

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КОМИ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ КОМИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЧЕРНЫХ АЛЕКСЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

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

03.03.01 - физиология

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Е.Р. Бойко

Сыктывкар – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Общая характеристика роли аминокислот в организме человека	18
1.2 Функции и метаболизм отдельных аминокислот и групп аминокислот в организме человека	21
1.2.1 Дикарбоновые аминокислоты и их амиды	22
1.2.2 Аминокислоты с разветвлённой цепью	25
1.2.3. Серосодержащие аминокислоты	28
1.2.4. Ароматические аминокислоты	30
1.2.5. Пролин и гидроксипролин	34
1.2.6. Аргинин.....	36
1.2.7. Серин	37
1.2.8. Треонин	38
1.2.9. Аланин.....	39
1.2.10. Глицин	40
1.2.11. Лизин	41
1.3 Профиль свободных аминокислот плазмы крови у человека	41
1.4. Гипоксия у человека: общая характеристика и классификация.....	43
1.4.1. Экзогенная гипоксия.....	44
1.4.2. Эндогенная гипоксия	46
1.4.3. Тканевая гипоксия.....	48
1.4.4. Физиологический ответ организма человека на гипоксию.....	48
1.5. Экспериментальное моделирование гипоксии	51

1.5.1. Модели экзогенной гипоксии	51
1.5.2. Модели эндогенной гипоксии.....	53
1.5.3. Модели тканевой гипоксии	54
1.5.4. Обоснование использования нормобарической гипоксической модели.....	56
1.6. Профиль свободных аминокислот плазмы крови при гипоксии	58
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
2.1 Объекты исследования	60
2.2 Методы исследования	62
2.2.1. Забор образцов крови.....	64
2.2.2. Подготовка образцов крови.....	65
2.2.3. Анализ уровней свободных аминокислот плазмы крови человека.....	65
2.3. Статистическая обработка полученных результатов	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	70
3.1. Характеристика уровней свободных аминокислот плазмы крови у добровольцев в референтной группе.....	70
3.2. Характеристика уровней свободных аминокислот плазмы у добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании, до начала гипоксического тестирования в сравнении с уровнями в референтной группе.....	73
3.3. Различия в динамике свободных АК между первой и второй группами в первые 20 минут гипоксического исследования.....	73
3.4. Динамика уровней свободного глутамина у добровольцев в первой группе	77
3.5. Динамика уровней свободного аланина у добровольцев в первой группе	79
3.6. Динамика уровней свободного гистидина у добровольцев в первой группе	81
3.7. Динамика уровней свободных пролина, гидроксипролина и глицина у добровольцев во второй группе	82
3.8. Динамика уровней свободных фенилаланина и тирозина плазмы крови добровольцев во второй группе.....	87
3.9. Динамика уровней свободной глутаминовой кислоты у добровольцев во второй группе.....	90

3.10. Динамика уровней свободного метионина у добровольцев в первой и второй группах.....	91
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	95
4.1. Общая характеристика выявленных в ходе гипоксического тестирования изменений уровней свободных АК плазмы крови.....	96
4.2. Сравнение динамики уровней свободных АК плазмы крови в обеих группах добровольцев в первые 20 минут гипоксического тестирования	97
4.3. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного глутамина плазмы крови у добровольцев в первой группе.....	103
4.4. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного аланина плазмы крови у добровольцев в первой группе	111
4.5. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного гистидина плазмы крови у добровольцев в первой группе.....	117
4.6. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободных пролина, гидроксипролина и глицина плазмы крови добровольцев во второй группе.....	120
4.7. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного фенилаланина и свободного тирозина плазмы крови добровольцев во второй группе.....	132
4.8. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободной глутаминовой кислоты плазмы крови добровольцев во второй группе.....	143
4.9. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного метионина плазмы крови добровольцев в обеих группах.....	149
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	156
ВЫВОДЫ.....	163
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	165

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NOS	- NO-синтаза
iNOS	- индуцибельная NO-синтаза
SpO ₂	- насыщение гемоглобина кислородом
pCO ₂	- парциальное давление углекислого газа
АК	- аминокислоты/аминокислота
ААК	- ароматические аминокислоты
АКРЦ	- аминокислоты с разветвлённой цепью
ГГС-9	- гипоксическая газовая смесь, содержащая 9% O ₂ по объёму
ГЭБ	- гематоэнцефалический барьер
ЖКТ	- желудочно-кишечный тракт
ММП	- матриксные металлопротеиназы
ТИМП	- тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ
ЦТК	- цикл трикарбоновых кислот
ЦНС	- центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Гипоксия является актуальной проблемой биомедицинской науки, поскольку практически любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного гомеостаза организма (Новиков и др., 1998; Krzysciak, 2011; MacInnis et al., 2015). Гипоксия неизбежно воздействует на все уровни организации живых систем, благодаря своему системному характеру (Агаджанян, Чижов, 2003). Комплексные исследования проблемы влияния измененной газовой среды на живой организм способствовали развитию фундаментальных знаний в области физиологии, в диагностике и лечении критических состояний человека, в понимании влияния на гипоксии на организм (Ушаков и др., 2004; Dempsey, Morgan, 2015). Физиология гипоксии также является методологической основой высотной физиологии – теоретической основы решения медицинских и физиолого-гигиенических аспектов альпинизма, трудовой деятельности на больших высотах, обеспечения безопасности полетов в современной авиации и космонавтике (Ушаков и др., 2004; Petrassi et al., 2012).

Изменения, вызванные недостатком кислорода в тканях, и изменения, вызванные работой механизмов адаптации к этим неблагоприятным условиям, отражаются на биохимических показателях крови, отображающих изменения характера функционирования метаболических путей в условиях гипоксии. Физиологические и биохимические сдвиги при гипоксии, механизмы, их обосновывающие, служат предметом физиологии гипоксии. Эти сдвиги 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).

Аминокислоты (АК) являются одним из четырёх ключевых классов органических соединений в живых организмах. Они служат в первую очередь субстратами для биосинтеза структурных и функциональных белков, а также целого ряда биологически активных соединений (гормонов, медиаторов, паракринных сигнальных молекул, трофических факторов), участвующих в регуляции функций организма (Blomstrand et al., 2006; Fernstrom, Fernstrom, 2007; Bolam, Ellender, 2016). Помимо синтеза белков и пептидов, АК у человека также являются катаболическими субстратами для энергетического метаболизма (Synober, 2004; Ferrando, 2013). Этим функции АК не ограничиваются: они представляют собой группу достаточно гетерогенных соединений, и многие АК имеют свои специфические метаболические пути помимо перечисленных.

Так, дикарбоновые АК и их амиды (аспарагиновая и глутаминовая кислоты, 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 et al., 2018). Глутамат также является ключевым возбуждающим нейромедиатором ЦНС (Hawkins, 2009). Заменяемая протеиногенная АК глутамин активно утилизируется клетками ЖКТ и клетками иммунной системы в качестве энергетического субстрата (Newsholme, 2001; Aledo, 2004); аминокислоты с разветвлённой цепью (АКРЦ) – валин, лейцин, изолейцин – являются одними из ключевых энергетических субстратов скелетной мускулатуры и участвуют в регуляции синтеза белка (Blomstrand et al., 2006; Rennie et al., 2006). Глюкозо-аланиновый челнок осуществляет транспорт недоокисленных субстратов из скелетной мускулатуры (в виде АК аланина) в печень, где после трансаминирования углеродные скелеты используются для глюконеогенеза (Felig, 1973; Layman, Baum, 2004). Незаменимые ароматические АК фенилаланин, тирозин, гистидин и триптофан являются предшественниками нейромедиаторов и гормонов (дофамина, адреналина, норадреналина,

гистамина, серотонина), и пигмента меланина (Krzysciak, 2011). Заменяемая АК аргинин – принципиальный субстрат ферментативного синтеза оксида азота, одной из главных местных сигнальных молекул (Wu, G. Y., Morris, 1998). Заменяемая АК пролин служит не только компонентом ключевых структурных белков-коллагенов, но 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 et al., 2015). Заменяемая АК глицин, наряду с пролином и гидроксипролином (протеиногенной, но не кодируемой АК), является ключевым компонентом коллагенов, а также вместе с серином и метионином, участвует в обмене одноуглеродных фрагментов (Ducker, Rabinowitz, 2017). Также серосодержащие АК метионин и цистеин участвуют в работе антиоксидантных систем (Brosnan J.T., Brosnan, 2006).

Наиболее доступным для оценки показателем, отражающим изменение обмена АК в организме, является концентрация свободных АК в плазме крови. У человека отсутствует истинное депо АК, и его функцию выполняют различные структурные и функциональные белки тканей и клеток (Synober, 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 (Bröer, Bröer, 2017). Таким образом, изменения уровней свободных АК плазмы могут свидетельствовать о заметных метаболических перестройках в организме, в первую очередь в обмене конкретных АК.

На данный момент в специализированной литературе имеется ряд работ, посвящённых изучению влияния гипоксии на показатели свободных АК плазмы крови и метаболизм АК. Подобные работы, выполненные на человеке, в основном опирались на модели высотной гипоксии (Bailey et al., 2000; Castell et al., 2010; Liao et al., 2016); гипоксическое воздействие было длительным, и, возможно, не в полном смысле слова «острым». К тому же исследователи нередко оценивали показатели только некоторых АК:

глутамина, триптофана, АКРЦ (Bailey et al., 2000; Bailey et al., 2001). В то же время ряд работ с нормобарической гипоксией были выполнены на лабораторных животных (Bondoli et al., 1980; Albekairi, 1989; Muratsubaki, Yamaki, 2011). В них использовались различные протоколы и модели гипоксического воздействия и различные объекты – виды лабораторных животных (Bondoli et al., 1980; Albekairi, 1989; Muratsubaki, Yamaki, 2011). В определённых отношениях нормобарическая модель может иметь ряд преимуществ перед высотной: высотная гипоксия сопровождается воздействием других факторов: низкого барометрического давления, температуры, влажности воздуха – которые затрудняют анализ результатов и идентификацию эффектов «чистой» гипоксии на организм. Нормобарическая модель гипоксии гарантирует большую безопасность как для испытуемых, так и для исследователей, технически относительно проще высотной, позволяет лучше контролировать уровень гипоксии – и позволяет предъявить изолированный гипоксический стимул. По этим причинам в представленной работе использовалась именно нормобарическая модель острой гипоксии.

Несмотря на наличие работ в этой области, всё же необходимо признать, что эффекты воздействия острой гипоксии, в том числе нормобарической, на метаболизм АК у человека изучены недостаточно. Отсутствие единой картины метаболизма АК в условиях гипоксии ограничивает наше понимание адаптивных механизмов и способов ответа организма человека на воздействие 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 (ГГС-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 глутамин, 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 глутамина 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. Проведение гипоксических исследований с участием человека сопряжено со значительными этическими, методологическими и практическими сложностями. Протокол исследования был одобрен комитетом по биоэтике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН. В соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, мы полностью информировали добровольцев о протоколе исследования, используемых процедурах, возможном риске и дискомфорте, последствиях, связанных с воздействием гипоксии. Все добровольцы-участники были проинформированы, что они могут отказаться от дальнейшего участия в исследовании на любом его этапе без последствий для себя. Все добровольцы подписывали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Проводившийся в ходе исследования постоянный мониторинг физиологических показателей испытуемых позволял предупредить развитие тяжёлых неблагоприятных эффектов при проведении гипоксического тестирования. Все процедуры, связанные с обеспечением внутривенного доступа и отбором образцов крови для последующего анализа, выполнялись квалифицированным сотрудником, имеющим соответствующий сертификат.

Анализ содержания свободных аминокислот в плазме крови выполнялся методом градиентной жидкостной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином. Данный метод на протяжении многих лет считается эталонным для определения концентрации свободных аминокислот.

Острая нормобарическая гипоксия создавалась с помощью подачи для дыхания через маску гипоксической газовой смеси, содержащей 9% O₂ в N₂ (по объёму). Использование гипоксических дыхательных смесей – давно отработанный метод для создания нормобарических моделей гипоксии. В

нашем случае главным преимуществом данного подхода была возможность изолированного предъявления гипоксического стимула, без сопровождающих различные модели высотной гипоксии снижения барометрического давления, влажности, температуры. Все эти дополнительные факторы сложным образом взаимодействуют с гипоксическим фактором и затрудняют анализ полученных данных. Для нашего исследования мы посчитали оптимальной именно нормобарическую модель гипоксии.

Для участия в исследовании были рекрутированы добровольцы – молодые здоровые мужчины (возраст 22-32 года). Первая группа добровольцев проходила исследование, подвергаясь действию острой нормобарической гипоксии в течение 45 минут. После прекращения гипоксии наблюдение за добровольцами продолжалось ещё 50 минут. По причине большой длительности гипоксии для улучшения переносимости воздействия добровольцы из первой группы участвовали в исследовании после лёгкого низкожирового завтрака. По результатам предварительного анализа характера отказов и выходов из исследования в первой группе было принято решение сократить продолжительность гипоксии до 25 минут, при этом гипоксическое тестирование осуществлялось натощак. Добровольцы из второй группы участвовали в исследовании по данному, изменённому протоколу, утром, строго натощак. Поскольку в литературе на данный момент нет единых норм содержания свободных аминокислот в плазме крови, нами была набрана референтная группа, состоявшая из здоровых молодых мужчин, не участвовавших в исследовании. Полученные в этой группе значения уровней свободных аминокислот плазмы крови натощак использовались в качестве референтных значений.

Поскольку допущения, необходимые для использования параметрических критериев не выполнялись, статистический анализ данных производили с помощью непараметрических критериев Баумгартнера-Вайса-

Шиндлера, Скиллинга-Мэка, *post-hoc* критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений. Анализ корреляционных зависимостей был выполнен с использованием робустного коэффициента корреляции.

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» (акт внедрения от 28.09.2020) в курсе лекция по дисциплине «Биохимия» в рамках подготовки по специальностям 31.05.01 Лечебное дело и 31.05.02 Педиатрия.

Апробация результатов. Основные результаты исследования представлены на заседаниях Учёного совета ИФ Коми НЦ УрО РАН (2012-2014 г.), 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.).

Степень достоверности результатов проведённых исследований. Цель работы и задачи исследования сформулированы в результате подробного критического анализа специализированной литературы по теме работы. Экспериментальные модели и аналитические методики, использованные в представленной работе, являются оптимальными для решения поставленных задач. Выводы диссертационной работы соответствуют поставленным задачам и основываются на анализе полученных в ходе исследования экспериментальных данных. Использованные статистические методы анализа данных являются адекватными.

Личный вклад автора. Автор лично участвовал во всех этапах исследования. 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 локальным Комитетом по биоэтике ИФ Коми НЦ УрО РАН (заключение от 23 ноября 2009 г.).

Публикации. По материалам исследования опубликовано 17 научных работ, из них 2 статьи в журналах, индексируемых Scopus, 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации. 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).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика роли аминокислот в организме человека

Аминокислоты (АК) представляют собой гетерогенный класс органических соединений, достаточно сильно различающихся по своим химическим свойствам, но имеющих общие характерные черты строения – наличие карбоксильной группы, аминогруппы и боковой цепи (R-цепь) (Cunober, 2004). В последовательностях нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) кодируются 20 протеиногенных АК, составляющих полипептидные последовательности белков: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, глутамин, аспарагин, фенилаланин, тирозин, триптофан, гистидин, серин, метионин, треонин, лизин, аргинин, цистеин и пролин (Cunober, 2004). Все протеиногенные аминокислоты, включая циклическую АК пролин, относятся к α -аминокислотам, то есть карбоксильная и аминогруппа в их молекулах связаны с α -атомом углерода. Различия в растворимости, электрическом заряде, полярности, химических свойствах АК определяются структурными различиями боковых цепей (R-групп) различных кислот (Noguchi et al., 2006; Wu, G., 2009).

Ранее считалось, что практически все АК, присутствующие в норме в составе человеческого организма, являются оптическими L-изомерами. Позднее стало ясно, что D-изомеры АК выполняют ряд важных функций в различных органах и системах (Friedman, 2010; Genchi, 2017). Так, D-серин – важный нейромодулятор глутаматергической передачи (Pollegioni, Sacchi, 2010), D-аспарагиновая кислота также принимает участие в модуляции процессов в ЦНС (D'Aniello, 2007). В организме в заметных количествах

присутствуют и другие D-изомеры аминокислот, чьи функции пока недостаточно ясны (Friedman, 2010).

В организме человека АК выполняют ряд функций. Во-первых, пластическую функцию, поскольку они являются субстратом для синтеза пептидов и белков. Во-вторых, энергетическую функцию: АК служат субстратом глюконеогенеза или напрямую метаболизируются клетками для синтеза АТФ (Brosnan, J. T., 2003). Кроме пластической и энергетической функций, АК играют роль нейромедиаторов, участвуют в регуляции метаболических процессов (Drabkin et al., 1998; Medelli et al., 2003; Russo et al., 2009). Было продемонстрировано, что свободные АК регулируют активацию mTOR (mammalian target of rapamycin, один из ключевых регуляторных белков клетки), экспрессию генов и метилирование ДНК (Dillon, 2012). Некоторые исследователи предложили выделить ряд АК у млекопитающих в отдельную группу «функциональных АК» (туда включают глутамин, аспарагин, глутамат, глицин, лейцин, тирозин, метионин, триптофан, аргинин, пролин, цистеин, таурин) за счёт роли, которую они играют в работе ключевых метаболических путей, обеспечивающих выживание, рост, развитие, иммунитет и размножение организмов (Wu, G., 2013).

Общий пул свободных АК крови у человека формируется из трёх источников: гидролиза экзогенных (пищевых) белков, гидролиза эндогенных белков, взаимопревращения различных АК. Экзогенный путь обеспечивает около 30% поступления в общий пул, 70% вклада обеспечивается эндогенными источниками (Synober, 2004). При этом у человека отсутствует истинное депо АК, подобное депо глюкозы (гликоген печени и мышц) и липидов (жировая ткань) (Synober, 2004). Поэтому функцию резервных хранилищ АК *de facto* выполняют различные структурные и функциональные белки тканей и клеток. В этих условиях пул свободных АК плазмы играет очень важную роль в процессах межорганного обмена АК и достаточно

жёстко регулируется (Bröer, Bröer, 2017). Поэтому изменения уровней свободных АК плазмы могут свидетельствовать о заметных метаболических перестройках в организме. На рисунке 1 приведено схематичное описание обмена АК в организме человека.

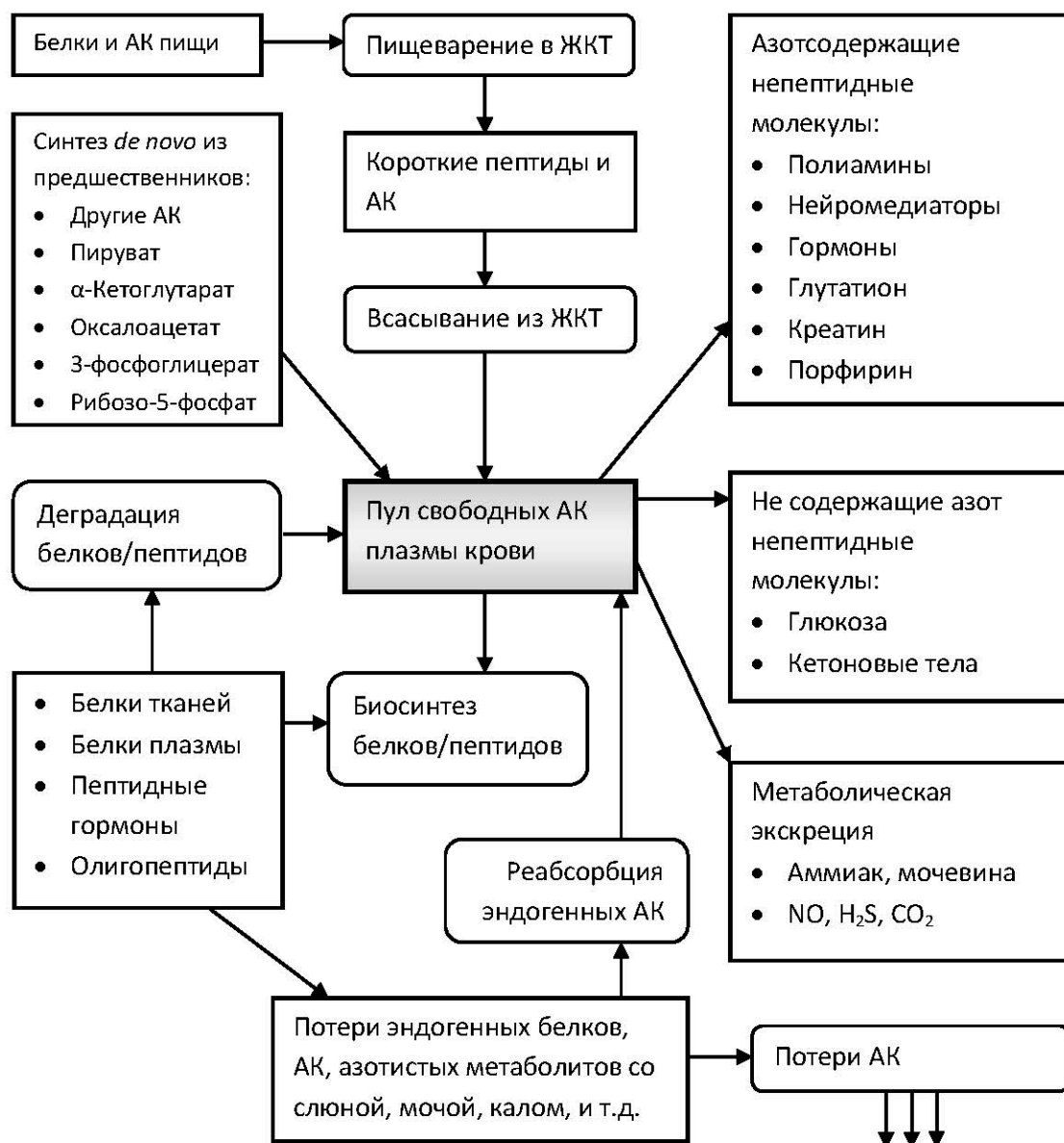


Рисунок 1 – Схема обмена аминокислот (АК) в организме человека.

Деление АК на заменимые и незаменимые обусловлено возможностью или невозможностью синтеза тех или иных АК клетками организма из обычно доступных субстратов в количествах, удовлетворяющих всем потребностям организма (Furst, Stehle, 2004). Если АК не синтезируется собственными ферментными системами организма (например, лейцин), единственным источником данной АК будет её поступление с пищей (Synober, 2004; Furst, Stehle, 2004). Традиционно к группе незаменимых АК относят лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин, тирозин, триптофан, гистидин, метионин, треонин, лизин (Synober, 2004; Furst, Stehle, 2004). К группе заменимых АК относят аспарагиновую кислоту, аспарагин, глутаминовую кислоту, глутамин, глицин, аланин, цистеин, серин, пролин и аргинин. Данная классификация достаточно условна, так как в различные периоды жизни и при различных состояниях многие заменимые АК становятся незаменимыми (как, например, аргинин для недоношенных младенцев (Tapiero et al., 2002; Wu, G. Y. et al., 2004). С другой стороны, считающийся незаменимым тирозин в больших количествах может синтезироваться в организме из фенилаланина, другой незаменимой АК (Synober, 2004).

1.2 Функции и метаболизм отдельных аминокислот и групп аминокислот в организме человека

У всех АК имеется ряд общих функций и общих метаболических путей. В первую очередь речь идёт о пластической функции АК и участии протеиногенных АК в синтезе белков и пептидов. Катаболические пути, которые позволяют утилизировать АК как энергетические субстраты, также имеют определённую общность. Наряду ними, многим АК и целым группам АК свойственны свои специфические метаболические пути, а соответственно и специфические функции в организме человека.

1.2.1 Дикарбоновые аминокислоты и их амиды

Заменимые дикарбоновые АК (аспарагиновая и глутаминовая) и их амиды (аспарагин и глутамин, тоже заменимые АК) играют важную роль в обмене биологического азота (Brosnan, J. T., 2003; Synober, 2004). Реакции трансаминирования и дезаминирования связывают метаболизм дикарбоновых АК со многими другими ключевыми метаболическими путями.

Считается, что концентрация глутаминовой кислоты в цитоплазме клеток организма больше, чем какой-либо другой АК (Brosnan, J. T., 2003). Это связано не только с тем, что это – заменимая АК, но и с важностью глутамата для обмена других АК в клетке, а также многих других обменных процессов. Как и любая другая протеиногенная АК, глутаминовая кислота в первую очередь служит субстратом для синтеза пептидов и белков. Во вторую очередь, это АК, «находящаяся на перекрёстке энергетического метаболизма и метаболизма азота» (Synober, 2018). Катаболизм глутамата особенно активно протекает в органах ЖКТ.

