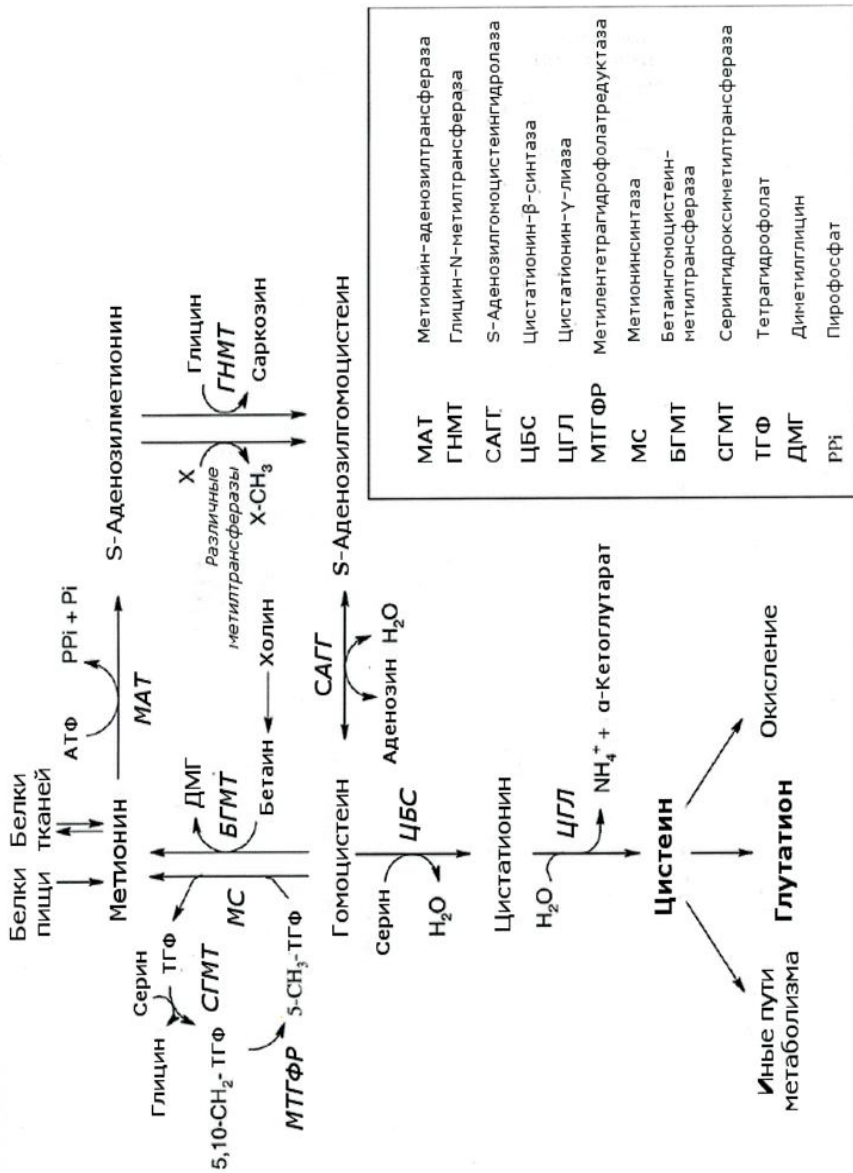


Рисунок. 11 – Схема основных метаболических путей серосодержащих аминокислот (по Brosnan J.T., Brosnan M.E., 2006, с изменениями).

ВЫВОДЫ

1. Острая нормобарическая гипоксия, вызываемая вдыханием гипоксической газовой смеси с содержанием кислорода 9% (ГГС-9), в исследовании на добровольцах вызывает изменения уровней ряда свободных аминокислот плазмы крови как в гипоксическом, так и в восстановительном периодах, обусловленные развивающейся адаптивной реакцией организма, включающей изменения метаболизма отдельных протеиногенных аминокислот.

2. При острой нормобарической гипоксии не натошак (ГГС-9, 45 минут) у добровольцев в гипоксическом периоде не наблюдается изменений уровней свободных аминокислот плазмы. В восстановительном периоде после гипоксии происходит снижение уровней глутамина, аланина и гистидина плазмы крови, что может быть связано с изменениями в функционировании специфических метаболических путей указанных аминокислот.

3. У добровольцев при воздействии острой нормобарической гипоксии натошак (ГГС-9, 25 минут) установлено повышение уровня свободного пролина, гидроксипролина и глицина плазмы крови в гипоксическом периоде; после прекращения гипоксического воздействия уровни этих аминокислот возвращаются к исходным значениям, что отражает реакцию на острую гипоксию и может быть обусловлено повышением их высвобождения из белков соединительной ткани.