Глутаминовая кислота является субстратом ряда ключевых ферментов различных метаболических путей, и потому может играть роль своеобразного посредника, «переключателя» между этими метаболическими путями (Synober, 2018). Глутамат участвует в энергетическом обеспечении клетки (Schousboe, 2017; Hohnholt et al., 2018). Ранее было показано, что глутаминовая кислота при гипоксии может служить субстратом для выработки сукцината, который затем поступает в цикл Кребса (Mudge et al., 1976), что позволяет компенсировать возникающий при гипоксии дефицит макроэргических соединений (Pisarenko et al., 1988).

Один из основных ферментов метаболизма глутамата, глутаматдегидрогеназа, принимает участие в регуляции энергетического

метаболизма клеток, а именно увеличивает утилизацию α -кетоглутарата при снижении концентрации АТФ в клетке (Schmidt, Schmidt, 1988; Tamarappoo et al., 1993). Более того, АК так называемого «семейства глутамата» (аргинин, орнитин, пролин, гистидин и глутамин) при катаболизме трансформируются в глутамат для дальнейшей утилизации (Brosnan, John T., 2000).

Глутаминовая кислота – ключевой субстрат реакций трансаминации, роль которых в обмене АК трудно переоценить. Реакцию трансаминации, строго говоря, нельзя отнести ни к катаболическим, ни к анаболическим реакциям (Суповер, 2018). Благодаря глутамату возникает возможность переключения, «интерфейса», между метаболизмом АК (включая цикл мочевины) и метаболизмом углеводов (Brosnan, John T., 2000).

Глутамат – самый распространённый возбуждающий нейромедиатор в ЦНС млекопитающих (Hawkins, 2009), рецепторы к глутаминовой кислоте обнаруживаются на постсинаптических и пресинаптических мембранах нейронов, на мембранах клеток нейроглии (Perfilova, Tyurenkov, 2016; Perfilova, Tyurenkov, 2016). Глутаматэргические нейроны участвуют в формировании систем подкрепления (Ашмарин, 1996; Шабанов и др., 2002), а следовательно в процессах обучения, запоминания (Yoo et al., 2016), формирования зависимостей (Xi, Stein, 2002). Рецепторы к глутаминовой кислоте являются актуальными и перспективными фармакологическими мишенями для терапии в разных областях медицины (Serafini et al., 2013; Newport et al., 2015; Roth, 2019). Помимо этого, глутаматэргические процессы играют важную роль в ранних стадиях развития ЦНС (Tremblay et al., 1988).

Глутамин – это амид глутаминовой кислоты, заменимая АК, в которой гидроксильная группа в боковой цепи замещена на аминную. Хотя глутамин относится к заменимым АК, при развитии определенных состояний (в частности при травмах, инфекциях, в послеоперационном периоде) он становится незаменимым (Reeds, 2000; Furst, Stehle, 2004; Cruzat et al., 2018). В плазме крови концентрация глутамина больше, чем концентрация какой-

либо другой аминокислоты (Brosnan, J. T., 2003; Cruzat et al., 2018). Он служит одним из основных переносчиков аммиака в нетоксической форме, участвует в регуляции кислотно-основного равновесия в почках (Brosnan, J. T., 2003; van de Poll et al., 2007). Глутамин служит важным энергетическим субстратом для клеток, наряду с глюкозой (Newsholme et al., 2003). Особенно выделяют его роль как пластического и энергетического субстрата для клеток крови – эритроцитов, лимфоцитов и макрофагов, активированных иммунных клеток (Foster, Fagg, 1984; Newsholme, 2001; Aledo, 2004; Cruzat et al., 2018). Роль глутамина как важного источника энергии для быстроделющихся клеток подтверждает и тот факт, что большая часть экзогенного глутамина, поступающего с пищей, метаболизируется клетками кишечника, не попадая ни в portalный, ни в системный кровоток (Brosnan, J. T., 2003; Synober, 2018). Много исследований посвящено изучению метаболизма глутамина как субстрата, активно утилизируемого клетками различных новообразований (Yuneva et al., 2007; Wise, Thompson, 2010; Wang et al., 2018), для которых эта АК является не только источником азота для синтеза АК и нуклеотидов, но также участвует в захвате незаменимых АК, поддержании активности ферментов; служит одним из основных митохондриальных субстратов, поддерживает потенциал и целостность митохондриальной мембраны, поддерживает выработку восстановленного НАДФ для регуляции окислительно-восстановительного равновесия и синтеза макромолекул (Wise, Thompson, 2010; Smith et al., 2016).

Глутамин также служит субстратом для синтеза глутатиона – одного из ключевых антиоксидантов в организме, ответственного за регуляцию окислительно-восстановительного баланса клетки и защиту от свободных радикалов (Lian et al., 2018).

Достаточное количество научных работ посвящено роли глутамина при физической нагрузке, тренировках, метаболизму этой АК в мышечной ткани. Глутамин также называют «антикатаболической аминокислотой», поскольку

он блокирует эффекты кортизола (Gollnick, Hermansen, 1973; Hammarqvist et al., 1994; Medelli et al., 2003). Немаловажную роль играет глутамин и в процессах иммунитета. Как уже было сказано выше, он является субстратом для клеток иммунной системы, а его дефицит может приводить к нарушению иммунитета (Gollnick, Hermansen, 1973; Medelli et al., 2003). Отмечено, что снижение уровня глутамина плазмы крови после интенсивных тренировок или соревнований коррелирует с падением количества лейкоцитов крови в результате нарушения их пролиферации, и с увеличением заболеваемости различными инфекционными заболеваниями, нередко встречающимися у профессиональных спортсменов в эти периоды (Badzhinian et al., 1995; Вологжанин и др., 2005). Имеются работы, посвященные эффективности препаратов глутамина как средств, потенцирующих процессы восстановления при парентеральном назначении в послеоперационном периоде, в частности, в абдоминальной хирургии (Morlion et al., 1998; Wilmore, 2001; Fan, Y. P. et al., 2009).

1.2.2 Аминокислоты с разветвлённой цепью

Аминокислоты с разветвленной цепью (АКРЦ; в зарубежной литературе – branched chain amino acids, ВСAA) – валин, лейцин, изолейцин – по причине общности свойств и характеристик рассматриваются вместе как отдельная функциональная группа АК (Calder, 2006; Yoshizawa, 2012). АКРЦ относятся к незаменимым АК (Furst, Stehle, 2004) и при этом считаются самыми распространенными из эссенциальных АК в организме (Nie et al., 2018). Первоначально АК этой группы рассматривались исключительно как субстраты пластических (синтез белков, синтез нейромедиаторов, неэссенциальных АК глутамина и аланина) и энергетических путей, но впоследствии у них были обнаружены другие очень важные функции (Synober, 2004; Yoshizawa, 2012).

АКРЦ, в первую очередь лейцин, регулируют и стимулируют синтез белка, снижают его катаболизм, особенно в скелетной мускулатуре (Nair et al., 1992; Mordier et al., 2000; Kimball, Jefferson, 2006), и могут таким образом влиять на уровни других АК в плазме крови. Лейцин также увеличивает синтез белка в других тканях, например, в жировой ткани (López et al., 2018). В исследованиях были продемонстрированы благотворные эффекты назначения повышенных доз АКРЦ при заживлении ран (Zhang, W. R. et al., 2009), снижении веса (Layman, 2003), деградации мышечных белков при старении (Rieu et al., 2003). В одном исследовании *in vivo* было продемонстрировано, что даже на низкобелковой диете дополнительное введение в рацион АКРЦ в виде пищевой добавки, увеличивало траффик АК в скелетной мускулатуре (Zheng, Liufeng et al., 2017). Анаболический эффект АКРЦ связывают со способностью таких АК как лейцин активировать один из ключевых внутриклеточных регуляторов роста, пролиферации, подвижности, выживания, транскрипции, синтеза белка и аутофагии – mammalian target of rapamycin, mTOR (Drummond, Rasmussen, 2008; Cruz et al., 2019).

Внимание исследователей уделяется катаболизму АКРЦ. Утилизация этих АК происходит в значительной степени в скелетной мускулатуре, для которой АКРЦ являются одним из важных источников энергии (Rennie et al., 2006). Этот путь включает реакции трансаминирования, окислительного декарбоксилирования и дегидрогенации, осуществляемые специфическим для АКРЦ комплексом ферментов (Adeva-Andany, M. M. et al., 2017). Примечательно, что при катаболизме проявляется неоднородность этой группы АК, так как продукты метаболизации лейцина (ацетоацетат и ацетил-КоА) являются кетогенными, продукт метаболизации валина (сукцинил-КоА) – гликогенным субстратом, а продукты катаболизма изолейцина (ацетил-КоА и сукцинил-КоА) используются как для кетогенеза, так и для глюконеогенеза (Kimball, Jefferson, 2006). Кроме того, сукцинил-КоА (продукт катаболизма

валина и изолейцина) является предшественником порфиринов (Nie et al., 2018). Азот, который молекулы АКРЦ теряют в реакции трансаминирования, используется для ресинтеза других АК, в частности глутамина и аланина (Synober, 2004).

У человека такой универсальный анаболический гормон, как инсулин, снижает уровень АКРЦ в плазме крови, стимулирует синтез белка, индуцированный АК, ингибирует катаболизм белков и трансаминирование лейцина в скелетной мускулатуре (Meek et al., 1998; Gannon et al., 2018). В то же время есть данные, что АКРЦ имеют более сильное влияние, чем инсулин, на катаболизм и синтез белка в тканях внутренних органов (Nygren, Nair, 2003). По одним данным изолейцин и лейцин являются стимуляторами высвобождения инсулина (Lynch et al., 2002; Nilsson et al., 2007); валин лишь в незначительной степени стимулирует его выработку. По другим данным АКРЦ стимулируют выработку глюкагон-подобного пептида 1 (GLP-1) (Yoon, 2016).

Стресс, в том числе травматического генеза, повышает выработку катехоламинов, глюкокортикоидов, глюкагона, обладающих катаболическим действием в отношении тканевых белков. В результате отмечается повышение высвобождения АК, активация катаболизма АКРЦ для удовлетворения возросших энергетических потребностей и увеличение синтеза гликогенных АК – глутамина, глутамата и аланина – для нужд глюконеогенеза, с использованием азота из реакции трансаминирования АКРЦ (Miles et al., 1984; Aussel et al., 1986). Имеются сообщения о том, что дополнительное обеспечение АКРЦ повышает устойчивость к стрессу (Nasrallah et al., 2019).

В связи с особенностями метаболизма АКРЦ рядом исследователей были выдвинуты предложения по их использованию в лечебном питании у пациентов с печеночной и почечной недостаточностью (Meisinger, Strauch, 1985; Marchesini et al., 2003; Marchesini et al., 2005; Mitrega et al., 2011;

Hiraoka et al., 2017). Однако, на данный момент у клинических специалистов отсутствуют достоверные показатели, позволяющие оценить достаточность или избыточность терапии препаратами АКРЦ, и поэтому внедрение их в клиническую практику затруднено. Впрочем, это не мешает уже в течение длительного времени применять добавки, содержащие АКРЦ, в любительском и профессиональном спорте (Shimomura et al., 2004; Waldron et al., 2017), а также в других областях профессиональной деятельности, сопряжённых с тяжёлыми физическими нагрузками, в том числе у военных (Paisley, 2015).

1.2.3. Серосодержащие аминокислоты

Серосодержащие АК (метионин, цистеин) выделяют в отдельную группу АК не только по общности и уникальности их строения (это единственные две протеиногенные АК, содержащие серу в составе своих молекул). Помимо этого их метаболические пути и физиологические функции также связаны между собой (Cynober, 2004; Colovic et al., 2018). Метионин, незаменимая АК, участвует в синтезе цистеина, глутатиона; метаболит метионина – S-аденозилметионин является ключевым участником реакций метилирования и трансметилирования как донор метильной группы (Brosnan, J. T., Brosnan, 2006). Цистеин, который также может синтезироваться из метионина, часто является лимитирующим фактором в синтезе глутатиона (Mosharov et al., 2000). Наличие SH-группы в данных АК определяет протекание таких процессов, как дыхание и окислительное фосфорилирование, а также регуляцию проницаемости мембран (Кулинский, Колесниченко, 1993).

Благодаря наличию атома серы метионин и цистеин – одни из самых гидрофобных АК (в особенности это относится к метионину), что определяет их роль в формировании вторичной и третичной структуры белка (Gómez-

Tamayo et al., 2016). Большая часть остатков метионина в глобулярных белках, в силу своей гидрофобности, находится внутри «клубка» полипептидных цепей. Цистеин же, в свою очередь, способен к формированию дисульфидных связей между своими молекулами. Подобные связи могут образовываться как между цистеиновыми остатками разных полипептидных цепей, так и между молекулами цистеина в составе одной цепи, благодаря чему он играет одну из ключевых ролей в формировании структуры белка (Bernardino et al., 2017).

Метионин, как предполагают, играет роль эндогенного антиоксиданта в целом ряде белков – его остатки окисляются до метионин-сульфоксида под воздействием перекисей и других окисляющих агентов, и эта трансформация не вызывает практически никаких конформационных изменений в молекуле белка (Levine et al., 1996; Luo, Levine, 2009; Lim, Jung Mi et al., 2019). Регенерация метионин-сульфоксида обратно в метионин происходит под действием присутствующего во всех клетках фермента метионин-сульфоксидредуктазы. Предполагается, что нарушение нормальной работы фермента и вызванное этим накопление метионин-сульфоксида в составе молекул белков может быть ассоциировано с развитием связанных с возрастом заболеваний, нейродегенеративной патологии и сокращенной продолжительностью жизни (Moskovitz, 2005; Jiang, Moskovitz, 2018). Кроме того, метионин играет ключевую роль в инициации синтеза белка у эукариот (у прокариот эту роль играет N-формилметионин) – кодон, соответствующий этой АК, является первым во всех последовательностях нуклеиновых кислот, кодирующих белки (Drabkin et al., 1998).

Цистеин входит в состав глутатиона – основного внутриклеточного антиоксиданта (Pompella et al., 2003). Доступность цистеина является одним из лимитирующих факторов синтеза глутатиона (Вологжанин и др., 2005). Имеются данные, что во многих тканях (например, в печени) по меньшей мере половина цистеина, расходуемого на синтез глутатиона поступает не

извне, а синтезируется в процессе транссульфурации из гомоцистеина даже при физиологической концентрации цистеина в межклеточной жидкости (Mosharov et al., 2000; Brosnan, J. T., Brosnan, 2006).

1.2.4. Ароматические аминокислоты

К ароматическим АК (ААК) относят фенилаланин, тирозин, триптофан и гистидин (Cynober, 2004; Han, Qian et al., 2019). За исключением тирозина, все эти АК считаются эссенциальными, однако тирозин синтезируется из фенилаланина в ограниченных количествах, часто недостаточных для удовлетворения потребностей организма (Young, 1994; Reeds, 2000; Furst, Stehle, 2004). Стоит отметить, что в структуре пептидной цепи белка тирозин (наряду с серином и треонином) играет особую роль – гидроксильная группа его боковой цепи является мишенью для присоединения остатка ортофосфорной кислоты ферментами семейства протеинкиназ (Fulton et al., 2005; Fisslthaler et al., 2008). Фосфорилирование боковых цепей АК в структуре белка влияет на его конформацию, а соответственно, на его активность.

ААК в организме являются в первую очередь пластическим субстратом для синтеза пептидов и белков. В этом отношении примечательно, что триптофан был первой АК, для которой был сформулирован постулат о незаменимости: в 1957 году Rose продемонстрировал, что триптофан, АК, которой в организме человека содержится меньше всего, ограничивает и определяет скорость синтеза белка (Rose, 1957). Помимо этого, все ААК также являются субстратами синтеза биологически активных веществ и медиаторов группы моноаминов, а также пигментов (Krzysciak, 2011).

Из фенилаланина синтезируется тирозин, который в свою очередь служит субстратом для синтеза целой группы биологически активных веществ, катехоламинов, к которым относятся моноамины дофамин,

адреналин и норадреналин (Fernstrom, Fernstrom, 2007). Дофаминергические нейроны ЦНС, в частности нейроны черного вещества ножек головного мозга, синтезируют дофамин – важный нейромедиатор, используемый одной из систем подкрепления, дофаминергической (Ашмарин, 1996; Шабанов и др., 2002). Норадреналинергические нейроны центральной и вегетативной нервной системы синтезируют норадреналин, служащий в их синапсах нейромедиатором. Клетки мозгового вещества надпочечников синтезируют преимущественно адреналин и некоторое количество норадреналина, которые выступают уже в роли циркулирующих гормонов (Rasmussen et al., 1983). Катехоламины играют роль во множестве процессов нейрогуморальной регуляции: регуляции двигательной функции, системе подкрепления, лимбической системе, регуляции вегетативных функций. Клетки фолликулов щитовидной железы используют тирозин для синтеза тироксина и трийодтиронина (de Vijlder, 2003) – гормонов, играющих главную роль в регуляции общего обмена. Тирозин также является субстратом для синтеза пигмента меланина меланоцитами (Krzysciak, 2011).

В прошлом в ряде исследований было показано, что дополнительное обеспечение организма тирозином оказывает благотворное влияние при стрессе, простудных заболеваниях, хронической усталости (Hao et al., 2001), депривации сна и длительной работе (Neri et al., 1995; Magill et al., 2003). Получение достаточного количества тирозина с пищей снижает уровень стрессовых гормонов (Reinstein et al., 1985), у подопытных животных уменьшает вызванную стрессом потерю массы тела (Hao et al., 2001), у людей в эксперименте увеличивает умственную и физическую работоспособность (Deijen, Orlebeke, 1994; Deijen et al., 1999).

Триптофан также является важным субстратом для нервной системы. У триптофана два основных пути метаболизма: серотониновый и кинурениновый (Comai et al., 2020). Серотониновый путь производит давно и хорошо известный нейромедиатор серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ), и

в ряде органов, например, шишковидном теле и кишечнике, серотонин метаболизируется дальше до мелатонина (Fernstrom, 1983; Schaechter, Wurtman, 1990; Russo et al., 2009). Нарушению серотонинэргических процессов в ЦНС уделяют большое внимание в патогенезе некоторых патологических состояний: депрессии, биполярного расстройства, когнитивных нарушений (Himmerich et al., 2009; Chilmonczyk et al., 2015; Poletti et al., 2018). Согласно некоторым сообщениям, поступление свободного триптофана из плазмы крови – один из определяющих факторов, влияющих на интенсивность синтеза серотонина в ЦНС (Breum et al., 2003).

Патологические процессы, приводящие к нарушению баланса этих медиаторов-моноаминов в разных отделах ЦНС связывают с развитием различных психических заболеваний. Так, дофаминовая теория является ключевой этиопатогенетической теорией развития шизофрении, имеющий наибольший на данный момент запас доказательств (Howes, Kapur, 2009). Моноаминовая теория развития депрессии является основой разработки препаратов группы антидепрессантов, которые за счёт различных механизмов увеличивают уровни серотонина и норадреналина в синапсах ЦНС (Liu, Bangshan et al., 2017; Voku et al., 2018).

Мелатонин – древний химический мессенджер, синтезируемый из серотонина – обладает множеством свойств и эффектов. В частности, он играет роль антиоксиданта и скавенджера активных форм кислорода и азота (Hardeland et al., 1995). Мелатонин действует на специфические для него мембранные рецепторы, а также, вероятно, проникает в клетки и взаимодействует с орфанными ретиноидными рецепторами (Jockers et al., 2016). Среди эффектов мелатонина – регуляция циркадного ритма, изменение активности калиевых и кальциевых каналов, изменение активности многих систем вторичных мессенджеров, участие в регуляции транскрипции и трансляции циркадно-регулируемых генов, участие в регуляции иммунного

ответа, репродуктивной функции, энергетического метаболизма, сезонных изменений в организме (Amaral, Cipolla-Neto, 2018).

Гистидин – также незаменимая протеиногенная ААК, (Krzysciak, 2011). Гистидин является предшественником нескольких гормонов (например, тиреотропин-рилизинг гормона), и важных метаболитов, влияющих на функцию почек, синаптическую передачу, секрецию желудка, иммунную систему. Уникальные свойства радикала гистидина делают его хорошей каталитической группой в активных центрах многих ферментов, а также важным структурным элементом белков и ферментов, взаимодействующих с ионами металлов (Ingle, 2011). Основными низкомолекулярными продуктами гистидина являются гистамин, урокаиновая кислота, дипептиды ансерин и карнозин. Урокаиновая кислота, формирующаяся в верхних слоях кожи млекопитающих, является одним из основных веществ, абсорбирующих ультрафиолет (Gibbs et al., 2008). Дипептиды (ансерин и карнозин) играют роль в гомеостатической защите органов и тканей (Peters et al., 2015). Самым главным низкомолекулярным метаболитом гистамина является, безусловно гистамин, «древний тканевой амин», предшествовавший появлению многоклеточных организмов (Yuan, H., Silberstein, 2018). Гистамин прежде всего известен как один из важнейших медиаторов воспаления, участвующий в частности в формировании аллергической реакции, бронхоконстрикции (Ohtsu, 2011; Thangam et al., 2018). Рецепторы к гистамину широко распределены в центральной нервной системе, где гистаминэргические процессы участвуют в регуляции энергетического гомеостаза, циркадного ритма, пищевого поведения, жажды (Tabarean, 2016), поддержании бодрствования (Bolam, Ellender, 2016) и других важных процессов и функций ЦНС.

1.2.5. Пролин и гидроксипролин

Пролин – заменимая протеиногенная АК, свойства и функции которой во многом определяются её необычной циклической структурой (Cunober, 2004; Liang et al., 2013). В составе белков организма человека пролин и его гидроксильированные производные считаются самыми распространёнными АК (Di Lullo et al., 2002). Первоначально пролин и гидроксипролин (производное пролина, протеиногенная, но не кодируемая АК) рассматривались лишь как структурные АК, играющие ключевую роль в синтезе основного белка соединительной ткани – коллагена. В дальнейшем было показано важное значение пролина в регуляции активности многих функциональных белков и ферментов: посттрансляционное гидроксильирование остатков этой АК в первичной структуре протеинов оказывает влияние на их активность (Lu, H. et al., 2005; Mazna et al., 2008). Данный механизм регулирования отвечает, в частности, за рецепцию эритропоэтинсинтезирующими клетками почек парциального давления кислорода в крови (Jones, 1986). Согласно работам, опубликованным в последнее десятилетие, свободный пролин в клетке является одним из ключевых метаболитов, участвующих в регуляции экспрессии генов и дифференциации клеток (Чалисова и др., 2011; Servet et al., 2012), активации mTOR (Oka et al., 2013); генерации активных форм кислорода (Donald et al., 2001), синтезе полиаминов (Wu, G. Y. et al., 2011), антиоксидантной защите и синтезе других аминокислот – глутаминовой, аргинина, орнитина (Wu, G. Y. et al., 2011).

Необходимо упомянуть о функции пролина как субстрата энергетического метаболизма. Метаболизм пролина тесно связан с метаболизмом глутаминовой кислоты (благодаря относительно лёгкой конверсии через образование пирролин-5-карбоксилата, протекающая в обе

стороны), которая в свою очередь при гипоксических состояниях может использоваться клетками для прямого синтеза субстратов цикла Кребса (Mudge et al., 1976; Cynober, 2004). Есть свидетельства существования, наряду с этим механизмом, альтернативных путей утилизации пролина как энергетического субстрата. В клеточной физиологии новообразований описан эффект Варбурга (дисфункция цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и окислительного фосфорилирования в опухолевых клетках) (Dang, Semenza, 1999; Fox et al., 2005). В то же время, для метаболизма пролина описан так называемый «пролиновый окислительно-восстановительный челнок», который не только способен генерировать свободные радикалы, но и напрямую поставлять восстановленные эквиваленты (НАДН⁺) в митохондрии, создавая таким образом альтернативный путь генерации АТФ (Phang et al., 2010).

Наиболее важным производным пролина является гидроксипролин (4-гидроксипролин). Несмотря на то, что остатки гидроксипролина встречаются в составе первичной аминокислотной последовательности многих белков (в первую очередь семейства коллагенов), гидроксипролин не кодируется в последовательности ДНК и РНК. Весь гидроксипролин в организме является продуктом посттрансляционной трансформации – гидроксирования остатков пролина, входящих в состав аминокислотных последовательностей белков (Cynober, 2004; Gorres, Raines, 2010). При этом гидроксипролин в среднем составляет 4% от общего числа АК в составе белков тканей животных, что больше, чем доля ещё восьми трансляционно включаемых в белки АК (кодируемых АК) (Gorres, Raines, 2010). Посттрансляционное гидроксирование пролина играет ключевую роль в регулировании активности многих функциональных белков, например HIF-1 (Lu, H. et al., 2005).

1.2.6. Аргинин

Аргинин – условно незаменимая протеиногенная АК. Он является незаменимым для недоношенных младенцев, поскольку их организм ещё не способен его синтезировать (Wu, G. Y. et al., 2004). Аргинин, как и другие протеиногенные АК, участвует в пластическом и энергетическом обмене, а также выполняет целый ряд других важных для организма функций. Аргинин – необходимый промежуточный продукт в процессе синтеза мочевины и регуляции баланса азота (Shambaugh, 1977; Morris, Sidney M., Jr., 2016). Аргинин активно участвует в процессах заживления ран (Langkamp-Henken et al., 2000; Witte, Barbul, 2003), является предшественником для синтеза агматина и полиаминов (Yerushalmi et al., 2006), является одним из субстратов для синтеза других важных для клеточного метаболизма АК – пролина и глутаминовой кислоты (Morris, S. M., Jr., 2006). Аргинин, как некоторые другие АК, за счёт своей доступности или дефицита в клетке, способен оказывать влияние на экспрессию целого ряда белков: индуцибельной NO-синтазы (iNOS), переносчика катионных АК 1 (CAT-1), зета-цепи рецептора Т-клеток (Morris, S. M., Jr., 2006). Доступность аргинина для макрофагов также оказывает влияние на механизмы врождённого иммунного ответа; некоторые патогенные микроорганизмы, например, микобактерии, эволюционно выработали механизмы защиты от иммунитета, основанные на использовании этого феномена (Morris, S. M., 2010). Наконец, аргинин – субстрат ферментативного пути синтеза оксида азота (Eddahibi et al., 1992; Kao et al., 2009; Morris, Sidney M., Jr., 2016).

Оксид азота (II), NO, является вазодилатором, одним из ключевых тканевых регуляторов сосудистого тонуса и кровотока (Burnett et al., 1992; Davis et al., 2001; Singel, Stamler, 2005), участвует, помимо прочего, в процессах адаптации к гипоксии (Pichon et al., 2009). Мишенью для NO, обуславливающей его биологические эффекты, является растворимая

гуанилатциклаза (Priviero, Webb, 2010); таким образом оксид азота регулирует уровень внутриклеточного кальция и воздействует на множество процессов, протекающих в клетке.

1.2.7. Серин

Серин – заменимая протеиногенная кодируемая АК, относящаяся к полярным АК. Роль серина в физиологии не ограничивается классическими пластической (синтез белков и пептидов) и энергетической (серин – глюкогенная АК, которая метаболизируется в пируват) функциями (Brosnan, J. T., 2003). Серин играет одну из ключевых ролей в обмене одноуглеродных групп, а соответственно в реакциях метилирования: он служит донором метильной группировки для регенерации метионина из гомоцистеина в «цикле метионина» (трансметилирующем пути этой АК) (Brosnan, J. T., Brosnan, 2006; Kalhan, Hanson, 2012). Физиологическая регуляция метаболизма метильных группировок в клетке очень важна для многих клеточных процессов: синтеза важных метаболитов (креатина, фосфатидилхолина, адреналина, фолиевой кислоты), метилирования белков и нуклеиновых кислот (Kalhan, Hanson, 2012). Таким образом серин играет одну из ключевых ролей в биосинтезе пуринов и тимидинов, глицина, метионина, антиоксидантной защите, эпигенетической регуляции (Ducker, Rabinowitz, 2017). Интересно, что биосинтез нуклеотидов зависит не от абсолютной обеспеченности клетки этой АК, а от синтеза серина *de novo* с помощью фермента фосфоглицератдегидрогеназы (Reid et al., 2018).

Благодаря свойствам своего радикала серин присутствует в активном центре многих ферментов, самый известный (и возможно самый важный) их класс – сериновые протеазы. Радикал играет роль нуклеофила в активном центре этих ферментов (Hedstrom, 2002), к которым относятся такие

известные ферменты как трипсин, химотрипсин, эластаза, тромбин (Madala et al., 2010). Помимо этой структурной и функциональной роли серин – одна из трёх АК (наряду с тирозином и треонином), которые типично фосфорилируются в составе белков эукариотической клетки ферментами-киназами (Rao et al., 2013).

Серин – одна из протеиногенных АК, имеющих хиральный центр, а потому существующих в виде D- и L-изомеров (Genchi, 2017). Первоначально считалось, что в организме присутствуют исключительно L-изомеры АК, но в 1990-е годы появились работы, демонстрирующие иную картину (Bastings et al., 2019). D-серин, наряду с D-аспаратом и D-аланином присутствует в значимых количествах в ЦНС (MacKay et al., 2019). Там эта АК выступает как мощный ко-агонист глутаматных рецепторов NMDA-типа, участвует в синаптической передаче, пластичности синапсов, миграции клеток, вносит вклад в развитие глутаматной нейротоксичности (Billard, 2012).

1.2.8. Треонин

Треонин – незаменимая протеиногенная кодируемая АК, открытая последней из всех 20 «классических» протеиногенных АК в 1936 году. Одна из причин, по которой треонин является незаменимым – отсутствие соответствующей трансаминазы у позвоночных, поскольку единственным путём синтеза незаменимых АК у них является трансаминирование соответствующих им α -кетокислот (Malinovsky, 2018). Так или иначе, известные на данный момент специфические функции этой АК являются продолжением общих для всех «классических» АК пластической и энергетической. Конкретно треонину уделяется внимание преимущественно в ветеринарной науке. В этих работах отмечается, что треонин – важный

конституэнт муцинов и IgA, играющих важнейшую роль в создании иммунного барьера ЖКТ (Zhang, Q. et al., 2017).

1.2.9. Аланин

Заменяемая кодируемая протеиногенная АК аланин по химическому строению – одна из самых простых АК (Суповер, 2004). Тем не менее, аланин задействован в работе важных физиологических механизмов (помимо синтеза белка и пептидов, и утилизации для синтеза АТФ) в организме. Глюкозо-аланиновый цикл (цикл Кахилла), очень схожий принципиально и функционально с глюкозо-лактатным циклом (циклом Кори), участвует в обороте нутриентов между скелетной мускулатурой и печенью (Felig, 1973). При работе этого метаболического «челнока» в пируват, генерирующийся в скелетной мускулатуре, трансаминируется азотом, который мышцы получают при катаболизме АК, а продукт этой реакции, аланин, выбрасывается в кровь, откуда он захватывается гепатоцитами. В гепатоцитах происходит обратная реакция трансаминирования, высвобождающийся аммиак используется для синтеза мочевины, а пируват – для глюконеогенеза, синтезированная глюкоза выбрасывается в кровь, и может снова быть захвачена мышцами (Schutz, 2011; Adeva-Andany, M. M. et al., 2016). Таким образом мышцы избавляются от токсичного продукта катаболизма (аммиака), получают доступный, легко окисляемый субстрат для энергетического метаболизма, энергозатратный глюконеогенез протекает в другой, несократительной ткани. Считается, что вследствие сопряжения транспорта субстратов глюконеогенеза и аммиака, глюкозо-аланиновый челнок энергетически менее эффективен, чем цикл Кори.

Помимо роли транспортного субстрата, аланин важен для работы иммунной системы. Активация Т-лимфоцитов – метаболически

требовательный процесс – требует, помимо других нутриентов, глюкозы, незаменимых АК, достаточной внеклеточной концентрации аланина, не смотря на то, что эта АК – заменимая (Ron-Harel et al., 2019).

1.2.10. Глицин

Глицин – это заменимая кодируемая протеиногенная АК, обладающая самым маленьким радикалом (атом водорода у α -атома углерода), и по этой причине не имеющая оптических изомеров. Компактность молекулы глицина определяет его роль в структуре белков, поскольку позволяет значительную мобильность молекулы в этой области, а также, наряду с пролином, нарушает регулярность вторичной структуры белка (Imai, Mitaku, 2005). Вместе с пролином и гидроксипролином глицин – ключевая АК в структуре белков коллагенов (Szpak, 2011).

Помимо структурной и энергетической функций, глицин принимает участие в целом ряде метаболических путей. Эта АК, наряду с серином и метионином, участвует в обмене одноуглеродных фрагментов – важной пластической метаболической системе клетки (Ducker, Rabinowitz, 2017). Глицин используется для синтеза серина, саркозина, пуринов, креатина, порфиринов, глутатиона (Adeva-Andany, M. et al., 2018). В нервной системе свободный глицин выполняет одновременно две функции как нейротрансмиттер: в стволе головного мозга он служит тормозным нейромедиатором (для глицина есть специфические рецепторы, представляющие собой лиганд-зависимые хлорные каналы), а в ЦНС в целом – ко-агонистом NMDA-рецепторов к глутамату, наряду с самой глутаминовой кислотой (Zafra et al., 2017)

1.2.11. Лизин

Незаменимая протеиногенная кодируемая АК лизин – одна из двух АК, наряду с треонином, для которых отсутствуют соответствующие им ферменты-трансаминазы (Malinovsky, 2018). Лизин, естественно, находится в составе белков, ϵ -аминогруппа его радикала формирует водородные связи, ионные связи, ковалентные связи, участвуя таким образом в стабилизации структуры белка (Sokalingam et al., 2012); эти свойства лизина играют важную роль в формировании кросс-линков между тремя полипептидными спиралями в составе коллагена (Yamauchi, Sricholpech, 2012). Лизин в составе белков подвергается посттрансляционным модификациям, в частности метилированию и ацетилированию, и эти процессы задействованы не только в регуляции активности белков и работы протеома (Gil et al., 2017; Cornett et al., 2019), но и в регуляции функционирования эпигенома за счёт модификации гистонов (Black et al., 2012).

Лизин выступает субстратом для синтеза карнитина, необходимого для транспорта жирных кислот в митохондриях для последующего их окисления (Flanagan et al., 2010), хотя считается, что у млекопитающих значительная часть карнитина поступает извне с пищей.

1.3 Профиль свободных аминокислот плазмы крови у человека

Различные методы определения содержания различных свободных АК в биологических жидкостях были разработаны достаточно давно, но тем не менее, в биомедицинской науке на настоящий момент отсутствуют единые нормативные показатели содержания свободных АК в плазме крови человека (Stein, Moore, 1954; Filho et al., 1997; Le Boucher et al., 1997). Профиль свободных АК плазмы крови у представителей контрольных групп из трёх

различных исследований, проведённых зарубежными учёными, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Профиль свободных аминокислот плазмы крови человека согласно данным Le Boucher et al. (1997), Divino-Filho et al. (1997), Klassen et al. (2001), мкмоль/л ($M \pm SD$).

Аминокислоты	Le Boucher et al., 1997	Divino-Filho et al., 1997	Klassen et al., 2001
Аспарагин	41±10	47±2	40±2
Глутамат	24±15	32±4	36±20
Глутамин	586±84	655±17	511±4
Аланин	333±74	316±17	340±17
Глицин	230±52	248±13	210±17
Серин	114±19	114±4	102±5
Треонин	140±33	128±5	108±5
Валин	233±43	220±8	182±11
Лейцин	123±25	120±5	105±6
Изолейцин	62±14	63±3	53±3
Метионин	25±4	25±1	24±1
Тирозин	59±12	60±4	54±2
Фенилаланин	57±9	53±2	50±3
Гистидин	82±10	87±3	87±6
Триптофан	N/A	46±3	34±2
Лизин	188±32	195±9	150±8
Аргинин	80±20	86±3	69±3
Пролин	168±60	N/A	N/A
Цитруллин	38±8	34±1	24±2
Орнитин	55±16	66±4	41±3

Вероятно, несоответствия предлагаемых референтных значений обусловлены как различиями в использованных аналитических методиках, так и особенностями изученных исследователями групп индивидов (географическими, возрастными и т.д.). Отсутствие однозначных нормативных значений может быть обусловлено и отсутствием масштабных исследований профиля свободных АК плазмы крови человека на больших выборках. В связи с этим значительная часть работ в части сравнения

результатов исследования опирается на собственные контрольные группы, уровни свободных АК плазмы крови в которых используются в качестве эталона (Klassen et al., 2001; Canepa et al., 2002; Kamaura et al., 2010; Girish et al., 2011).

1.4. Гипоксия у человека: общая характеристика и классификация

Термин «гипоксия» происходит от греческого *hupo* – «ниже» и латинского *oxxygenium* – «кислород», и означает понижение парциального давления O_2 в тканях (Агаджанян, Чижов, 2003). При этом иногда отдельно выделяют гипоксемию – снижение напряжения кислорода в крови, аноксию – отсутствие кислорода в тканях, а также аноксемию – отсутствие кислорода в крови. Данные термины могут отражать степень кислородного голодания организма, но стоит отметить, что истинная аноксемия и аноксия практически не наблюдаются на практике. Поэтому термин «гипоксия» используется для обозначения всех степеней и вариантов недостаточности кислорода в организме (Новиков и др., 1998; Евсеева и др., 2008).

Необходимо отметить, что гипоксия, с которой сталкивается организм, далеко не всегда бывает патологической. Человек постоянно испытывает воздействие так называемой физиологической гипоксии: в скелетной мускулатуре гипоксия развивается при интенсивных физических нагрузках (Fagan, Tischler, 1989), в ткани головного мозга – при умственном напряжении (Jansen, Low, 1996), в печени, почках, органах желудочно-кишечного тракта при чрезмерной активности их деятельности (Ларин, 1990). Физиологическая гипоксия выступает как естественный стимул, раздражитель, вызывающий развитие адаптивных реакций в различных органах и системах. Отличие физиологической гипоксии от патологической в

том, что изменения при физиологической носят кратковременный, обратимый характер (Michiels, 2004).

Одной из самых распространенных классификаций гипоксии в отечественной литературе считают классификацию Агаджаняна и Чижова (Агаджанян, Чижов, 2003), которая основана на фундаментальных исследованиях отечественных и зарубежных ученых (Колчинская, 1981; Караш и др., 1988; Sutton et al., 1990). Согласно этой классификации различают три основных типа гипоксии: экзогенную гипоксию, эндогенную гипоксию, биоэнергетическую или тканевую гипоксию. В то же время в медицинской литературе англоязычных стран применяется другая классификация, с 4 типами: гипоксемической, анемической, ишемической (застойной) и гистотоксической гипоксией (Cross, Plunkett, 2014). В настоящей работе мы будем придерживаться отечественной классификации.

1.4.1. Экзогенная гипоксия

Экзогенная гипоксия по Агаджаняну и Чижову подразделяется на гипоксическую, гипероксическую и экологическую гипоксию (Агаджанян, Чижов, 2003; Евсеева и др., 2008).

Экзогенная гипоксическая гипоксия возникает в результате снижения парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе (Сосин и др., 2015). Происходить это может как на фоне нормального барометрического давления за счет снижения содержания кислорода во вдыхаемой газовой смеси (нормобарическая гипоксия), так и на фоне общего снижения барометрического давления при нормальном содержании кислорода в воздухе (гипобарическая гипоксия). Физиологической основой развития экзогенной гипоксии в обоих случаях является артериальная гипоксемия, а в ряде ситуаций – и гипокапния (вследствие рефлекторной гипервентиляции), приводящая к развитию респираторного алкалоза и нарушений кислотно-

основного состояния. Среди частных случаев гипобарической экзогенной гипоксической гипоксии авторы выделяют барокамерную гипоксию, развивающуюся при «подъеме» в барокамере на «высоту» более 2500 м над уровнем моря в результате разрежения воздуха и снижения pO_2 ; высотную гипоксию – при подъеме на негерметичных летательных аппаратах в отсутствие специального кислородного оборудования. Гипобарическая компонента усугубляет тяжесть гипоксии, её негативное воздействие снижает способность организма адаптироваться к сниженному поступлению кислорода (Wolf, 2014). Как отдельную разновидность экзогенной гипоксии выделяют экзогенную гипербарическую гипоксическую гипоксию, иногда развивающуюся у водолазов, совершающих длительные глубоководные погружения (Агаджанян, Чижов, 2003).

Своеобразной разновидностью экзогенной является экзогенная гипероксическая гипоксия, которую можно подразделить на 2 варианта – гипербарический и гипобарический (Forkner et al., 2007). Первый тип является следствием продолжительного вдыхания чистого кислорода в условиях повышенного барометрического давления (например, при гипербарической оксигенации). Второй тип развивается у людей, находящихся в обитаемых отсеках космических станций, подводных лодок, при снижении барометрического давления в условиях поддержания высоких концентраций кислорода.

Агаджанян и Чижов выделяют в отдельный тип так называемую экзогенную экологическую гипоксию. К ней, в соответствии с классификацией, относят: горную гипоксию или «горную болезнь», развивающуюся в условиях среднегорья и высокогорья в результате снижения барометрического давления и сопряженного снижения парциального давления O_2 ; гравитационную гипоксию – развивающуюся в процессе развития невесомости; полярную гипоксию – развивающуюся в приполярных регионах в связи с уменьшением плотности атмосферы в

районе полюсов; аридную гипоксию – возникающую в условиях засушливого жаркого климата пустынь, способствующего гипертермии, гиповолемии, ухудшению транспорта газов кровью; антропогенную гипоксию, которая иногда наблюдается в результате некоторых видов экологических катастроф (Агаджанян, Чижов, 2003).

1.4.2. Эндогенная гипоксия

Эндогенная гипоксия развивается при нарушении доставки и утилизации кислорода тканями. Классификация эндогенной гипоксии основана на различии этиологических факторов. В соответствии с ними в отечественной литературе выделяют респираторную, циркуляторную, гемическую, цитотоксическую и гиперметаболическую эндогенную гипоксию (Евсеева и др., 2008). Эта группа гипоксических состояний в зарубежной классификации рассматривается как анемическая, ишемическая (застойная) и гистотоксическая разновидности гипоксии (Wolf, 2014).

Эндогенная респираторная гипоксия возникает вследствие патологии аппарата внешнего дыхания. Выделяют несколько типов респираторной гипоксии: обструктивный, который связан с нарушением проходимости дыхательных путей (от верхних дыхательных путей и до уровня бронхиол); рестриктивный, который опосредован снижением эластичности легочной ткани, ограничением нормальной экскурсии легких или исключением части паренхимы легкого); диффузионный – при нарушении диффузии кислорода через аэрогематический барьер; гипервентиляционный – вследствие значительного снижения концентрации CO_2 в крови при гипервентиляции, респираторного алкалоза и вызванного им спазма сосудов. Также отдельно в этой классификации выделяют гиповентиляционный тип, обусловленный внелегочными причинами – нарушением нервной и гуморальной регуляции

дыхания (подавление дыхательного центра, например), повреждениями грудной клетки и дыхательной мускулатуры и т.д.

Эндогенная циркуляторная гипоксия связана с нарушениями кровообращения, приводящими к недостаточному транспорту кислорода в ткани. По анатомическому этиологическому признаку циркуляторную гипоксию подразделяют на кардиогенную и сосудистую. Эндогенная циркуляторная гипоксия также может быть системной и локальной. Системная циркуляторная гипоксия развивается при поражениях сердечно-сосудистой системы (острая и хроническая сердечно-сосудистая недостаточность, шок различного генеза, коллапс), приводящих к нарушению её нормального функционирования. Локальная циркуляторная гипоксия является результатом местного нарушения кровотока в каком-либо регионе (тромбоз, эмболия, патологический спазм сосудов, воспаление, компрессия сосудистых магистралей) (Евсеева и др., 2008).

Генез гемического типа эндогенной гипоксии связан со снижением кислородной ёмкости крови, которое приводит к снижению парциального давления кислорода в артериальной крови, в то время как альвеолярное pO_2 остается в пределах нормы. По этиологическому фактору гемическую эндогенную гипоксию подразделяют на: анемическую – в результате снижения концентрации гемоглобина в крови вследствие нарушения эритропоэза или кровопотери; гемоглобинтоксическую – в результате инактивации гемоглобина различными токсинами (метгемоглобинемия и т.п.); дезоксигемоглобиновую – в результате снижения кислородсвязывающей способности гемоглобина при гиперкапнии, гипертермии, ацидозе, аномалиях структуры гемоглобина, нарушении диффузии кислорода через мембрану эритроцитов.

Эндогенная цитотоксическая гипоксия возникает при инактивации дыхательных ферментов клеток цитотоксическими веществами. Эндогенная

цитотоксическая и эндогенная гемическая гипоксии по зарубежной классификации относятся к гистотоксической гипоксии.

Эндогенная гиперметаболическая гипоксия возникает при избыточном потреблении кислорода в результате активации метаболизма, например, при гипертермии, тиреотоксикозе (Евсеева и др., 2008).

1.4.3. Тканевая гипоксия

Тканевая гипоксия (третий тип гипоксии по классификации Н.А. Агаджаняна и А.Я. Чиждова) является, фактически, конечным этапом всех других видов гипоксии, и возникает при нарушении способности тканей утилизировать кислород в связи с уменьшением эффективности биологического окисления (Лукьянова, 1997). Значительное число учёных относит вышеупомянутый цитотоксический тип эндогенной гипоксии именно к тканевой гипоксии, рационально полагая, что «инактивация дыхательных ферментов клетки» как нельзя лучше вписывается в определение нарушения способности тканей утилизировать кислород.

Дополнительно к приведенной выше классификации можно подразделить все виды гипоксий по скорости их развития и длительности. При этом можно выделить: молниеносную гипоксию, которая развивается в течение десятков секунд; острую – развивается в течение минут или часов; хроническую гипоксию – развивается в течение недель, месяцев и даже лет (Новиков и др., 1998).

1.4.4. Физиологический ответ организма человека на гипоксию

Гипоксия вызывает ряд быстрых адаптивных ответов в организме человека (Michiels, 2004). Одними из первых реагируют сосуды: происходит периферическая вазодилатация, в легочных сосудах, наоборот,

вазоконстрикция (Yuan, X. J. et al., 1990), которая приводит в норму соотношение «вентиляция/перфузия». Это явление – легочная вазоконстрикция в ответ на острую гипоксию – известно давно; считается, что в основе механизмов, опосредующих её, лежит блокирование одного или нескольких K^+ -каналов мембраны гладкомышечных клеток сосудистой стенки. (Leach, Treacher, 1995). Вызванная блокадой ионного тока деполяризация приводит к открытию Ca^{2+} -каналов и сокращению гладкой мускулатуры сосудов (Michiels, 2004). Гипоксическая вазодилатация происходит, в первую очередь, в головном мозге и сердце (Hochachka, 1998; Michiels, 2004).

Наряду с сосудистыми реакциями, происходит активация дыхательного центра, приводящая к гипервентиляции, компенсирующей недостаточное поступление кислорода (Hochachka, 1998). Эта вентиляционная реакция, по всей видимости, обусловлена нарастанием парциального давления CO_2 плазмы крови (Агаджанян, Елфимов, 1986) и снижением давления O_2 (Hochachka, Monge, 2000; Michiels, 2004), а также – снижения pH плазмы крови из-за накопления недоокисленных продуктов обмена. Увеличение вентиляции может привести (и в некоторых случаях закономерно приводит) к развитию респираторного алкалоза (Samaja et al., 1997).

Снижение парциального давления кислорода в крови вызывает реакцию рецепторов, находящихся в тканях почек и печени. Результатом служит активация синтеза эритропоэтина, что в длительной перспективе стимулирует красный кровяной росток и увеличивает кислородную емкость крови за счет увеличения числа эритроцитоза (Goldberg et al., 1988; Bunn et al., 1998). На гипоксию реагируют и клетки сосудистой стенки других органов, которые начинают вырабатывать эндотелиальный фактор роста сосудов I (vascular endothelial growth factor I, VEGF I) (Forsythe et al., 1996) и экспрессировать рецепторы к нему (Detmar et al., 1997). Данный фактор роста

стимулирует ангиогенез, в особенности в сердце (Hashimoto et al., 1994) и, возможно, в головном мозге (Harik et al., 1996).

Воздействие гипоксии у человека, как и у других аэробных организмов, влияет на энергетический обмен, и в первую очередь – на синтез АТФ (Alberti, 1977). Следует помнить, что в случаях, когда продукция макроэргических соединений перестает удовлетворять требованиям поддержания ионного и осмотического гомеостаза клетки, происходит ее гибель (Nochachka, 1986). Адаптация к гипоксии на клеточном уровне подразумевает, с одной стороны, повышение эффективности производства энергии, а с другой стороны – снижение её расходования (Boutilier, 2001). Трансмембранный транспорт ионов АТФ-азами и синтез белка потребляют большую часть (по разным оценкам, в разных тканях от 60% до 90%) синтезируемого клеткой АТФ (Rolfe, Brown, 1997). В ходе исследований было установлена иерархия клеточных процессов, потребляющих АТФ. Синтез белка и нуклеиновых кислот занимают в ней нижнюю позицию и первыми блокируются в случае дефицита макроэргических субстратов (Buttgereit, Brand, 1995; Tinton et al., 1997).

Разные типы клеток имеют разную чувствительность к гипоксии, которая, по всей видимости, зависит от электрической активности клетки, а значит, от потребления макроэргов АТФ-зависимыми ионными насосами. Считается, что в нейронах эти процессы потребляют до 80% производимого АТФ, в то время как в миоцитах скелетной мускулатуры – около 20% (Boutilier, St-Pierre, 2000). Это одна из ключевых причин столь высокой чувствительности нервной ткани к недостатку кислорода.