4. Воздействие острой нормобарической гипоксии натошак (ГГС-9, 25 мин) у добровольцев приводит к повышению уровней свободных фенилаланина и тирозина плазмы крови в гипоксическом периоде.

5. Уровень свободной глутаминовой кислоты плазмы крови добровольцев на фоне острой нормобарической гипоксии натошак (ГГС-9, 25 минут) не изменяется, а в восстановительном периоде повышается, что может свидетельствовать об активации процессов транс- и дезаминирования аминокислот в этот период как реакции на острое гипоксическое воздействие.

6. У добровольцев в восстановительном периоде после острой нормобарической гипоксии натошак (ГГС-9, 25 минут) и не натошак (ГГС-9, 45 минут) происходит снижение уровня свободного метионина, что, вероятно, свидетельствует об активизации использования этой аминокислоты вследствие активизации процессов свободнорадикального окисления.

7. У добровольцев, при воздействии острой нормобарической гипоксии натошак (ГГС-9, 25 минут) и не натошак (ГГС-9, 45 минут) наблюдаются различия в динамике свободных глутамина, серина, треонина и гистидина, что может быть обусловлено влиянием алиментарного фактора.

8. Выявленные изменения показателей свободных аминокислот в плазме крови добровольцев отражают вовлечение различных физиологических механизмов и метаболических путей в регуляцию метаболизма свободных аминокислот при остром гипоксическом воздействии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка ВАК и в иностранных базах данных:

1. **Черных А.А.** Влияние острой нормобарической гипоксии на уровень ароматических аминокислот и аминокислот с разветвленной цепью в плазме крови человека // В мире научных открытий. 2012. №2(26). С.134-137. (ВАК)
2. **Черных А.А.** Метаболизм ароматических аминокислот при выраженной острой кратковременной экспериментальной нормобарической гипоксии у человека // Экология человека. 2013. №7. С. 59-64. (ВАК, Scopus)
3. Бойко Е. Р., **Черных А. А.**, Потолицына Н. Н., Бурых Э.А., Людина А.Ю., Канева А.М., Вахнина Н.А., Шадрин В.Д., Паршукова О.И., Иржак Л.И., Сороко С.И. Влияние острой нормобарической гипоксии на содержание свободных аминокислот у человека // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2013. № 12. С.1409-1419. (ВАК, Scopus, PubMed)
4. **Черных А.А.** Показатели свободного метионина плазмы крови у человека при острой нормобарической гипоксии // В мире научных открытий. 2014. № 2(50). С.370-381. (ВАК)
5. **Черных А.А.**, Потолицына Н.Н., Бурых Э.А., Бойко Е.Р. Показатели свободных аминокислот плазмы крови человека при нормобарической гипоксии в зависимости от пищевого статуса // Ульяновский медико-биологический журнал. 2020. № 1, С.108-117. (ВАК)

Другие публикации в научных изданиях

6. **Черных А.А.** Влияние экспериментальной острой кратковременной выраженной нормобарической гипоксии на показатели свободных аминокислот плазмы крови человека // Материалы докладов II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». Санкт-Петербург, 12-14 ноября 2012 г. // Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12, №3. С.50-52.
7. Бойко Е.Р., Потолицына Н.Н., Вахнина Н.А., Паршукова О.И., Людина А.Ю., Шадрин В.Д., **Черных А.А.**, Бурых Э.А. Метаболическое обеспечение адаптивного ответа организма у человека при экспериментальной острой выраженной нормобарической гипоксии // Материалы XIV Конференции по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2013. Т.47, №4. с. 23-24.
8. Wojko E., **Chernykh A.**, Burykh E., Soroko S. Metabolic response in humans breathing gas mixtures with extremely low oxygen levels // Материалы доклада 6th International Congress of Medicine in Space and Extreme Environments (ICMS). 16-19 September 2014, Berlin, Germany. P.76.
9. **Черных А.А.** Влияние острой выраженной нормобарической гипоксии на уровни свободных аминокислот плазмы крови человека // Материалы XIV Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённая 65-летию со дня рождения врача-космонавта Морукова Б.В. Москва, 14 апреля 2015 г. С. 57-58.

Список сокращений:

АК – аминокислоты

ААК – ароматические аминокислоты

АКРЦ – аминокислоты с разветвлённой цепью

ГГС-9 – гипоксическая газовая смесь, содержащая 9% O₂

ММП – матриксные металлопротеиназы

ТИМП – тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ

Подписано в печать 24.12.2020
Компьютерный набор. Гарнитура Times New Roman. Формат 60x90^{1/16}.
Бум. IQ allround. Отпечатано на ризографе. Усл. печ. л. 1.0.
Тираж 100. Заказ 148.

Информационно-издательский отдел
Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный
центр Уральского отделения Российской академии наук»
(ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).
Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, 167982,
г. Сыктывкар, ул.Первомайская, д.50