В условиях недостатка кислорода для обеспечения энергетических потребностей клетки происходит переключение на гликолитический путь расщепления глюкозы. Еще Пастер в конце XIX века обратил внимание на эти изменения, которые сейчас так и называют – «эффект Пастера» (Nochachka, Monge, 2000). Переключение происходит при участии HIF-1,

одного из ключевых транскрипционных факторов и регуляторов адаптации к гипоксии (Hue, Rider, 1987; Marsin et al., 2000; Minchenko et al., 2002). Другие молекулярные механизмы приводят к ингибированию синтеза жирных кислот, триглицеридов и стерина (Hardie, Hawley, 2001).

Таким образом, воздействие гипоксии приводит к гипервентиляции, увеличению сердечного выброса и венозного возврата, активации ангиогенеза, повышению кислородной емкости крови, переключению энергетического обмена с аэробного на анаэробный и подавлению энергоёмких, но не ключевых для выживания клетки метаболических путей и транспортных систем.

1.5. Экспериментальное моделирование гипоксии

С целью изучения воздействия гипоксии на организм человека или подопытных животных, на клетки и ткани, было разработано множество экспериментальных моделей гипоксии. В соответствии с классификацией типов гипоксии все экспериментальные модели можно разделить на модели экзогенной, эндогенной и тканевой гипоксии.

1.5.1. Модели экзогенной гипоксии

Базовыми считаются модели острой экзогенной гипоксии: гипобарической и нормобарической. В техническом отношении модель острой нормобарической гипоксии более проста. Наиболее элементарной является модель нормобарической гиперкапнической гипоксии, для создания которой подопытных животных помещают в герметически закрытые емкости определенного объема на заданное время (Загрядский, Сулимо-Самуйло, 1975; Агаджанян, Чижов, 2003).

Гипоксическая гиперкапническая дыхательная среда в этой модели создается естественным образом вследствие дыхания животного. Человеку в подобных экспериментах для дыхания предоставляется ограниченный необновляемый объем дыхательной смеси, например, в специальном мешке. В тех исследованиях, где особенно важно соблюдение постоянной точно фиксированной концентрации кислорода и углекислоты в дыхательной смеси, подобная модель, естественно, неприменима. В таких случаях для создания соответствующих условий используются гипоксические газовые смеси, получаемые с помощью гипоксикаторов, или путём смешивания чистых газов, или атмосферного воздуха с чистыми газами (Быков, 1984; Караш и др., 1988; Новиков и др., 1998). Преимуществом моделей, в которых гипоксическая дыхательная смесь получается путём смешения чистых газов, является возможность очень строго соблюдать требуемые парциальные давления газов в смеси.

Различные варианты последней модели используются, в частности, в экспериментах на культурах тканей и клеточных культурах, когда над средой, содержащей исследуемую культуру, создается гипоксическая атмосфера (Falanga et al., 1991; Wu, Danli, Yotnda, 2011).

Гипобарическую экзогенную острую гипоксию в эксперименте можно изучать как минимум двумя способами. Первый – в условиях естественной (высотной) гипобарической гипоксии, что подразумевает подъем добровольцев-исследуемых или лабораторных животных на уровень средне- и высокогорья (Bailey et al., 2000; Edwards et al., 2010; Bilo et al., 2019). Второй метод предусматривает использование барокамер, позволяющих «поднять» испытуемых или подопытных животных на заданную высоту (Mortazavi et al., 2003; Kayser et al., 2012).

1.5.2. Модели эндогенной гипоксии

Одним из важнейших типов эндогенной гипоксии, с точки зрения физиологической значимости, участия в патогенезе различных заболеваний и патологических состояний, является эндогенная циркуляторная гипоксия.

Для изучения влияния гипоксии, вызванной нарушением нормальной функции сердечно-сосудистой системы, был разработан целый ряд экспериментальных моделей. Так, например, моделирование системной циркуляторной гипоксии возможно с помощью искусственно вызванного у подопытного животного эндотоксического шока путем внутривенного введения липополисахарида холерных вибрионов. Другая модель системной циркуляторной гипоксии, реализуемая в эксперименте на кроликах, подразумевает оперативное вмешательство и создание надклапанного стеноза аорты путем ее лигирования (Хабриев, 2005). Ряд моделей предусматривает вмешательство на самом сердце, например, искусственное создание клапанных пороков сердца (Хабриев, 2005).

Для создания модели хронической системной кардиогенной циркуляторной гипоксии используется интоксикация изадрином: двукратное, с интервалом в 24 часа, подкожное введение данного препарата вызывает у подопытных крыс хроническую сердечную недостаточность (Ковалев и др., 1988). Существует также методика создания модели системной гипоксии с помощью глобальной ишемии, вызванной перегрузками в кранио-каудальном векторе при вращении подопытного животного на специальной центрифуге (Хабриев, 2005).

Другой подход, используемый при изучении циркуляторной гипоксии в эксперименте, подразумевает создание моделей локальной циркуляторной гипоксии сосудистого генеза. Модели данного типа создаются путем окклюзии или компрессии артерий, питающих отдельные органы или части

тела, ткани (Cabralès, 2010). Как правило, эти модели также предполагают оперативное вмешательство. Так, при изучении воздействия гипоксии на головной мозг, производится лигирование или окклюзия сонных артерий (Marret et al., 2004; Mach et al., 2009).

Также существуют модели локальной циркуляторной гипоксии конечностей (Биленко, 1989). Известны весьма остроумные модели локальной циркуляторной гипоксии, например, с применением особых фоточувствительных соединений и индуцирования тромбоза путем точечного светового воздействия в проекции нужных сосудов напрямую через интактные кожные покровы (Deryck, 1990).

Для создания гемической модели гипоксии подопытным животным вводят вещества, нарушающие нормальную кислородтранспортную функцию гемоглобина, например, нитрит натрия. Во внутренней среде организма нитрит превращается в нитрат, который окисляет двухвалентное железо гема до трёхвалентного, превращая гемоглобин в метгемоглобин, не способный обратимо связывать кислород (Хабриев, 2005). Другой способ создания гемической гипоксии подразумевает использование модели гемической анемической гипоксии. Создаётся сосудистый доступ (наиболее простой вариант – канюлирование крупной вены конечности), из кровеносного русла подопытного животного изымается необходимое количество крови, а недостаток объема циркулирующей крови восполняется различными растворами для внутривенных вливаний, чаще всего – физиологическим раствором хлорида натрия (Sapirstein et al., 1960; Лукьянова, 1990; Рыжков, Заржецкий, 2018).

1.5.3. Модели тканевой гипоксии

Тканевая гипоксия возникает в результате неспособности клеток утилизировать кислород (Агаджанян, Чижов, 2003). Согласно принятой в

зарубежной литературе классификации гипоксии этот тип называется гистотоксической гипоксией (Cross, Plunkett, 2014). Характер этиологических факторов, вызывающих тканевую гипоксию, делает моделирование первичной тканевой гипоксии достаточно сложным. Существующие модели предполагают создание гипоксии путем введения внутривенно нитропруссид натрия (Лукьянова, 1990) или цианидов (Лукьянова, 1990) подопытным животным. В обеих моделях действующим началом является цианид, который инактивирует цитохром С-оксидазу клеток организма и нарушает таким образом утилизацию кислорода в энергетическом метаболизме (Burr, Leung, 2014).

Другая модель тканевой гипоксии создаётся с помощью системного введения соединений кобальта (Van Liew, Chen, 1972; Muñoz-Sánchez, Cháñez-Cárdenas, 2019). Кобальт в повседневной жизни является индустриальным поллютантом и вызывает компоненты как гемической, так и тканевой гипоксии в модельном организме (Zadnipyany et al., 2017). Один из механизмов моделирования гипоксии в этом случае – стабилизация регуляторных факторов HIF-1 α и HIF-2 α .

Ещё одной моделью тканевой гипоксии, применяющейся в основном для моделирования локальных поражений, является малонатная модель (Barros-Miñones et al., 2013). Малонат является ингибитором сукцинатдегидрогеназы, комплекса II митохондриальной цепи переноса электронов (Valls-Lacalle et al., 2016). Блокирование этого фермента, как и блокирование работы цитохром С-оксидазы цианидами, приводит к нарушению утилизации кислорода для синтеза макроэргических соединений в митохондриях, а соответственно – гипоксии на клеточном уровне. Локальные инъекции малоната в различные отделы ЦНС применяются для моделирования ишемических (гипоксических) повреждений нервной ткани (Barros-Miñones et al., 2013).

1.5.4. Обоснование использования нормобарической гипоксической модели.

В исследованиях на людях применяют различные модели экзогенной гипоксии. Гипобарическая гипоксия может быть достигнута естественным образом за счёт подъёма в горы или подъёма на летательном аппарате на различные высоты (Bailey et al., 2000; Castell et al., 2010). В лабораторных условиях её также можно воспроизвести с помощью барокамер (Быков и др., 2017). Высотная модель гипоксии имеет свои важные особенности: помимо эффектов сниженного парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, на организм испытуемых также действуют другие факторы – низкое барометрическое давление, влажность, температура. Эффекты их сочетанного воздействия сложны, поэтому анализ полученных результатов может быть затруднён (DiPasquale et al., 2015).

Барокамерная гипоксия в этом отношении может давать лучшие возможности для контроля хода экспериментального воздействия, но так же предусматривает воздействие гипобарического фактора. В соответствии с данными специализированной литературы, быстрый подъём на высоту 6100 м над уровнем моря и выше, или эквивалентное барокамерное воздействие значительно снижают резервное время активного сознания у неадаптированных к таким воздействиям людей: 10 минут на высоте 6100 м, 2,5 минуты на высоте 7600 м (International Civil Aviation Organization, 2012). Резервное время – time of useful consciousness, TUC – определяется обычно как интервал между временем начала гипоксии и временем, когда теряется способность к целенаправленным действиям, например, способность надеть кислородную маску.

Нормобарическая гипоксическая модель позволяет избежать воздействия гипобарической и других компонент высотной и барокамерной гипоксии, в том числе их воздействия на самих исследователей. Её

применение позволяет снизить не только риски синкопальной реакции на гипоксическое воздействие, но и риск развития декомпрессионной (кессонной) болезни и очаговых поражений белого вещества ЦНС (Varis et al., 2019). В научных исследованиях применяют различные уровни нормобарического гипоксического воздействия, от относительно мягких: 15% O_2 во вдыхаемой гипоксической смеси (Ветряков и др., 2018) – до более жёстких режимов, предполагающих вдыхание смесей, содержащих 12%-10% O_2 (Ветряков и др., 2018; Голубев и др., 2019). Опубликованы и результаты работ, в которых добровольцы успешно дышали гипоксическими газовыми смесями и с более низким содержанием кислорода: 8%, 7% и 6% O_2 в дыхательной смеси (Varis et al., 2019).

В ходе совместных работ нашего коллектива, состоявшего из сотрудников ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН и ИЭФБ РАН, ранее была опробована модель изучения острой нормобарической гипоксии ГГС-9 (гипоксическая газовая смесь, содержащая 9% O_2) (Бойко и др., 2010; Бойко, Бурых, 2012) с участием добровольцев-мужчин. Эта модель показала свою эффективность в выявлении метаболических трансформаций, вызванных изолированным гипоксическим воздействием. Преимущества такой модели описаны выше. Тяжесть и глубина гипоксического воздействия были подтверждены данными инструментального мониторинга физиологических показателей испытуемых (насыщение кислородом гемоглобина крови, SpO_2). Именно эта модель острой нормобарической гипоксии использовалась нами для изучения влияния гипоксии на уровни свободных АК плазмы крови (Черных, 2013).

1.6. Профиль свободных аминокислот плазмы крови при гипоксии

Влияние воздействия острой экзогенной нормобарической гипоксии на профиль свободных АК плазмы крови на настоящий момент изучено недостаточно. Имеющиеся в литературе сообщения не создают единой картины, опираясь на которую можно было бы строить теоретические предположения и подтверждать или опровергать их экспериментально.

Так, в работе Bondoli и соавторов (1980) в ответ на гипоксическое воздействие было показано повышение уровней почти всех свободных АК плазмы крови за исключением цистеина (Bondoli et al., 1980). В работе Albekairi (1989) сообщается о том, что острая экзогенная гипоксия вызвала противоположную реакцию – снижение уровней значительной части свободных АК плазмы за исключением цистеина, валина, лейцина, изолейцина (Albekairi, 1989). В статье Muratsubaki и Yamaki (2011), также проводивших эксперименты с воздействием острой экзогенной гипоксии, были продемонстрированы результаты, расходящиеся с сообщениями, сделанными ранее (Muratsubaki, Yamaki, 2011). Так, в этой работе было продемонстрировано статистически значимое снижение концентраций свободного пролина и аргинина плазмы, и значимое повышение уровней всех АКРЦ (валина, лейцина и изолейцина), а также ароматических АК тирозина и фенилаланина (Muratsubaki, Yamaki, 2011).

Данные об изменениях профиля свободных АК плазмы крови у человека в ответ на острую экзогенную гипоксию ограничены небольшим количеством сообщений. В ряде таких исследований они играют второстепенную роль (Bailey et al., 2000; Bailey et al., 2001). В значительной части работ, в которых в качестве объектов исследования выступали рекрутированные добровольцы, использовалась высотная (горная) экзогенная

гипоксия (Bailey et al., 2000; Castell et al., 2010; Liao et al., 2016). Это опробованная десятилетиями и в то же время весьма специфическая модель, имеющая свои преимущества и недостатки, поскольку наряду с собственно гипоксическим компонентом, обусловленным снижением парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, существенную роль играет снижение общего барометрического давления, изменения температуры и влажности. Взаимодействие этих различных факторов окружающей среды и эффекты их сочетанного воздействия весьма сложны, что создаёт проблемы при анализе получаемых данных (DiPasquale et al., 2015) и сравнении результатов между разными исследованиями.

В этих работах было продемонстрировано, например, снижение уровней свободного триптофана в результате пребывания на высоте 2100-3000 метров над уровнем моря (Castell et al., 2010). В другой работе в результате пребывания добровольцев на высоте 5300 метров над уровнем моря было продемонстрировано значимое повышение уровней свободных пролина, гидроксипролина, аланина и метионина плазмы и параллельное снижение показателей свободного валина плазмы (Liao et al., 2016). Однако нужно учесть, что в этих работах добровольцы подвергались воздействию высотной гипоксии в течение заметно более длительного времени: дней и недель.

В специализированной литературе есть очень мало исследований, в которых проводилось изучение изменений пула свободных АК плазмы крови человека на фоне нормобарического гипоксического воздействия (Bailey et al., 2001; Vohra et al., 2019). При этом цели, поставленные авторами этих оригинальных исследований, сильно отличались цели нашего исследования.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования воздействия острой нормобарической гипоксии на организм человека проводились 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 проведении гипоксического тестирования участвовали сотрудники обоих научных учреждений. В рамках данной работы представлены результаты двух серий обследований с острой нормобарической гипоксией ГГС-9 (используемая для создания гипоксии газовая смесь содержала 9% O₂ по объёму). Эти две серии исследований отличались по продолжительности гипоксического воздействия (45 и 25 минут гипоксии) и по требованиям к добровольцам: в серии с 45-минутным гипоксическим воздействием добровольцы подвергались воздействию острой гипоксии после лёгкого низкожирового завтрака, в серии с 25-минутным гипоксическим воздействием обследование проводилось утром строго натощак.

2.1 Объекты исследования

Гипоксическое исследование проводилось при участии двух групп добровольцев – здоровых мужчин молодого возраста (22-32 года), не имевших на момент исследования острых или хронических заболеваний. Медицинское освидетельствование добровольцев проводилось сертифицированным врачом-терапевтом в составе группы исследователей. Данные о здоровье добровольцев были взяты из амбулаторных карт.

Дизайн исследования и протокол гипоксического воздействия соответствовали положениям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association, 2001; World Medical Association, 2013) и были одобрены Комитетом по биоэтике ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). Участники исследования получили всю необходимую информацию о протоколе исследования, используемых процедурах, возможном риске и дискомфорте, связанных с воздействием гипоксии. Они также были проинформированы, что могут отказаться от участия в исследовании в любой момент без каких-либо последствий. После полного инструктажа все добровольцы-участники дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Всего в двух группах добровольцев насчитывалось 39 человек. В исследовании с воздействием острой нормобарической гипоксии не натощак (после легкого низкожирового завтрака, ГГС-9, 45 минут) участвовал 21 доброволец, в исследовании с воздействием острой нормобарической гипоксии натощак (ГГС-9, 25 минут) участвовало 18 добровольцев. По различным причинам (в частности, преждевременное завершение теста по желанию добровольца или по объективным показаниям) не у всех испытуемых удалось проанализировать уровни свободных АК плазмы крови в соответствии с протоколами экспериментов. Таким образом, в данную работу включены результаты, полученные у 9 испытуемых, проходивших исследование не натощак (возраст 22-32 года, $n=9$) – первая группа – и 13 испытуемых из проходивших исследование натощак (возраст 22-32 года, $n=13$) – вторая группа.

Для установки референтных значений уровней свободных АК в плазме крови была набрана группа добровольцев, по характеристикам соответствовавшая экспериментальным группам (22-32 года, $n=21$).

2.2 Методы исследования

Добровольцы в первой и второй группах подвергались воздействию острой нормобарической гипоксии, которая создавалась путём подачи для дыхания гипоксической газовой смеси (ГГС-9, дыхательная смесь, содержащая 9% O_2 в N_2 по объёму) через маску. Гипоксическая газовая смесь ГГС-9 создавалась путём смешивания атмосферного воздуха и чистого азота в мешке-резервуаре. Смесь перемешивалась в мешке в течение 30 минут, контроль концентрации кислорода в смеси осуществлялся с помощью газоанализатора.

В связи с тяжестью и длительностью предполагаемого гипоксического воздействия испытуемые, подвергавшиеся воздействию острой нормобарической гипоксии в течение 45 мин (первая группа), проходили обследование после лёгкого низкожирового завтрака. Протокол исследования в первой группе предусматривал 15 минутную подготовку к гипоксическому тестированию (сидя в кресле после установки всех датчиков и венозного катетера), 45 минут нормобарической гипоксии (ГГС-9) и 50 минут восстановления (рисунок 2).



Рисунок 2 – Схема гипоксии и забора образцов крови в ходе исследования в первой группе.

С учётом полученного в первой группе опыта гипоксических исследований и результатов, в следующей серии длительность гипоксического воздействия была сокращена до 25 минут, обследование проводилось с утра строго натощак. Для добровольцев, подвергавшихся воздействию острой нормобарической гипоксии натощак (вторая группа), протокол исследования предусматривал 15 минутную подготовку к гипоксическому тестированию (сидя в кресле после установки всех датчиков и венозного катетера), 25 минут нормобарической гипоксии (ГГС-9) и 15 минут восстановления (рисунок 3).



Рисунок 3 – Схема гипоксии и забора образцов крови в ходе исследования во второй группе.

Добровольцы в референтной группе сдавали кровь для анализа уровней свободных АК плазмы крови утром строго натощак.

Добровольцы, участвовавшие в исследовании, в ходе проведения гипоксического тестирования находились в положении сидя в медицинском кресле («КМ», Диакос, Россия). Перед началом исследования при

соблюдении всех правил асептики и антисептики сотрудником, имеющим соответствующий сертификат, устанавливался периферический венозный катетер в кубитальную вену («TROGE», Германия). С целью предупреждения свертывания крови и сохранения объема циркулирующей крови между периодами забора крови внутривенно капельно осуществлялась инфузия физиологического раствора NaCl.

В ходе гипоксического эксперимента сотрудниками Межинститутской лаборатории сравнительных эколого-физиологических исследований ИЭФБ РАН проводился непрерывный контроль функционального состояния испытуемых; полный протокол мониторинга был описан ранее (Сороко и др., 2012; Бойко, Бурых, 2012). Критерием развития у добровольцев в экспериментальных группах острой нормобарической гипоксии считалось снижение показателей насыщения гемоглобина крови кислородом (SpO_2) с 99-98% до 63-65% (Бойко и др., 2010).

2.2.1. Забор образцов крови

Забор образцов венозной крови осуществлялся из катетеризированной кубитальной вены сотрудником, имеющим соответствующий сертификат и квалификацию. В пробирку-вакутайнер (Improve, КНР) за один раз отбирали 3 мл цельной крови. Основной объем крови был немедленно подвергнут центрифугированию при 3000 об/мин для отделения форменных элементов от плазмы. Отделённая плазма была помещена в пробирки-эппендорфы и заморожена до выполнения анализа.

Схема забора крови у добровольцев-испытуемых во всех сериях предусматривала забор венозной крови на анализ через 15 минут после помещения испытуемого в кресло и установки венозного катетера перед подачей гипоксической смеси (первая порция крови, полученная при установке венозного катетера, на анализ не бралась).

В первой группе затем кровь на анализ забиралась на 5-ой, 10-ой, 20-ой и 40-ой минуте гипоксического периода, а затем на 10-ой и 50-ой минутах восстановительного периода; схема приведена на рисунке 2 (см. выше).

Во второй группе забор крови на анализ осуществлялся во время гипоксического воздействия на 5-ой, 10-ой, 20-ой минутах; в восстановительном периоде на 5-ой и 15-ой минутах; схема приведена на рисунке 3.

2.2.2. Подготовка образцов крови

Пробоподготовка образцов плазмы венозной крови производилась, как было описано ранее (Aristoy, Toldra, 1991; Kamaura et al., 2010; Gu et al., 2012). После подготовки пробы были растворены в буфере для разведения образцов из комплекта буферных растворов для аминокислотного анализатора Aracus (MembraPure GmbH, BRD), раствор помещен в одноразовые центрифужные фильтр-пробирки с диаметром пор фильтра 0,02 мкм и отцентрифугирован при 5000 об/мин в течение 5 минут. Фильтрат перелит в вials для образцов, используемые в автосемплере аминокислотного анализатора.

2.2.3. Анализ уровней свободных аминокислот плазмы крови человека

Анализ уровней свободных АК в плазме крови испытуемых был произведён с помощью классического метода ионообменной градиентной жидкостной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином (Kimura et al., 2009).

Анализ свободных АК плазмы проводился на специализированном аминокислотном анализаторе Aracus (MembraPure GmbH, Германия).

Анализатор использует градиентное элюирование (градиент pH литий-цитратного буфера) с градиентным изменением температуры хроматографической колонки для обеспечения разделения различных аминокислот. Постколоночная дериватизация нингидрином при высокой температуре в реакторе приводит к образованию окрашенных производных АК, которые детектируются двумя спектрофотометрами. Качественное определение АК производится по времени их удержания относительно момента ввода образца в систему. Количественный подсчет содержания каждой АК в образце производится по предварительно сделанной калибровке. Для обсчёта полученных хроматограмм использовалась программа AminoPeak.

На рисунке 4 приведена хроматограмма профиля свободных аминокислот плазмы крови человека, полученная у добровольцев, участвовавших в исследовании.

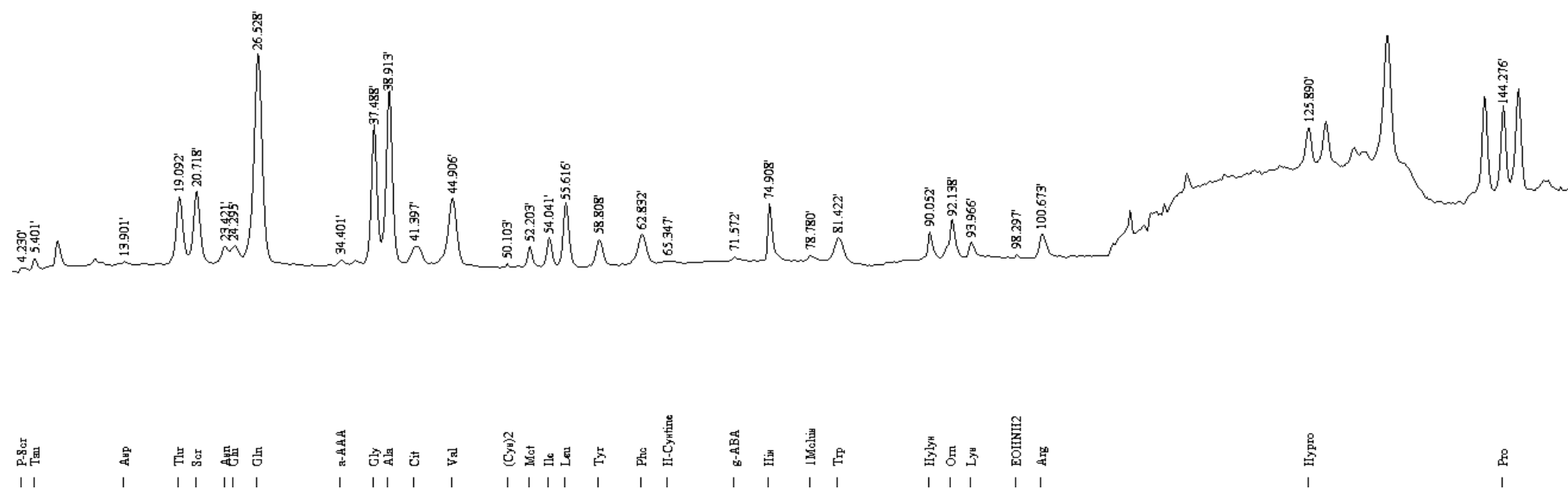


Рисунок 4 – Хроматограмма профиля свободных аминокислот плазмы крови у добровольцев в нашем исследовании

2.3. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка данных была проведена с использованием программного обеспечения R (v.3.6.1.) (R Development Core Team, 2018) с графической оболочкой RStudio (RStudio PBC, США). Для анализа применялись пакеты методик *PMCMRplus* (v.1.4.2.) (Pohlert, 2018), *WRS2* (v.1.0.) (Mair, Wilcox, 2019). Графики были построены с применением пакетов *ggplot2* (v.3.2.1.) (Wickham, 2016), *ggpubr* (v.0.2.4.) (Kassambara, 2019), *ggsignif* (v.0.6.0.) (Ahlmann-Eltze, 2020).

Для проверки соответствия данных допущениям, необходимым для применения параметрических методов были использованы: критерий Холмогорова-Смирнова для оценки нормальности распределения, критерий Левена для оценки гомогенности дисперсий, были построены Р-Р графики данных. Оба теста дали значимые величины p ($p < 0,05$), графики подтвердили отклонения от допущений, поэтому мы сочли, что требования нормальности распределений и гомогенности дисперсий не выполнялись. По этой причине для оценки статистических различий и корреляций использовались непараметрические и робустные методы, а в тексте данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала (Me (25%; 75%)), в таблицах и графиках – в виде медианы, 25-го, 75-го перцентилей, минимума и максимума.

Для попарных сравнений между значениями показателей АК, полученными у добровольцев в гипоксических группах и референтной группой, а также для сравнения показателей между гипоксическими группами использовался непараметрический критерий Баумгартнера-Вайса-Шиндлера (Neuhäuser, 2005). Для оценки статистической значимости различий в динамике гипоксического исследования в каждой группе был применён непараметрический критерий Скиллинга-Мэка (омнибус-критерий) (Chatfield, Mander, 2009), а для оценки статистической значимости

множественных сравнений между точками забора крови в каждой группе был применён *post-hoc* критерий Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений (Benjamini, Hochberg, 1995). Анализ корреляционных зависимостей был выполнен с использованием робустного коэффициента корреляции. Различия и коэффициенты корреляции считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно протоколу эксперимента в первой группе в связи с тяжестью предъявляемой гипоксии гипоксическое тестирование (45 минут, ГГС-9) проводилось не натощак, а после лёгкого низкожирового завтрака. В этой группе были выявлены значимые изменения уровней ряда свободных АК плазмы крови в восстановительном периоде. На основе опыта, полученного в исследованиях в этой группе, было принято решение о сокращении длительности гипоксического воздействия до 25 минут, а также о необходимости устранения алиментарного фактора в дальнейших исследованиях. Во второй группе (25 минут гипоксии, ГГС-9, натощак) были выявлены значимые изменения уровней ряда свободных АК плазмы крови в гипоксическом и восстановительном периоде.

3.1. Характеристика уровней свободных аминокислот плазмы крови у добровольцев в референтной группе

Как уже было сказано выше, существуют определённые разногласия и разночтения в нормативах содержания свободных АК в плазме крови человека. Предлагаемые границы референтных коридоров содержания свободных АК в плазме крови у человека варьируют у различных авторов (Klassen et al., 2001; Cynober, 2004; Furst, Stehle, 2004; Tan, Gajra, 2006), что, вероятно, обусловлено различиями изученных групп и методик анализа свободных АК плазмы крови. В большинстве случаев авторы представляли свои данные в формате «среднее $\pm$ стандартное отклонение». Однако, поскольку в данном случае не выполнялись допущения, позволяющие применять параметрические методы, данные представлены в тексте в виде медианы, первого (нижнего, 25%) и третьего (верхнего, 75%) квартилей, и в виде медианы, первого, третьего квартилей, минимума и максимума в

таблицах. Таким образом отсутствовала возможность напрямую сравнивать уровни свободных АК плазмы крови у добровольцев, участвовавших в представленном исследовании, с результатами, полученными другими учёными.

В связи с необходимостью получить доступные для сравнения значения уровней свободных АК плазмы крови человека вне воздействия гипоксии, была набрана референтная группа (здоровые мужчины, возраст – 23-32 года, n=21), соответствовавшая по полу, возрасту, состоянию здоровья добровольцам, проходившим гипоксическое тестирование. Был выполнен анализ уровней свободных АК плазмы крови у добровольцев из этой группы.

Данные по уровням свободных аминокислот плазмы крови у добровольцев из референтной группы приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Уровни свободных аминокислот плазмы крови у добровольцев из референтной группы и у добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании (первая и вторая группы) в догипоксическом периоде (фон), ммоль/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)

3.2. Характеристика уровней свободных аминокислот плазмы у добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании, до начала гипоксического тестирования в сравнении с уровнями в референтной группе

В таблице 2 представлены значения концентраций свободных АК плазмы до начала гипоксического тестирования (фоновые уровни) у добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании после легкого низкожирового завтрака (ГГС-9, 45 мин, первая группа) и натошак (ГГС-9, 25 мин, вторая группа), в сравнении со значениями в референтной группе. При анализе полученных данных не было выявлено значимых различий между уровнями свободных АК плазмы референтной группы и фоновыми уровнями АК плазмы добровольцев, участвовавших в гипоксическом исследовании ($p > 0,05$).

3.3. Различия в динамике свободных АК между первой и второй группами в первые 20 минут гипоксического исследования

При сравнении концентраций свободных АК плазмы крови между первой и второй группами добровольцев в динамике первых 20 минут гипоксического воздействия были выявлены значимые различия по показателям глутамина, серина, треонина и гистидина.

До начала гипоксии уровни свободного глутамина в плазме крови добровольцев из первой и второй группы составляли 439,0 (369,2; 460,0) мкмоль/л и 416,1 (326,0; 533,9) мкмоль/л соответственно (таблица 3). Значимых различий не наблюдалось ($p > 0,05$).

Таблица 3 – Динамика уровней свободного глутамина плазмы крови в первой и второй группах в первые 20 минут гипоксического исследования, мкмоль/л (медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль)). Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип
Первая группа	439,0 (369,2; 460,0)	424,8 (405,1; 449,2)	437,2 (380,7; 440,1)*	397,2 (359,4; 451,7)
Вторая группа	416,1 (326,0; 533,9)	432,3 (356,5; 504,5)	478,1 (429,0; 526,8)*	442,3 (385,6; 508,9)

Примечание: * - различия между группами значимы при $p < 0,05$.

На 5-й минуте гипоксического периода между группами также не наблюдалось значимых различий ($p > 0,05$), и показатели свободного глутамина составляли 424,8 (405,1; 449,2) мкмоль/л и 432,3 (356,5; 504,5) мкмоль/л в первой и второй группах соответственно. На 10-й минуте гипоксии уровень глутамина плазмы во второй группе повысился до 478,1 (429,0; 526,8) мкмоль/л, что было значимо выше ($p = 0,03$) уровня в первой группе - 437,2 (380,7; 440,1) мкмоль/л. На 20-й минуте гипоксии значимых различий между уровнями свободного глутамина в первой (397,2 (359,4; 451,7) мкмоль/л) и второй (442,3 (385,6; 508,9) мкмоль/л) группами не наблюдалось ($p > 0,05$).

Уровни свободного серина плазмы у добровольцев первой и второй группы в догипоксическом периоде также не демонстрировали значимых различий ($p > 0,05$; таблица 4). В первой группе фоновые значения составили 82,2 (60,7; 88,6) мкмоль/л, во второй - 76,9 (67,9; 92,5) мкмоль/л.

Таблица 4 – Динамика уровней свободного серина плазмы крови в первой и второй группах в первые 20 минут гипоксического исследования, мкмоль/л, (медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль)). Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип
Первая группа	82,2 (60,7; 88,6)	77,5 (71,8; 83,5)	73,5 (54,3; 87,6)*	67,4 (57,7; 78,2)
Вторая группа	76,9 (67,9; 92,5)	81,9 (67,0; 92,0)	86,2 (75,4; 97,9)*	77,3 (73,1; 91,7)

Примечание: * - различия между группами значимы при $p < 0,05$.

На 5-й минуте гипоксии между показателями первой группы – 77,5 (71,8; 83,5) мкмоль/л – и второй группы – 81,9 (67,0; 92,0) мкмоль/л, не было выявлено значимых различий ($p > 0,05$). На 10-й минуте гипоксии уровень свободного серина во второй группе значимо ($p = 0,033$) повысился до 86,2 (75,4; 97,9) мкмоль/л, в то время как в первой составил 73,5 (54,3; 87,6) мкмоль/л. На 20-й минуте гипоксии значимые различия между группами исчезли. В первой группе уровень свободного серина плазмы составил 67,4 (57,7; 78,2) мкмоль/л, а во второй – 77,3 (73,1; 91,7) мкмоль/л.

Третьей АК, динамика которой значимо различалась между группами в первые 20 минут гипоксии, был треонин. До начала гипоксического воздействия различий между группами не наблюдалось ($p > 0,05$), уровень треонина в первой группе составлял 132,2 (92,4; 135,1) мкмоль/л, во второй – 138,5 (113,4; 150,6) мкмоль/л (таблица 5).

Таблица 5 – Динамика уровней свободного треонина плазмы крови в первой и второй группах в первые 20 минут гипоксического исследования, мкмоль/л, (медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль)). Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип
Первая группа	132,2 (92,4; 135,1)	110,4 (104,1; 144,8)	127,2 (83,9; 142,8)*	107,63 (95,9; 131,0)
Вторая группа	138,5 (113,4; 150,6)	131,6 (125,8; 147,5)	148,7 (129,3; 160,6)*	132,9 (118,5; 150,4)

Примечание: * - различия между группами значимы при $p < 0,05$.

Во время гипоксии на 5-й минуте значимых различий между двумя группами также не наблюдалось ($p > 0,05$): уровень треонина в плазме в первой группе был 110,4 (104,1; 144,8) мкмоль/л, а во второй 131,6 (125,8; 147,5) мкмоль/л. На 10-й минуте, как и в случае с глутамином и серином, показатель во второй группе значимо ($p = 0,031$) повысился до 148,7 (129,3; 160,6) мкмоль/л по сравнению с показателем в первой группе – 127,2 (83,9; 142,8) мкмоль/л. Эти значимые различия исчезли на 20-й минуте гипоксии, когда уровень свободного треонина в первой группе был 107,63 (95,9; 131,0) мкмоль/л, а во второй – 132,9 (118,5; 150,4) мкмоль/л ($p > 0,05$).

Уровень свободного гистидина плазмы крови до начала гипоксии в первой группе был 54,4 (51,3; 58,7) мкмоль/л, а во второй – 58,1 (53,9; 69,7) мкмоль/л (таблица 6). Значимых различий между этими показателями не было ($p > 0,05$).

Таблица 6 – Динамика уровней свободного гистидина плазмы крови в первой и второй группах в первые 20 минут гипоксического исследования, мкмоль/л, (медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль)). Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип
Первая группа	54,4 (51,3; 58,7)	55,2 (52,5; 65,6)	57,2 (51,0; 62,1)*	51,8 (48,7; 61,7)
Вторая группа	58,1 (53,9; 69,7)	62,3 (48,8; 67,8)	63,9 (59,8; 70,7)*	56,7 (55,1; 71,5)

Примечание: * - различия между группами значимы при $p < 0,05$.

После начала гипоксического воздействия на 5-й минуте по-прежнему не наблюдалось значимых различий ($p > 0,05$) между показателями первой – 55,2 (52,5; 59,5) мкмоль/л – и второй – 62,3 (48,8; 67,8) мкмоль/л – групп. На 10-й минуте гипоксии уровень свободного гистидина плазмы во второй группе был значимо выше ($p = 0,032$), чем в первой: 63,9 (59,8; 70,7) мкмоль/л против 57,2 (51,0; 62,1) мкмоль/л. Затем, на 20-й минуте гипоксии мы снова не наблюдали значимых различий ($p > 0,05$). Показатели гистидина в первой группе были 51,8 (48,7; 61,7) мкмоль/л, а во второй - 56,7 (55,1; 71,5) мкмоль/л.

3.4. Динамика уровней свободного глутамина у добровольцев в первой группе

У добровольцев в первой группе (обследование после легкого низкожирового завтрака, ГГС-9, 45 минут) перед началом гипоксии уровень свободного глутамина плазмы крови составлял 439,0 (369,2; 460,0) мкмоль/л,

что значимо не отличалось ($p>0,05$) от уровня в референтной группе – 475,4 (412,1; 550,2) мкмоль/л (таблица 2).

Таблица 7 – Динамика уровней свободного глутамина в плазме крови добровольцев в первой группе (ГГС-9, 45 минут), мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	40 гип	10 вос	50 вос
Минимум	308,9	324,0	336,3	291,9	325,5	161,1*	283,8
25%	369,2	405,1	380,7	359,4	346,2	289,9*	340,4
Медиана	439,0	424,8	437,2	397,2	368,5	344,4*	401,3
75%	460,0	449,2	440,1	451,7	392,0	403,2*	452,2
Максимум	510,8	549,2	500,0	504,6	597,9	540,4*	689,6

Примечание: * - различия с фоном и 5-й минутой гипоксии значимы при $p<0,05$.

В ходе гипоксического воздействия не наблюдалось значимых изменений уровня свободного глутамина плазмы крови у добровольцев в первой группе ($p>0,05$, таблица 7).

На 5-ой минуте гипоксии уровень свободного глутамина плазмы у этой группы добровольцев был 424,8 (405,1; 449,2) мкмоль/л; на 10-ой минуте – 437,2 (380,7; 440,1) мкмоль/л; на 20-ой минуте – 397,2 (359,4; 451,7) мкмоль/л; на 40-ой минуте уровень свободного глутамина плазмы составил 368,5 (346,2; 392,0) мкмоль/л.

Согласно полученным результатам, на 10-ой минуте восстановительного периода у добровольцев в первой группе уровень свободного глутамина плазмы крови статистически значимо снизился по

сравнению со значениями фона и 5-й минуты гипоксии – до 344,4 (289,9; 403,2) мкмоль/л ($p=0,046$ в обоих случаях).

К 50-ой минуте восстановительного периода уровень свободного глутамина плазмы крови у добровольцев из первой группы повысился до 401,3 (340,4; 452,2) мкмоль/л, что значимо не отличалось от фонового уровня в этой группе ($p>0,05$).

3.5. Динамика уровней свободного аланина у добровольцев в первой группе

Уровень свободного аланина плазмы крови у добровольцев, в первой группе (таблица 2), до начала гипоксического воздействия составил 324,4 (307,5; 380,8) мкмоль/л, что статистически значимо не отличалось ($p>0,05$) от уровня свободного аланина плазмы у добровольцев из референтной группы – 323,9 (261,3; 402,4) мкмоль/л (таблица 2).

В гипоксическом периоде уровень свободного аланина не демонстрировал статистически значимых изменений ($p>0,05$, таблица 8). На 5-ой минуте гипоксии уровень свободного аланина в плазме крови добровольцев из первой группы составил 334,5 (331,2; 380,7) мкмоль/л; на 10-ой минуте – 332,4 (304,9; 346,9) мкмоль/л; на 20-ой минуте – 321,8 (294,0; 342,9) мкмоль/л; на 40-ой минуте – 309,1 (288,4; 327,5) мкмоль/л.

Таблица 8 – Динамика уровней свободного аланина в плазме крови добровольцев в первой группе (ГГС-9, 45 мин), мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	40 гип	10 вос	50 вос
Минимум	237,6	264,4	268,1	219,2	129,7	163,2*[#][°]	177,8
25%	307,5	331,2	304,9	294,0	288,4	184,1*[#][°]	250,8
Медиана	324,4	334,5	332,3	321,8	309,1	270,6*[#][°]	269,4
75%	380,8	380,7	346,9	342,9	327,5	301,3*[#][°]	342,1
Максимум	397,2	404,7	388,7	365,7	370,9	343,8*[#][°]	399,4

Примечание: * - различия с фоном значимы при $p < 0,05$; # - различия с 5-ой минутой гипоксии значимы при $p < 0,001$; ° - различия с 10-ой минутой гипоксии значимы при $p < 0,05$.

После прекращения гипоксического воздействия на 10-ой минуте восстановительного периода у добровольцев в первой группе уровень свободного аланина плазмы крови снизился до 270,6 (184,1; 301,4) мкмоль/л, что было статистически значимо ниже показателей свободного аланина плазмы в этой группе до начала гипоксического воздействия ($p=0,03$), на 5-ой и 10-ой минутах гипоксии ($p=0,00036$ и $p=0,013$, соответственно).

На 50-ой минуте восстановительного периода медианное значение уровня свободного аланина плазмы крови в первой группе осталось практически без изменений, но повышение пределов варьирования индивидуальных значений привело к исчезновению статистически значимых различий ($p > 0,05$); уровень свободного аланина у добровольцев в этот момент времени составил 269,4 (250,8; 342,1) мкмоль/л.

3.6. Динамика уровней свободного гистидина у добровольцев в первой группе

У добровольцев в первой группе (ГГС-9, 45 мин), уровень свободного гистидина плазмы крови до начала гипоксического воздействия составил 54,4 (51,3; 58,7) мкмоль/л, что значимо не отличалось ($p>0,05$) от соответствующего показателя у добровольцев из референтной группы – 63,2 (56,3; 70,7) мкмоль/л (таблица 2).

Таблица 9 – Динамика уровней свободного гистидина в плазме крови добровольцев в первой группе (ГГС-9, 45 мин), мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	40 гип	10 вос	50 вос
Минимум	37,2	49,5	44,9	19,8	41,4	30,3*	37,9
25%	51,3	52,5	51,0	48,7	47,6	38,9*	41,3
Медиана	54,4	55,2	57,2	51,8	50,5	48,3*	52,7
75%	58,7	65,6	62,1	61,7	59,5	50,8*	53,3
Максимум	63,9	70,1	65,0	63,0	69,5	59,8*	75,6

Примечание: * - различия с 5-ой минутой гипоксии значимы при $p<0,05$.

В гипоксическом периоде у добровольцев из первой группы не было выявлено статистически значимых изменений уровней свободного гистидина плазмы крови ($p>0,05$, таблица 9). На 5-ой минуте гипоксии данный показатель составил 55,2 (52,5; 61,5) мкмоль/л, на 10-ой – 57,2 (51,0; 62,1) мкмоль/л, на 20-ой – 51,8 (48,7; 61,7) мкмоль/л, на 40-ой минуте гипоксического периода – 50,5 (47,6; 59,5) мкмоль/л.

На 10-ой минуте восстановительного периода у добровольцев в первой группе было выявлено статистически значимое (по сравнению с уровнем на 5-ой минуте гипоксии) снижение уровня свободного гистидина плазмы крови: уровень свободного гистидина снизился до 48,3 (38,9; 50,8) мкмоль/л ($p=0,017$). К 50-ой минуте восстановительного периода уровень свободного гистидина плазмы в этой группе повысился до 52,7 (41,3; 53,3) мкмоль/л, что значимо не отличалось от уровней догипоксического, гипоксического и восстановительного периодов ($p>0,05$).

3.7. Динамика уровней свободных пролина, гидроксипролина и глицина у добровольцев во второй группе

У добровольцев во второй группе, участвовавших в гипоксическом тестировании натошак (ГГС-9, 25 мин) было выявлено статистически значимое повышение уровней свободного пролина, гидроксипролина и глицина плазмы крови в ответ на гипоксическое воздействие (таблица 10, таблица 11, таблица 12).

До начала гипоксического воздействия уровень свободного пролина плазмы крови у добровольцев из второй группы значимо не отличался ($p>0,05$) от уровня у добровольцев из референтной группы (таблица 2).

Таблица 10 – Динамика уровней свободного пролина в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	148,0	177,0	190,6*[#]	172,3*	176,0[@]	168,1[@]
25%	182,8	195,4	217,6*[#]	193,4*	208,1[@]	189,9[@]
Медиана	206,0	212,3	231,8*[#]	229,1*	226,1[@]	223,1[@]
75%	230,1	227,0	252,5*[#]	251,1*	234,3[@]	235,2[@]
Максимум	301,5	290,2	319,5*[#]	343,5*	317,0[@]	307,1[@]

Примечание: *- различия с фоном значимы при $p < 0,05$, # - различия с 5-ой минутой гипоксии значимы при $p < 0,05$, @ - различия с 10-ой минутой гипоксии значимы при $p < 0,05$.

В гипоксический период у добровольцев из второй группы отмечалось нарастание уровня свободного пролина плазмы крови по сравнению с величинами догипоксического периода (фон). На 5-ой минуте гипоксического периода (таблица 10) уровень свободного пролина несколько повысился по сравнению с догипоксическим периодом – до 212,3 (195,4; 227,0) мкмоль/л, что значимо не отличалось от фоновых значений – 206,0 (182,8; 230,1) мкмоль/л ($p > 0,05$). На 10-ой минуте гипоксии уровень свободного пролина плазмы увеличился до 231,8 (217,6; 252,5) мкмоль/л, что было значимо выше, чем до начала гипоксического воздействия ($p < 0,0001$) и на 5-ой минуте гипоксического периода ($p = 0,0002$). На 20-ой минуте гипоксии уровень свободного пролина плазмы крови у добровольцев во второй группе составил 229,1 (193,4; 251,1) мкмоль/л, что было значимо выше, чем уровень этой АК в догипоксическом периоде ($p = 0,008$).

В восстановительном периоде у добровольцев из второй группы наблюдалось снижение уровней свободного пролина плазмы крови по отношению к значениям, полученным на 10-ой и 20-ой минутах гипоксического периода. На 5-ой минуте восстановительного периода уровень свободного пролина плазмы крови статистически значимо снизился по сравнению с 10-ой минутой гипоксии ($p=0,013$) и составил 226,1 (208,1; 234,3) мкмоль/л. В то же время уровень свободного пролина в плазме на 5-ой минуте восстановительного периода значимо не отличался от значений догипоксического периода ($p>0,05$). На 15-ой минуте восстановительного периода наблюдалось дальнейшее снижение уровня свободного пролина плазмы до 223,1 (189,9; 235,2) мкмоль/л, что было статистически значимо ниже относительно 10-ой минуты гипоксического периода ($p=0,014$). При этом статистически значимых различий с уровнем пролина плазмы в догипоксическом периоде выявлено не было ($p>0,05$).

До начала гипоксии уровень свободного гидроксипролина плазмы крови у добровольцев во второй группе был 55,9 (40,8; 60,7) мкмоль/л. Этот показатель значимо не отличался ($p>0,05$) от значений референтной группы: 58,9 (49,7; 64,9) мкмоль/л (таблица 2).

Таблица 11 – Динамика уровней свободного гидроксипролина в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	28,2	29,6	35,9*	25,3	30,6	31,6
25%	40,8	48,9	54,3*	46,3	49,0	50,9
Медиана	55,9	55,5	59,5*	54,0	55,1	55,9
75%	60,7	69,2	63,1*	63,5	57,6	61,6
Максимум	121,8	73,9	74,3*	81,8	74,6	71,3

Примечание: * - различия с фоном значимы при $p < 0,05$.

Уровень свободного гидроксипролина на 5-ой минуте гипоксии практически не изменился по сравнению с догипоксическим периодом и составил 55,5 (48,9; 69,2) мкмоль/л ($p > 0,05$, таблица 11). На 10-ой минуте после начала гипоксического воздействия уровень свободного гидроксипролина плазмы у добровольцев из второй группы значительно увеличился по сравнению с фоном, составив 59,5 (54,3; 63,1) мкмоль/л ($p = 0,023$). К 20-ой минуте гипоксического периода уровень свободного гидроксипролина снизился до 54,0 (46,3; 63,5) мкмоль/л, что статистически значимых различий со значениями догипоксического и гипоксического периодов ($p > 0,05$).

В восстановительном периоде на 5-ой минуте уровень свободного гидроксипролина у добровольцев из второй группы составил 55,1 (49,0; 57,6) мкмоль/л, что достоверно не отличалось от значений догипоксического и гипоксического периодов ($p > 0,05$). На 15-ой минуте восстановительного периода уровень свободного гидроксипролина увеличился, составив 55,9 (50,9; 61,6) мкмоль/л, но статистически значимых различий с уровнями

гидроксипролина, полученными в догипоксическом, гипоксическом и восстановительном периодах, не наблюдалось ($p>0,05$).

Таблица 12 – Динамика уровней свободного глицина в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	174,6	183,8	212,9*	179,1	184,9	187,0
25%	206,1	198,6	224,3*	199,5	217,0	209,2
Медиана	226,6	222,9	246,7*	253,2	249,9	238,4
75%	273,9	246,0	269,4*	267,7	255,3	251,5
Максимум	309,3	322,8	343,4*	360,2	327,0	303,5

Примечание: * - различия с 5-й минутой гипоксии значимы при $p<0,05$.

До начала гипоксического воздействия (таблица 2) показатели свободного глицина плазмы во второй группе (226,6 (206,1; 273,9) мкмоль/л) значимо не отличались ($p>0,05$) от показателей референтной группы (236,3 (217,6; 274,5) мкмоль/л). На 5-й минуте гипоксии отмечалось незначительное снижение уровней свободного глицина: 222,9 (198,6; 246,0) мкмоль/л против 226,6 (206,1; 273,9) мкмоль/л до начала гипоксии (таблица 12).

На 10-й минуте гипоксического периода уровень свободного глицина плазмы значимо повысился по сравнению с 5-й минутой до 246,7(224,3; 269,4) мкмоль/л ($p=0,04$). На 20-й минуте медианный показатель свободного глицина плазмы крови был ещё выше – 253,2 (199,5; 267,7) мкмоль/л – но расширение пределов варьирования показателя привело к исчезновению значимости различий ($p>0,05$).

В восстановительном периоде уровни свободного глицина плазмы во второй снижались по сравнению с концом гипоксического периода: 249,9

(217,0; 255,3) мкмоль/л на 5-й минуте восстановления и 238,4 (209,2; 251,5) мкмоль/л на 15-й минуте, но эти изменения не были статистически значимы ($p>0,05$).

3.8. Динамика уровней свободных фенилаланина и тирозина плазмы крови добровольцев во второй группе

Согласно полученным результатам уровень свободного фенилаланина плазмы крови у добровольцев во второй группе до начала гипоксии составил 41,0 (44,5; 47,2) мкмоль/л (см. таблица 2), что значимо не отличалось от показателей у добровольцев из референтной группы – 44,8 (42,0; 48,7) мкмоль/л ($p>0,05$).

Таблица 13 – Динамика уровней свободного фенилаланина в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	34,2	33,4	39,8*[#]	40,4*[#]	34,7	35,0^{@%}
25%	41,0	35,0	45,9*[#]	45,9*[#]	45,3	41,6^{@%}
Медиана	44,5	46,2	47,2*[#]	50,0*[#]	46,8	45,5^{@%}
75%	47,2	47,8	50,5*[#]	55,3*[#]	51,1	52,3^{@%}
Максимум	57,1	55,1	59,4*[#]	60,0*[#]	55,0	53,4^{@%}

Примечание: *- различия с фоном значимы при $p<0,05$, # - различия с 5-ой минутой гипоксии значимы при $p<0,05$, @ - различия с 10-ой минутой гипоксии значимы при $p<0,05$, % - различия с 20-й минутой гипоксии значимы при $p<0,05$.

В гипоксическом периоде на 5-ой минуте уровень свободного фенилаланина плазмы крови (таблица 13) не демонстрировал статистически значимых изменений по сравнению с догипоксическим периодом и составил 46,2 (35,0; 47,8) мкмоль/л по сравнению с 44,5 (41,0; 47,2) мкмоль/л ($p > 0,05$).

Затем на 10-ой минуте гипоксии уровень свободного фенилаланина плазмы крови во второй группе повысился до 47,2 (45,9; 50,5) мкмоль/л, что было значимо выше показателей фона ($p = 0,018$) и 5-ой минуты гипоксии ($p = 0,0006$).

На 20-ой минуте гипоксического периода у добровольцев во второй группе наблюдалось дальнейшее повышение уровней свободного фенилаланина плазмы крови до 50,0 (45,9; 55,3) мкмоль/л, что было статистически значимо выше по сравнению с величинами фонового периода и 5-ой минуты гипоксии ($p = 0,005$ и $p = 0,0003$, соответственно).

В восстановительном периоде на 5-ой минуте не было обнаружено статистически значимых различий с показателями фонового и гипоксического периодов ($p > 0,05$), уровень свободного фенилаланина составил 46,8 (45,3; 51,1) мкмоль/л. На 15-й минуте восстановления показатель свободного фенилаланина снизился до 45,5 (41,6; 52,3) мкмоль/л, что было значимо ниже показателей на 10-й ($p = 0,002$) и 20-й ($p = 0,0006$) минутах гипоксии.

Уровень свободного тирозина плазмы крови во второй группе до начала гипоксии – 48,6 (38,8; 56,8) мкмоль/л – значимо не отличался от показателей в референтной группе – 49,3 (39,7; 62,6) мкмоль/л ($p > 0,05$)(таблица 2).

Таблица 14 – Динамика уровней свободного тирозина в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	32,0	31,9	33,2*	33,5	30,9	31,1
25%	38,8	37,6	44,7*	42,5	42,8	39,2
Медиана	47,9	49,2	49,6*	47,4	50,2	51,3
75%	56,8	57,2	58,8*	56,4	57,3	57,5
Максимум	71,9	63,7	67,9*	68,7	64,3	64,4

Примечание: * - различия с 5-й минутой гипоксии значимы при $p < 0,05$.

В гипоксическом периоде (таблица 14) на 5-й минуте показатель свободного тирозина незначительно повысился до 49,2 (37,6; 57,2) мкмоль/л ($p > 0,05$). На 10-й минуте было выявлено статистически значимое повышение уровня свободного тирозина до 49,6 (44,7; 58,8) мкмоль/л по сравнению с 5-й минутой гипоксии ($p = 0,017$). На 20-й минуте гипоксии уровень свободного тирозина несколько снизился до 47,4 (42,5; 56,4) мкмоль/л и значимо не отличался от показателей фона и гипоксического периода ($p > 0,05$).

На 5-й минуте восстановления уровень свободного тирозина составил 50,2 (42,8; 57,3) мкмоль/л и значимо не отличался от показателей фона и гипоксического периода ($p > 0,05$). На 15-й минуте уровень свободного фенилаланина во второй группе был 51,3 (39,2; 57,5) мкмоль/л, что значимо не отличалось от показателей в других точках забора крови ($p > 0,05$).

3.9. Динамика уровней свободной глутаминовой кислоты у добровольцев во второй группе

Фоновый уровень глутаминовой кислоты в группе добровольцев во второй группе (таблица 2), составил 54,3 мкмоль/л (36,3; 76,8), и достоверно не отличался от уровня, полученного при обследовании добровольцев в референтной группе – 60,9 (40,1; 79,3) мкмоль/л ($p>0,05$).

Таблица 15 – Динамика уровней свободной глутаминовой кислоты в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	21,6	26,8	24,5	19,0	27,4 [@]	42,3*
25%	35,2	36,9	49,0	35,1	58,8 [@]	64,7*
Медиана	53,8	51,2	68,7	61,9	74,4 [@]	87,1*
75%	76,8	56,9	72,6	66,7	81,8 [@]	101,2*
Максимум	132,6	131,2	130,9	119,3	156,0 [@]	144,2*

Примечание: * - различия с догипоксическим (фон) и гипоксическим (5-ой, 10-ой и 20-ой минутами гипоксии) периодами значимы при $p<0,05$; @ - различия с 5-ой и 20-ой минутами гипоксического периода значимы при $p<0,05$.

В течение всего гипоксического периода уровни свободной глутаминовой кислоты плазмы крови у добровольцев во второй группе значимо не отличались от уровня догипоксического периода ($p>0,05$). Гипоксическое воздействие (таблица 15) привело к некоторому снижению содержания свободной глутаминовой кислоты в плазме на 5-ой минуте

гипоксического воздействия до 51,2 (36,9; 56,9) мкмоль/л ($p>0,05$). На 10-ой минуте тестирования уровень свободной глутаминовой кислоты у добровольцев из второй группы незначимо увеличился по сравнению с 5-ой минутой гипоксии до 68,7 (49,0; 72,6) мкмоль/л ($p>0,05$). На 20-ой минуте гипоксии уровень свободной глутаминовой кислоты плазмы крови снизился по сравнению с 10-ой минутой гипоксии до 61,9 (35,1; 66,7) мкмоль/л ($p>0,05$).

В восстановительном периоде у добровольцев во второй группе отмечалось нарастание уровней свободной глутаминовой кислоты в плазме крови. На 5-ой минуте после прекращения гипоксического воздействия уровень свободной глутаминовой кислоты составил 74,4 (58,8; 81,8) мкмоль/л, что было значимо выше уровней свободной глутаминовой кислоты плазмы на 5-ой и на 20-ой минутах гипоксического периода ($p=0,0024$ и $p=0,0041$, соответственно). На 15-ой минуте восстановительного периода уровень свободной глутаминовой кислоты плазмы крови во второй группе достиг максимальных значений за весь период наблюдения – 87,1 (64,7; 101,2) мкмоль/л. Достигнутые уровни были статистически значимо выше значений догипоксического периода ($p=0,005$) и значений, полученных на 5-ой ($p<0,0001$), 10-ой ($p=0,023$) и 20-ой минутах гипоксического периода ($p<0,0001$).

3.10. Динамика уровней свободного метионина у добровольцев в первой и второй группах

В первой группе уровень свободного метионина плазмы крови добровольцев до начала гипоксического исследования (фон) был 17,5 (14,6; 21,3) мкмоль/л, что значимо не отличалось от показателей референтной группы 20,9 (18,3; 24,8) ($p>0,05$) (таблица 2).

Таблица 16 – Динамика уровней свободного метионина в плазме крови добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	40 гип	10 вос	50 вос
Минимум	12,9	12,6	13,1	14,1	15,5	10,1*	13,6
25%	14,7	16,9	17,2	16,2	17,2	11,5*	15,4
Медиана	17,5	18,9	20,5	16,5	19,6	14,9*	16,1
75%	21,4табл	19,5	21,7	18,3	23,3	17,1*	17,6
Максимум	28,0	33,4	25,5	26,5	29,8	18,9*	33,1

Примечание: * – различия с 10-й и 40-й минутами гипоксического периода значимы при $p < 0,05$.

В гипоксическом периоде уровень свободного метионина плазмы значимо не изменялся по сравнению с показателями фона ($p > 0,05$) (таблица 16). На 5-й минуте наблюдалось повышение до 18,9 (16,9; 19,5) мкмоль/л, на 10-й минуте уровень метионина повысился ещё сильнее – до 20,5 (17,2; 21,7) мкмоль/л. На 20-й минуте гипоксии было выявлено снижение до 16,5 (16,2; 18,3) мкмоль/л, сменившееся повышением на 40-й минуте до 19,6 (17,2; 23,3) мкмоль/л.

В восстановительном периоде на 10-й минуте уровень свободного метионина плазмы крови добровольцев в первой группе снизился до 14,9 (11,5; 17,1) мкмоль/л, что было статистически значимо ниже, чем показатели этой АК на 10-й ($p = 0,047$) и на 40-й минутах гипоксии ($p = 0,031$). К 50-й минуте восстановления показатель свободного метионина повысился до 16,1 (15,4; 17,6) мкмоль/л, что значимо не отличалось от показателей фона, гипоксического и восстановительного периодов ($p > 0,05$).

Уровень свободного метионина плазмы крови у добровольцев, участвовавших в исследовании натошак (вторая группа), до начала гипоксического эксперимента составил 20,7 (17,5; 23,4) мкмоль/л и не демонстрировал статистически значимых с уровнем референтной группы – 20,9 (18,3; 24,8) мкмоль/л ($p>0,05$) (таблица 2).

Таблица 17 – Динамика уровней свободного метионина в плазме крови добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Время забора крови, мин	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
Минимум	13.6	13.3	13.2	12.9	12.3	12.9*
25%	17.5	17.6	20.7	18.1	19.4	18.2*
Медиана	20.1	19.2	21.1	19.4	20.8	19.4*
75%	23.4	22.6	22.5	21.5	22.3	20.8*
Максимум	25.9	25.8	25.8	26.5	23.6	23.1*

Примечание: * - различия с 10-ой минутой гипоксического периода статистически значимы при $p<0,05$.

При гипоксическом воздействии и в восстановительном периоде (таблица 17) не было выявлено статистически значимых по сравнению с догипоксическим периодом изменений уровня свободного метионина ($p>0,05$). На 5-ой минуте гипоксии уровень свободного метионина плазмы крови добровольцев снизился до 19,2 (17,6; 22,6) мкмоль/л ($p>0,05$). На 10-ой минуте гипоксии уровень свободного метионина плазмы крови добровольцев из второй группы повысился до 21,1 (20,7; 22,5) мкмоль/л, что значимо не отличалось от уровней фонового периода и 5-ой минуты гипоксии ($p>0,05$). На 20-ой минуте гипоксии уровень свободного метионина плазмы крови

составил 19,4 (18,1; 21,5) мкмоль/л, что также значимо не отличалось от уровней свободного метионина в фоновом и гипоксическом периодах ($p>0,05$).

На 5-ой минуте восстановительного периода у добровольцев во второй группе не было выявлено статистически значимых изменений уровня свободного метионина плазмы крови по сравнению с догипоксическим и гипоксическим периодами ($p>0,05$). Уровень свободного метионина плазмы на 5-ой минуте восстановительного периода составил 20,8 (19,4; 22,3) мкмоль/л.

В то же время на 15-ой минуте восстановительного периода уровень свободного метионина плазмы крови у добровольцев во второй группе снизился до 19,4 (18,2; 20,8) мкмоль/л, что было значимо ниже, чем на 10-ой минуте гипоксии ($p=0,024$). Статистически значимых различий с догипоксическим периодом, 5-ой и 20-ой минутами гипоксического и 5-ой минутой восстановительного периода не наблюдалось ($p>0,05$).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздействие острой нормобарической гипоксии приводит к изменению физиологических и биохимических показателей гомеостаза, что было показано во множестве исследований, включая наши предыдущие работы (Бойко и др., 2010; Голубев и др., 2019; Bilo et al., 2019). Также было продемонстрировано, что острая гипоксия влияет на обмен АК у лабораторных животных и испытуемых добровольцев, что отражается в изменении содержания свободных АК в крови (Albekairi, 1989; Bailey et al., 2000; Muratsubaki, Yamaki, 2011). Однако, в значительной части подобных работ, выполненных на человеке, использовалась модель высотной гипоксии (Castell et al., 2010; Liao et al., 2016). Такая модель, как уже говорилось, имеет свои несомненные преимущества, но также и недостатки.

Так, помимо «чистой» гипоксической компоненты воздействия, физиологический и биохимический ответ на высотную гипоксию определяется и другими факторами: сниженным барометрическим давлением, влажностью, температурой воздуха. Взаимодействия и эффекты всех этих компонент высотной гипоксии сложны, и могут затруднять анализ получаемых экспериментальных данных (DiPasquale et al., 2015). По этой причине, а также поскольку нормобарическая модель создаёт меньшие риски для здоровья добровольцев (Varis et al., 2019), мы сделали свой выбор именно в её пользу.

Изучение характера и механизмов вызванных гипоксией изменений важно для понимания патологического действия гипоксии на работу органов и систем человека, а также прогностической оценки предела интенсивности гипоксического воздействия, допустимого в ситуациях, связанных с профессиональной деятельностью в авиации, космонавтике и других особых профессиональных сферах. Кроме того, понимание метаболического

обеспечения адаптации организма человека к воздействию экзогенной гипоксии, а также возможных пределов этой адаптации, способно принести большую практическую пользу при научном обосновании подготовки специальных профессиональных контингентов, которые по характеру своей работы вынуждены сталкиваться с экзогенной гипоксией. В потенциале создание достаточно полной и подробной картины ответа человеческого организма на воздействие такого универсального патологического фактора, как гипоксия, открывает дорогу к разработке новых методик и способов восстановления после гипоксии.

4.1. Общая характеристика выявленных в ходе гипоксического тестирования изменений уровней свободных АК плазмы крови.

В рамках данной работы была изучена динамика уровней свободных АК плазмы крови добровольцев, участвовавших в двух сериях исследований с острой нормобарической гипоксией (дыхание гипоксической газовой смесью, содержащей 9% кислорода – ГГС-9). Испытуемые из первой группы подвергались воздействию гипоксии после лёгкого низкожирового завтрака (ГГС-9, 45 мин), в то время как добровольцы во второй группе проходили гипоксическое тестирование натощак (ГГС-9, 25 мин, см. главу 2).

Нами не было выявлено статистически значимых различий между уровнями свободных АК плазмы у добровольцев из референтной группы и фоновыми уровнями свободных АК группы добровольцев в первой и второй группах, участвовавших в гипоксическом тестировании ($p > 0,05$). Сравнение динамики уровней свободных АК плазмы крови в первые 20 минут гипоксического воздействия позволило выявить различия в динамике ряда АК. На 10-й минуте гипоксического воздействия наблюдались значимые различия по уровням свободных глутамина, серина, треонина и гистидина плазмы крови между первой и второй группами добровольцев.

При анализе полученных данных у добровольцев из первой группы в восстановительном периоде были выявлены значимые, по сравнению с гипоксическим периодом, изменения содержания ряда свободных АК крови: глутамина, аланина и гистидина.

У добровольцев из второй группы в гипоксическом и восстановительном периодах были выявлены значимые, по сравнению с догипоксическим периодом, изменения уровней ряда свободных АК плазмы крови: пролина, гидроксипролина, глицина, фенилаланина, тирозина, глутаминовой кислоты.

В обеих группах добровольцев в восстановительном периоде после острой гипоксии наблюдались значимые изменения уровней свободного метионина плазмы крови.

4.2. Сравнение динамики уровней свободных АК плазмы крови в обеих группах добровольцев в первые 20 минут гипоксического тестирования.

При анализе данных полученных в обеих группах, были выявлены значимые межгрупповые различия уровней ряда АК (рисунок 5).

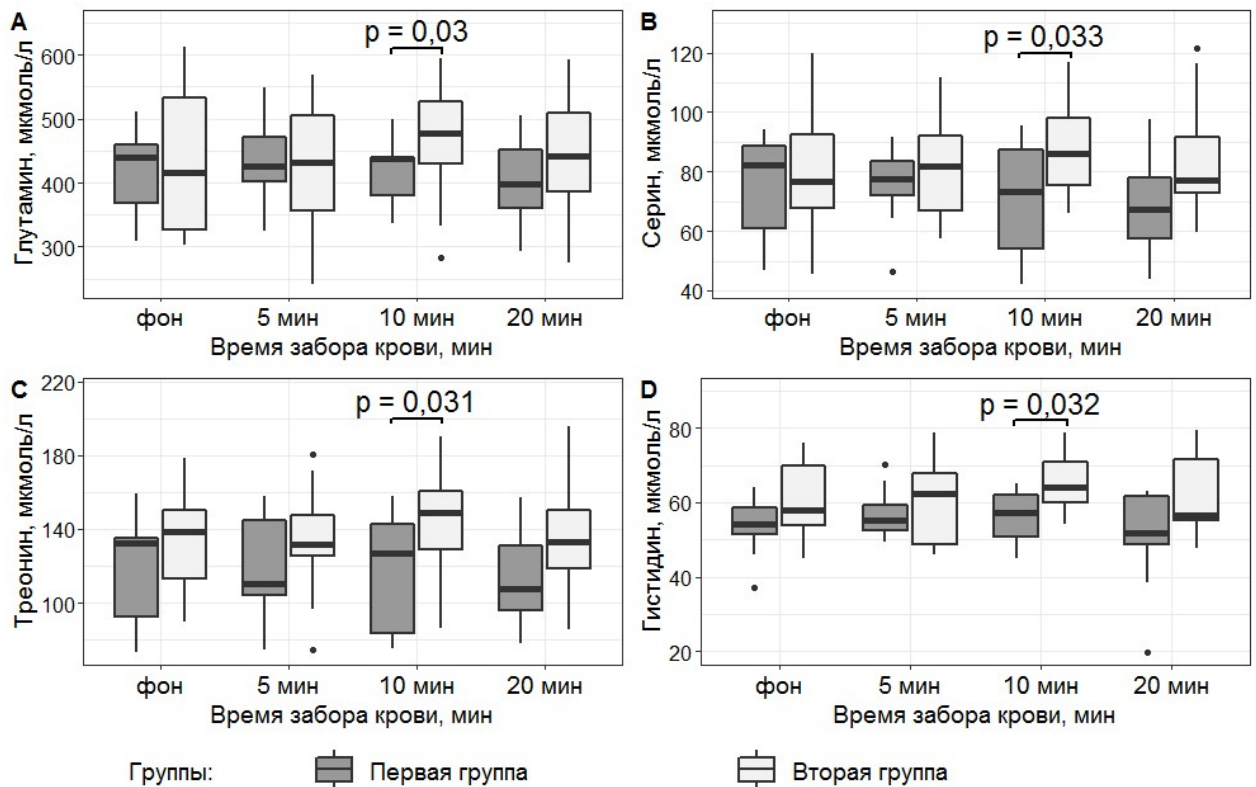


Рисунок 5 – Различия в динамике свободных глутамина, серина, треонина и гистидина между первой и второй группами добровольцев в первые 20 минут гипоксического исследования. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии. Значимость различий согласно критерия Баумгартнера-Вайса-Шиндлера.

Данные литературы свидетельствуют, что системный гомеостаз по АК в организме человека достаточно жёстко регулируется, даже в условиях недостаточного поступления белка (Synober, 2002; Bröer, Bröer, 2017). Это утверждение подтверждается тем, что кратковременное голодание не ведёт к снижению уровней отдельных АК в плазме, и даже длительное голодание вызывает достаточно умеренные изменения профиля АК плазмы (Felig et al., 1969). Вместе с тем нет единого мнения относительно влияния приема пищи на содержание свободных АК плазмы крови у человека; ряд исследователей

считают, что только при высокобелковой диете обнаруживается их значимое постпрандиальное повышение (Milsom et al., 1979).

Можно говорить о высокой эффективности гомеостаза АК в человеческом организме. Такой эффективный контроль требует наличия взаимосвязанных и взаимозависимых процессов, включающих всасывание поступивших извне АК в ЖКТ, синтез АК *de novo* в тканях организма, высвобождение АК при деградации внутри- и внеклеточных белков, обмен АК между цитоплазмой и межклеточной жидкостью, плазмой крови с помощью специфических белков-переносчиков.

В проведённом исследовании две группы добровольцев подвергались гипоксическому воздействию либо после лёгкого низкожирового завтрака (первая группа), либо с утра натощак (вторая группа). Известно, что при ограничении поступления АК в организм внутриклеточная концентрация незаменимых АК, особенно метионина и АКРЦ, повышается (Millward et al., 1974). Такие изменения объясняют двумя механизмами: активацией высвобождения этих АК из внутриклеточных белков в результате аутофагии и увеличением их транспорта в клетки извне (Mizushima, 2010).

Согласно полученным результатам, между группами не наблюдалось различий по показателям большинства АК, включая большую часть незаменимых АК, ни до гипоксии, ни в течение 20 минут гипоксического воздействия. Это говорит о том, что регуляторные механизмы в целом эффективно справляются с поддержанием гомеостаза АК даже на фоне острой гипоксии, несмотря на различия между первой и второй группами. Статистически значимые различия были выявлены только для четырёх АК: глутамина, серина, треонина и гистидина – и только на 10-й минуте гипоксии (рисунок 5). При этом изменения были сходны – уровни этих свободных АК плазмы были значимо выше во второй группе по сравнению с первой. Такая избирательность в отношении отдельных АК свидетельствует о наличии специфического механизма. Предположительно, наблюдаемая картина

объясняется различиями работы транспортных систем АК, осуществляющих перенос молекул АК через клеточную мембрану.

У человека имеется множество типов мембранных транспортёров АК, обладающих специфичностью в отношении переносимых АК (Scalise et al., 2018). Важную роль в системном гомеостазе АК играют универсально встречающиеся «гармонизирующие» транспортёры, ключевая функция которых – компенсация дисбалансов АК, возникающих в клетке при активном потреблении и недостаточном поступлении различных АК (Bröer, Bröer, 2017). Эти транспортные системы работают по принципу антипорта, то есть переносят молекулы определённых АК из внеклеточного пространства в цитоплазму в обмен на молекулы других АК, которые таким образом выводятся из клетки («обменные субстраты») (Scalise et al., 2018). Движущей силой этих антипортов являются градиенты концентрации АК-обменных субстратов, существующие между цитоплазмой и межклеточной жидкостью (уровни АК в цитоплазме значительно превышают уровни в плазме) (Bergstrom et al., 1974).

Четыре АК, уровни которых в представленной работе значимо различались между группами, являются такими обменными субстратами для важных «гармонизирующих» транспортёров: ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5) (рисунок 6).

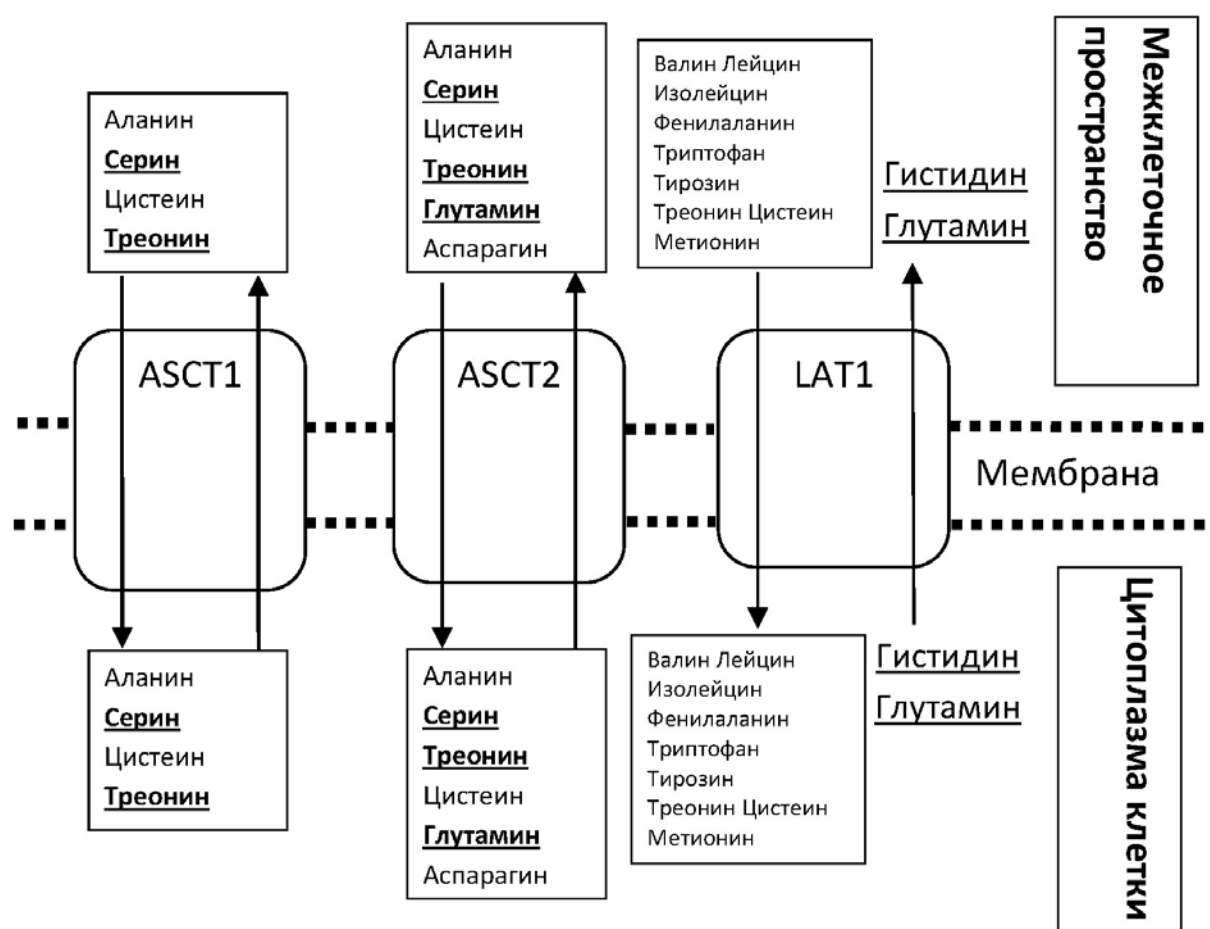


Рисунок 6 – «Гармонизирующие» мембранные транспортёры ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5) и переносимые ими аминокислоты.

Известно, что ASCT1 (SLC1A4) и ASCT2 (SLC1A5) транспортируют небольшие нейтральные АК, и могут использовать в качестве обменных субстратов заменимый серин и незаменимый треонин (Bröer, Bröer, 2017). Другой важный транспортёр, LAT1 (SC7A5), обеспечивает перенос большей части незаменимых АК – триптофана, фенилаланина, гистидина, лейцина, изолейцина, валина, метионина (а также тирозина) – внутрь клетки также по механизму антипорта (Scalise et al., 2018). При этом гистидин является одним из основных обменных субстратов для LAT1, и считается, что именно градиент по гистидину между цитоплазмой и межклеточной жидкостью

движет переносом других АК через мембрану при участии LAT1. Глутамин – АК, «объединяющая» транспортёры ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5), и способная выступать обменным субстратом в обеих системах. Таким образом, эта АК может обмениваться на незаменимые АК из межклеточной среды, если клетка испытывает потребность в них (Bhutia, Ganapathy, 2016).

Можно предположить, что причиной наблюдавшихся различий уровней четырёх АК на 10-й минуте гипоксии послужили различия в активности упомянутых переносчиков АК между двумя группами. В литературе внимание преимущественно уделяется регуляции экспрессии генов этих транспортных белков – ключевому регуляторному механизму, не способному, однако, обеспечить кратковременное изменение активности. В то же время имеются свидетельства наличия быстрой регуляции: для транспортёров семейства А был продемонстрирован рекрутинг транспортёров в мембраны (Ling et al., 2001), в том числе под действием таких гормонов, как инсулин (Hyde et al., 2002), и других прямых регуляторных механизмов (Menchini, Chaudhry, 2019). Для ASCT1, в частности, было показано быстрое изменение активности под действием лейкотриена D4 (Dickens et al., 2017). Большие пробелы остаются в понимании регуляции активности LAT1 (Scalise et al., 2018), но было показано, что изменение содержания холестерина в мембране влияет на работу этого переносчика (Dickens et al., 2017).

Таким образом, можно предположить, что выявленные на 10-й минуте гипоксического воздействия значимые различия по уровням четырёх свободных АК плазмы были обусловлены различиями в работе «гармонизирующих» мембранных транспортёров АК ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5). Для этих переносчиков серин, треонин, глутамин и гистидин являются обменными субстратами, обеспечивающими доставку других АК, в первую очередь незаменимых, в цитоплазму клетки. В первые 20 минут гипоксии различия между добровольцами в первой и второй

группах были только по алиментарному фактору: первая группа участвовала после лёгкого низкожирового завтрака, вторая – натощак. Поэтому мы полагаем, что алиментарный фактор и доступность нутриентов, поступающих из ЖКТ (не только АК) повлияли на срочную адаптивную перестройку обмена АК в ответ на гипоксию у добровольцев.

4.3. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного глутамина плазмы крови у добровольцев в первой группе

Выше уже были приведены и обсуждены результаты сравнения показателей свободных АК плазмы в двух экспериментальных группах добровольцев. Как было показано, уровень свободного глутамина плазмы в первой группе на 10-й минуте гипоксии (рисунок 5) был значимо ниже, чем во второй ($p = 0,03$). Помимо этого при оценке динамики свободного глутамина в первой группе нами было выявлено статистически значимое снижение уровней этой АК плазмы на 10-й минуте восстановительного периода по сравнению с показателями фона и 5-й минуты гипоксии ($p = 0,046$ в обоих случаях, рисунок 7).

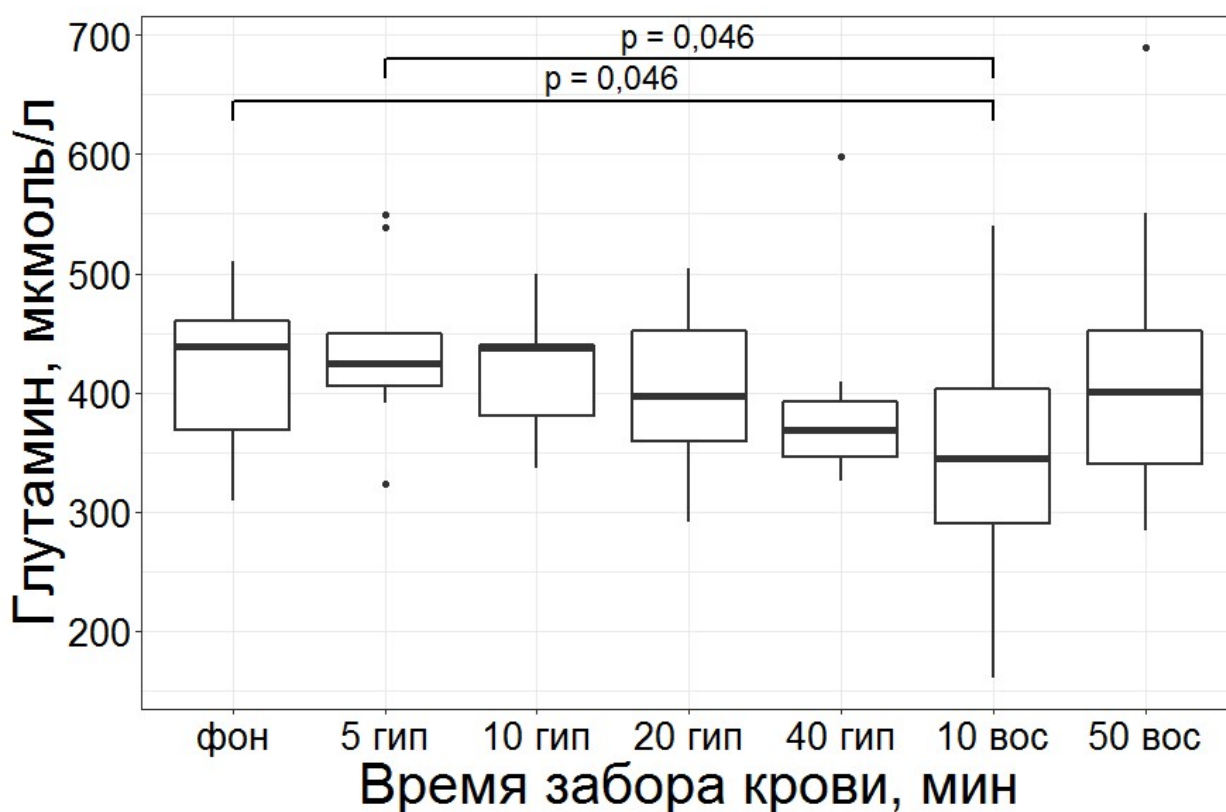


Рисунок 7 – Динамика уровней свободного глутамина плазмы крови у добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

О подобном феномене – снижении уровня свободного глутамина плазмы – уже сообщалось раньше. В экспериментах с высотной гипоксией у человека (Bailey et al., 2000) после гипоксического воздействия уровень свободного глутамина плазмы крови снижался. Однако сами авторы исследования в статье признают, что не могут привести механизм, который бы объяснял их наблюдения. Обращает на себя внимание тот факт, что падение уровня свободного глутамина у добровольцев в первой группе

произошло уже после восстановления дыхания атмосферным воздухом. В то же время во второй группе мы не наблюдали значимых изменений уровня свободного глутамина плазмы в динамике гипоксического исследования и в восстановительном периоде после него ($p > 0,05$, рисунок 9).

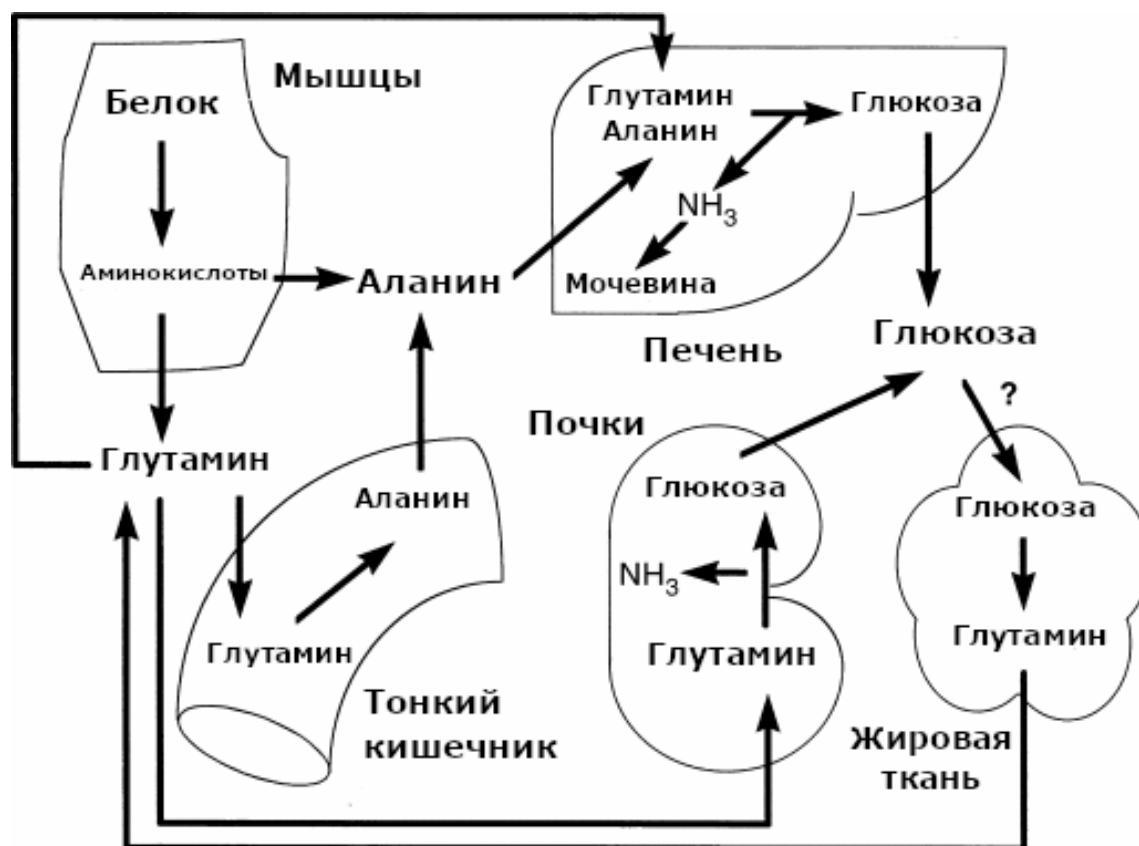


Рисунок 8 – Общая схема обмена глутамина в организме (по Stumvoll M. et al., 1999, с изменениями).

Падение уровня глутамина в плазме крови может быть следствием снижения поступления его из тканей или повышения его захвата тканями. Основными источниками поступления АК могут быть: ЖКТ (первая группа участвовала в исследовании после лёгкого низкожирового завтрака), распад белков тканей и синтез из других субстратов, преимущественно из глутаминовой кислоты (van de Poll et al., 2007; Haussinger, Sies, 2012). Основной тканью, синтезирующей глутамин, является скелетная мускулатура (Cynober, 2004; Haussinger, Sies, 2012). Основными

потребителями глутамина являются кишечник, иммунокомпетентные клетки и почки (рисунок 8). При этом для кишечника и иммунной системы глутамин – в первую очередь энергетический субстрат, а почки используют его преимущественно для регуляции кислотно-основного равновесия (Bhutia, Ganapathy, 2016).

В разделе 4.2. наблюдаемые значимые различия между группами по уровням свободного глутамина плазмы крови на 10-й минуте гипоксии были отнесены к эффектам изменений работы важных «гармонизирующих» транспортёров АК в цитоплазматических мембранах: ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5). В восстановительном периоде мы наблюдали значимое снижение на 10-й минуте восстановления в первой группе, в то время как во второй группе значимых изменений не наблюдалось ни на 5-й, ни на 15-й минутах (рисунок 9).

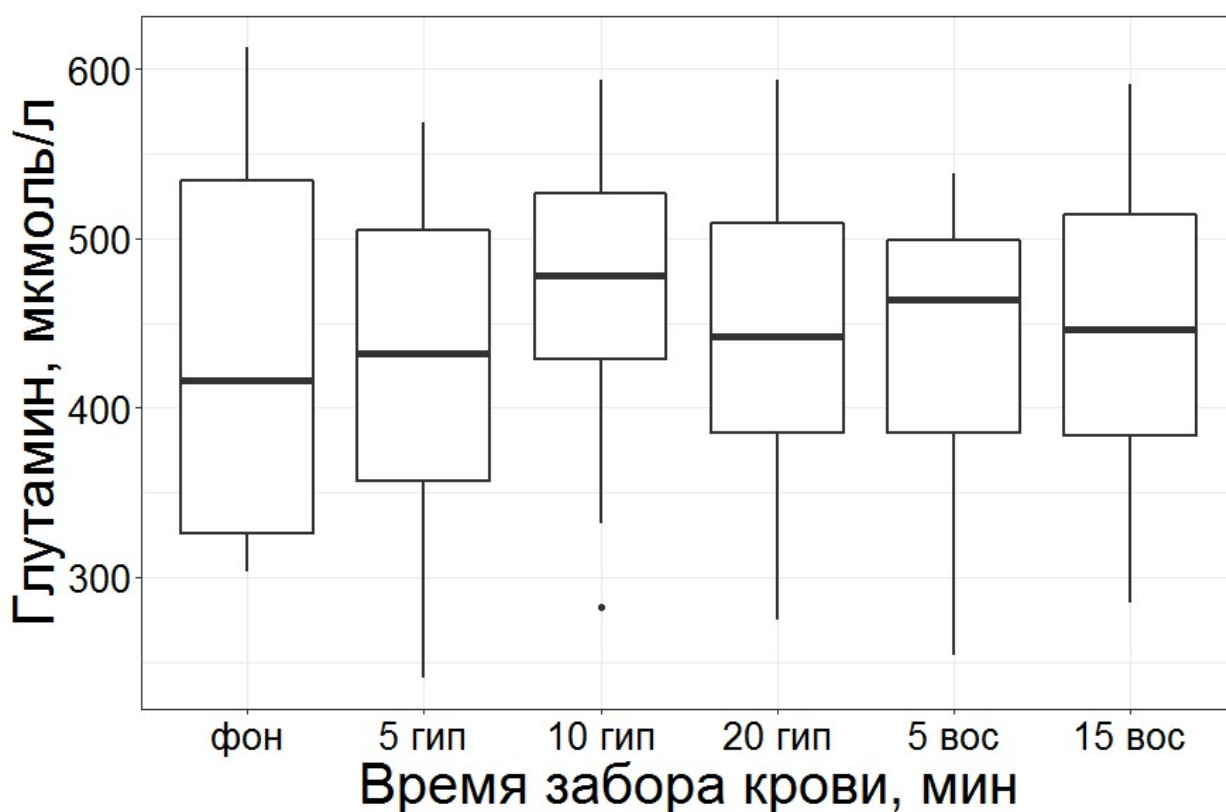


Рисунок 9 – Динамика уровней свободного глутамина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Транспортёры ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5) работают по механизму антипорта и используют АК как обменные субстраты. Глутамин – обменный субстрат двух из этих переносчиков: ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5) (Bhutia, Ganapathy, 2016; Scalise et al., 2018) (рисунок 6). Одним из механизмов, которые могут быть ответственны за снижение во второй группе уровней глутамина в плазме крови в восстановительный период является изменение активности транспортёров ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5), но в первую очередь - LAT1 (SC7A5). В

пользу гипотезы о снижении трафика АК именно через последний транспортёр может говорить выявленное значимое снижение уровня свободного гистидина плазмы крови в этой группе на 10-й минуте восстановительного периода (см. раздел 4.2.). В то же время не было выявлено значимых изменений уровней свободных серина и треонина плазмы крови в этом периоде, поэтому можно предположить, что изменения активности транспортёров ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) были незначительными.

Другим возможным механизмом наблюдаемых изменений уровня свободного глутамина плазмы во второй группе является повышение захвата глутамина тканями. Гипоксия подавляет синтетические процессы в клетках, включая синтез заменимых АК, к которым относится глутамин (Buttgereit, Brand, 1995; Solberg et al., 2010). В то же время значимый рост потребления глутамина мог быть обусловлен активацией его утилизации в ЖКТ после восстановления нормальной оксигенации тканей. С другой стороны почки активно расходуют глутамин при ацидозе (Bhutia, Ganapathy, 2016), но при гипоксии у добровольцев в первой группе наблюдался алкалоз (рисунок 10), вероятно, респираторного генеза (рисунок 11). Также можно предположить, что в отсутствии иммунных стимулов вклад потребления иммунокомпетентными клетками глутамина в его динамику был стабильным. В то же время, изменение потребления этой АК в ЖКТ могло быть тем самым фактором, обусловившим наблюдаемую динамику уровня глутамина у добровольцев в первой группе.

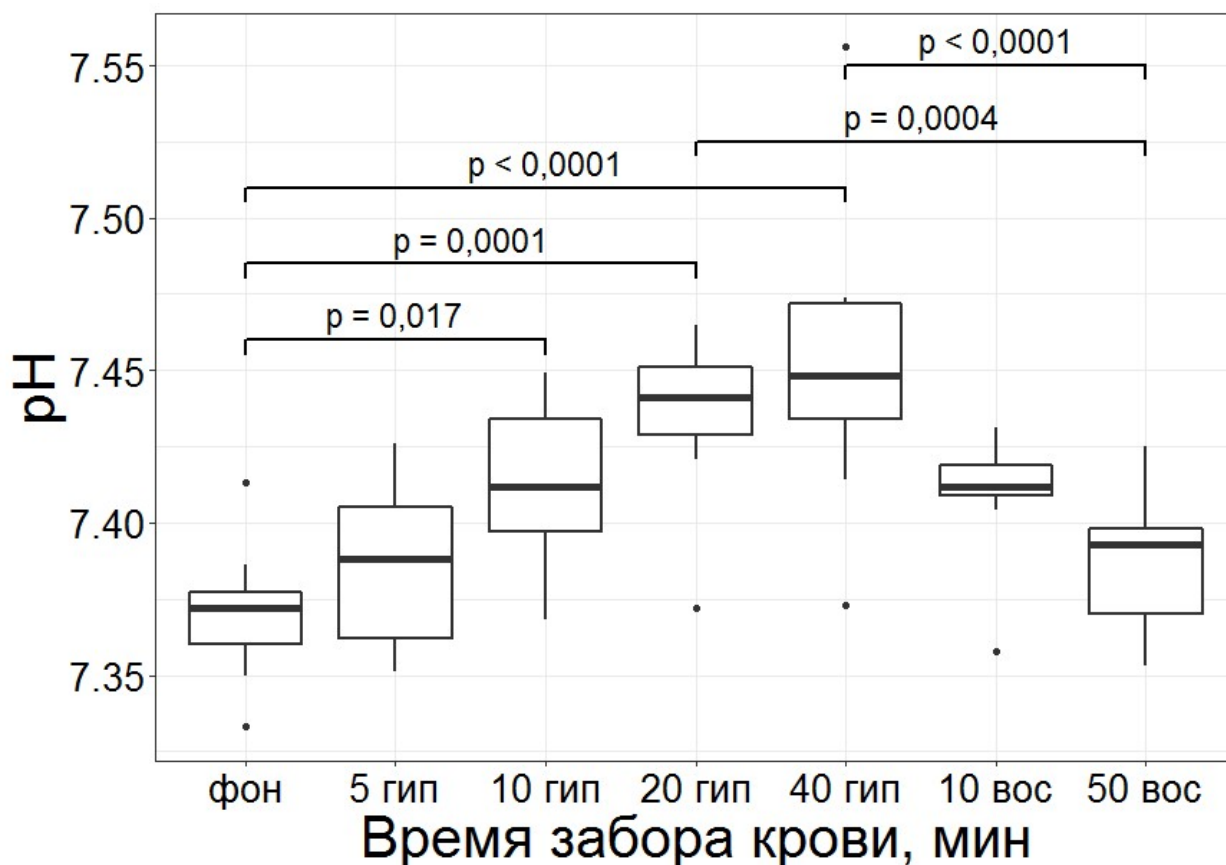


Рисунок 10 – Динамика значений pH плазмы крови у добровольцев в первой группе. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

На данном уровне работы не представляется возможным однозначно обосновать доминирующую роль какого-либо механизма. В литературе имеются свидетельства, что гипоксия снижает перфузию тканей ЖКТ (Zheng, L. et al., 2015), что глутамин обладает протективным действием в отношении клеток ЖКТ (Rao, Samak, 2012; Rajendram et al., 2014), что наличие разных изоформ глутаминазы (ключевого катаболического фермента глутамина) обуславливает специфику обмена и ролей, которые эта АК играет в разных тканях (Matés et al., 2013).

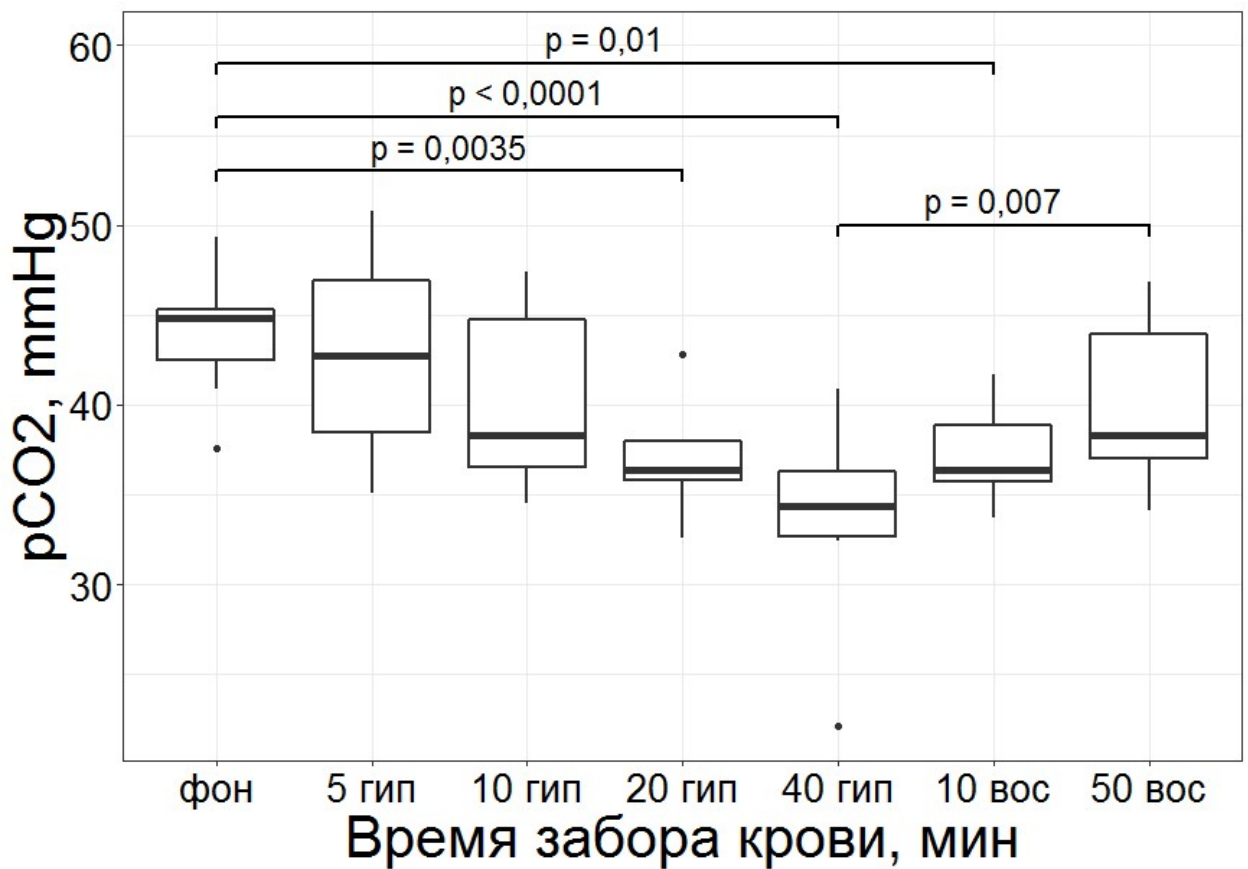


Рисунок 11 – Динамика значений парциального давления углекислого газа (pCO₂) венозной крови у добровольцев в первой группе, мм рт. ст. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Таким образом, можно заключить, что наблюдаемое снижение уровня глутамина плазмы на 10-й минуте восстановления у добровольцев второй группы могло быть вызвано, изолированно или в сочетании, как снижением активности АК транспортера LAT1 (SC7A5), так и увеличением утилизации циркулирующего глутамина тканями ЖКТ.

4.4. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного аланина плазмы крови у добровольцев в первой группе

Динамика уровня свободного аланина у добровольцев в первой группе (рисунок 12) была довольно схожа с динамикой уровня свободного глутамина. В то же время в первые 20 минут гипоксии не было выявлено значимых различий между двумя группами добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании, по уровням свободного аланина плазмы крови.

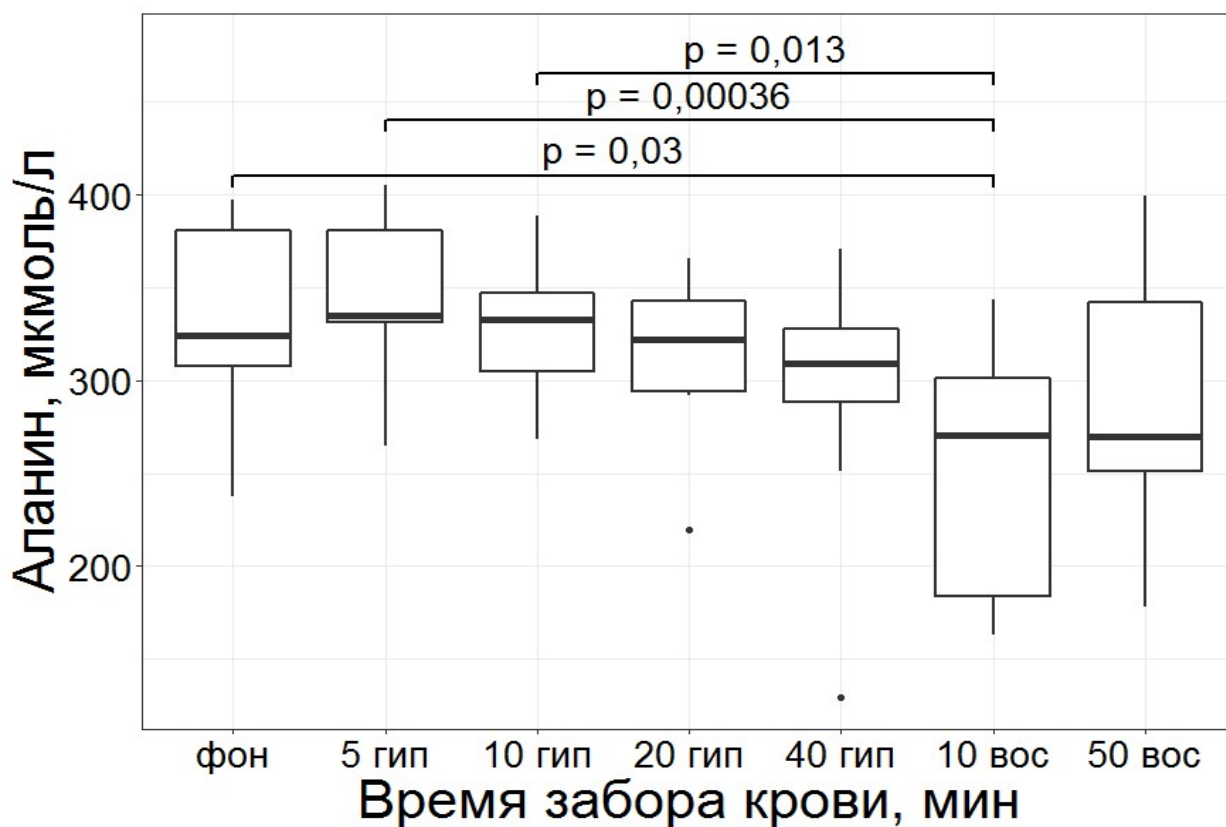


Рисунок 12 – Динамика уровней свободного аланина плазмы крови у добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Межорганный оборот аланина во многом сформирован работой глюкозо-аланинового челнока, который позволяет скелетным мышцам избавляться от аммиака, высвобождающегося при катаболизме аминокислот, а также снабжает субстратами глюконеогенез в печени (Schutz, 2011; McCommis et al., 2015). У человека существует другой похожий циклический метаболический путь – цикл Кори, в котором место аланина занимает лактат (Suhara et al., 2015). Эти два механизма создают поток субстратов из скелетных мышц в печень и из печени в скелетные мышцы (рисунок 13).



Рисунок 13 – Схема работы глюкозо-аланинового (справа) и глюкозо-лактатного (слева) челноков (по Oliynik S., Seikwan W, 2012, с изменениями).

В представленной работе динамика свободного аланина плазмы и лактата в первой группе заметно отличались друг от друга (рисунок 12, рисунок 14). Уровень свободного аланина в гипоксическом периоде демонстрировал тенденцию к снижению, а на 10-й минуте восстановительного периода достиг минимальных значений и был значимо ниже показателей фона ($p = 0,03$), 5-й минуты гипоксии ($p = 0,00036$) и 10-й

минуты гипоксии ($p = 0,013$). Уровни лактата у добровольцев из первой группы в гипоксическом периоде статистически значимо повышались ($p < 0,05$), достигая максимальных значений на 40-й минуте гипоксии и на 10-й минуте восстановления (рисунок 14).

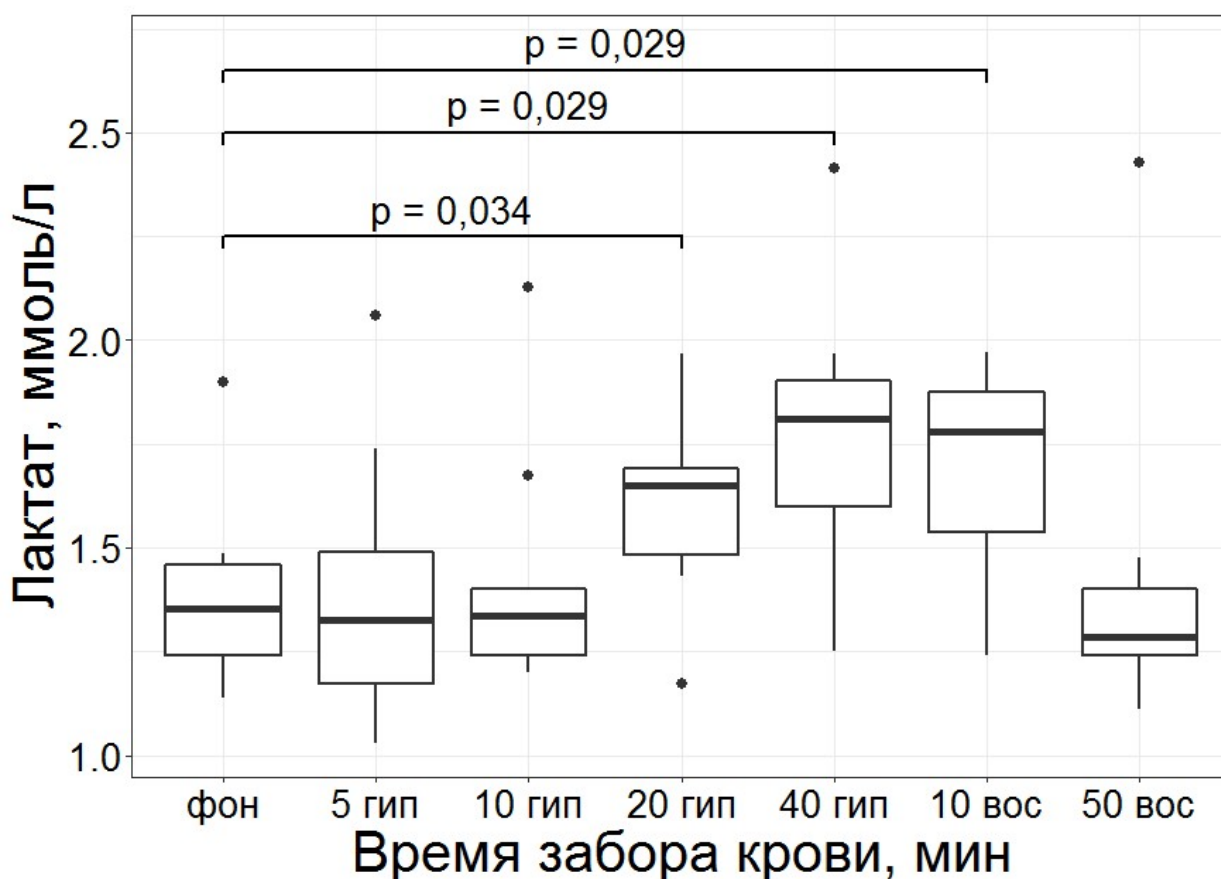


Рисунок 14 – Динамика уровней лактата плазмы крови у добровольцев в первой группе, ммоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Примечательно, что во второй группе не было выявлено значимых изменений уровня свободного аланина плазмы (рисунок 15).

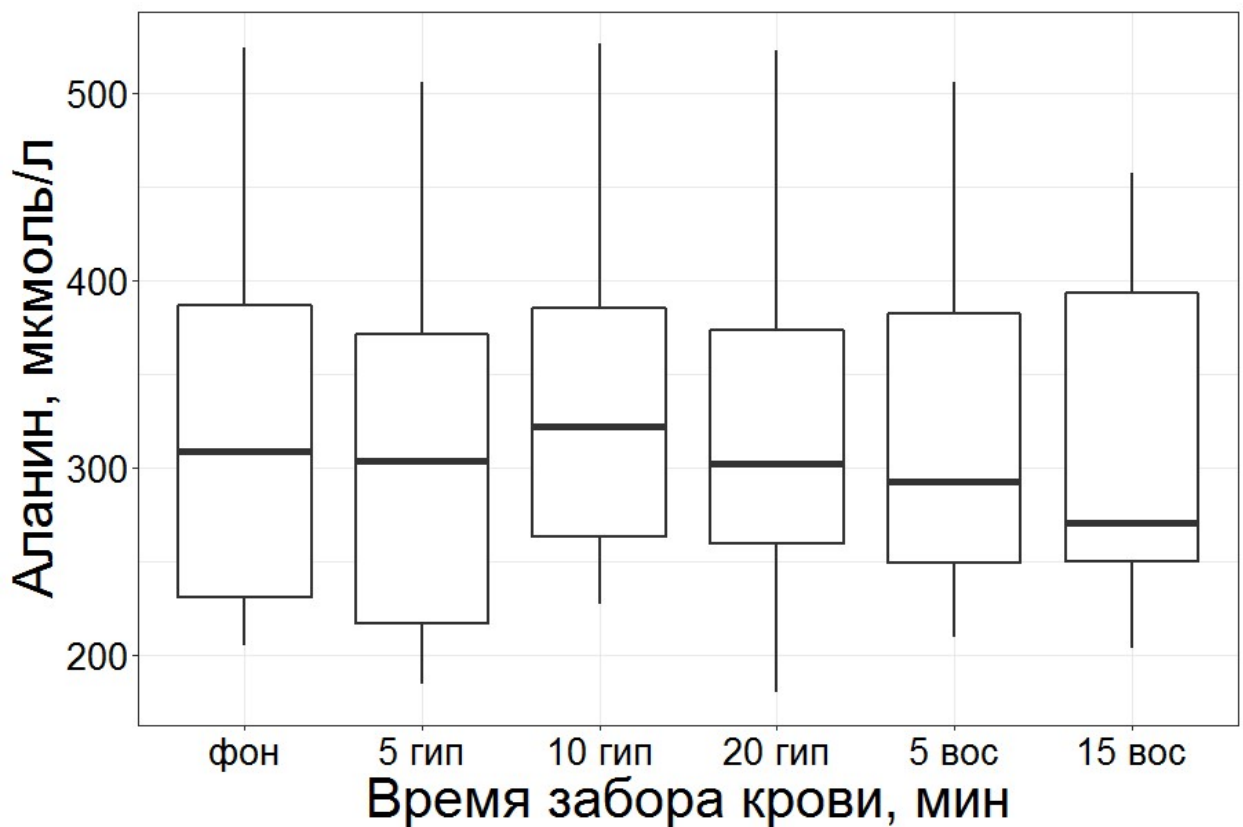


Рисунок 15 – Динамика уровней свободного аланина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

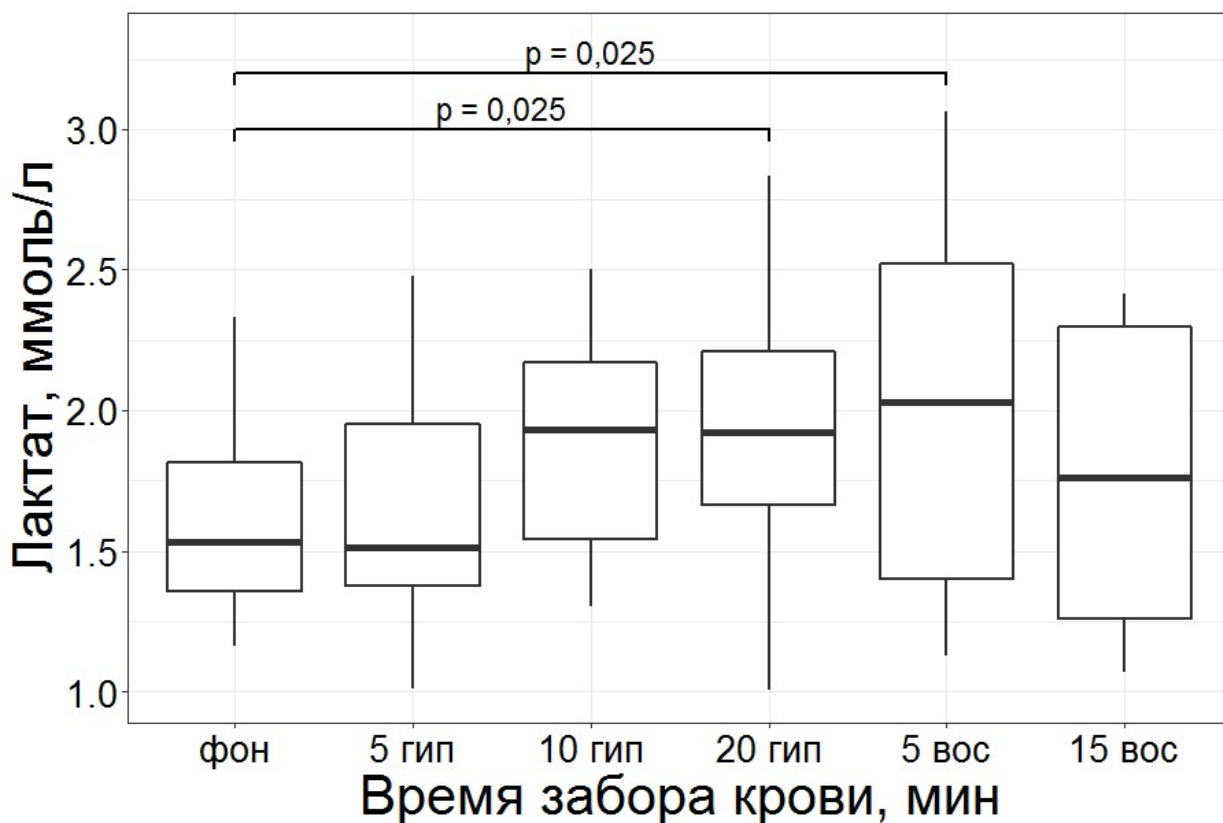


Рисунок 16 – Динамика уровней лактата плазмы крови у добровольцев во второй группе, ммоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

В то же время динамика уровней лактата плазмы во второй группе была довольно схожей с динамикой лактата в первой группе (рисунок 16). Следовательно, можно предположить, что взаимоотношения между глюкозо-аланиновым челноком и циклом Кори у добровольцев, участвовавших в гипоксическом тестировании, зависят от пищевого статуса участников (натошак и не натошак). Это подтверждается результатами корреляционного анализа этих показателей в двух группах (таблица 18, таблица 19).

Таблица 18 – Корреляции между показателями лактата и свободного аланина плазмы крови у добровольцев в первой группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	40 гип	10 вос	50 вос
R	0,334	0,571	0,413	0,140	-0,145	0,304	-0,073
p	0,381	0,109	0,269	0,719	0,711	0,427	0,852

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Таблица 19 – Корреляции между показателями лактата и свободного аланина плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
R	0.667	0.811	0.786	0.808	0.758	0.797
p	0.009	0.0004	0.0009	0.0005	0.002	0.0006

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Как следует из приведённых результатов статистического анализа, в первой группе отсутствовала статистически значимая корреляционная связь между этими величинами (таблица 18). В то же время во второй группе во всех точках наблюдения отмечалась значимая положительная корреляция средней и большой силы (таблица 19).

Таким образом, можно предположить, что значимое снижение уровней аланина плазмы крови в первой группе на 10-й минуте восстановительного периода могло быть связано либо со снижением активности глюкозо-аланинового челнока, либо с увеличением захвата свободного аланина гепатоцитами. Оба механизма могут отражать различия в срочной метаболической адаптации к воздействию гипоксии, связанные с пищевым фактором, поскольку первая группа участвовала в гипоксическом исследовании после лёгкого низкожирового завтрака, а вторая – натощак.

4.5. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного гистидина плазмы крови у добровольцев в первой группе

Динамика уровней свободного гистидина у добровольцев из первой группы (рисунок 17) была схожа с динамикой глутамина и аланина: значимое снижение уровня на 10-ой минуте восстановительного периода по сравнению с 5-й минутой гипоксии ($p = 0,017$).

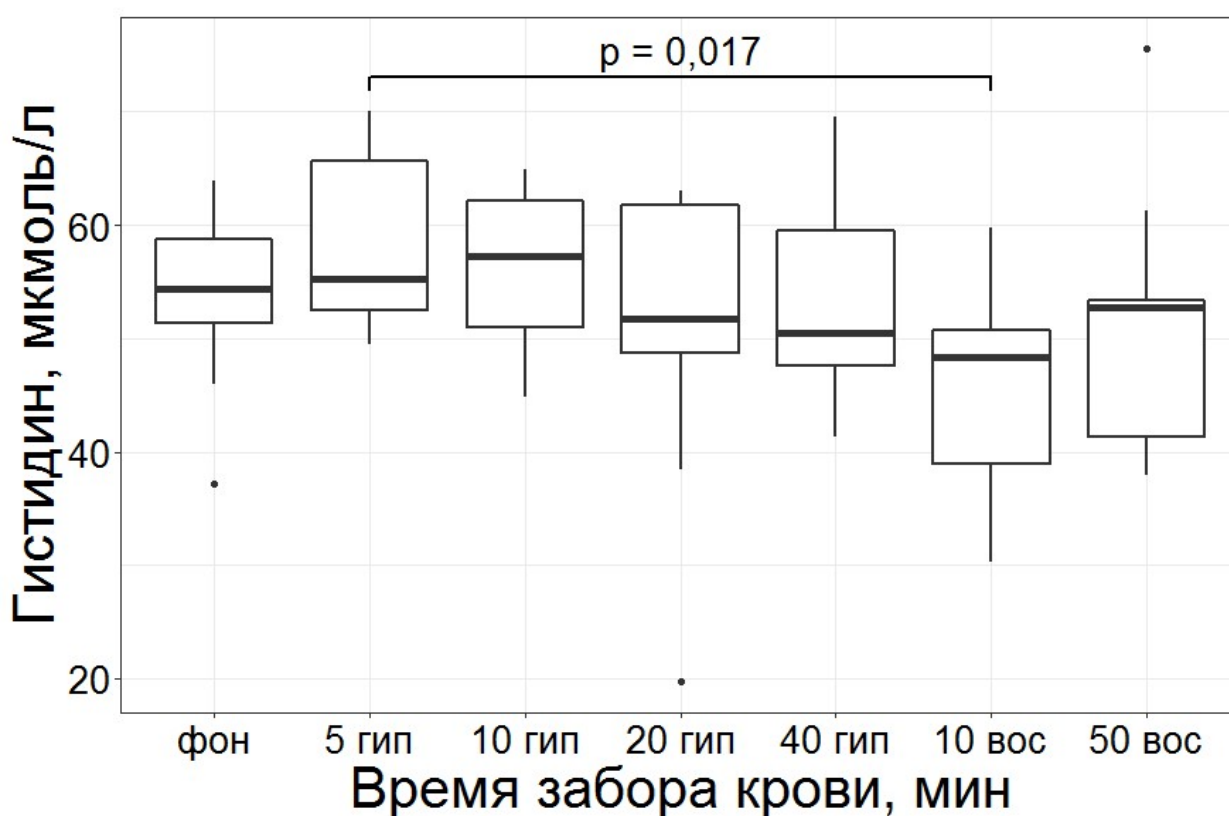


Рисунок 17 – Динамика уровней свободного гистидина плазмы крови у добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

При сравнении динамики уровней этой свободной АК у добровольцев из первой и второй групп в первые 20 минут гипоксии было выявлено, что на 10-ой минуте гипоксии уровень свободного гистидина у добровольцев из первой группы был значимо ниже ($p=0,032$), чем у добровольцев из второй группы, о чём уже говорилось раньше (раздел 4.2.).

В литературе очень немного данных о влиянии острой гипоксии на метаболизм гистидина и его содержание в плазме крови. Гистидин, как уже говорилось – это незаменимая АК. К тому же, как было указано в разделе 4.2 гистидин является обменным субстратом для аминокислотного транспортера LAT1 (SC7A5), переносящего многие незаменимые АК в клетку по механизму антипорта (Scalise et al., 2018). Таким образом, наблюдаемое снижение уровней свободного гистидина могло быть вызвано снижением общего трафика АК через этот транспортер. Это, в свою очередь могло быть вызвано тем, что при восстановлении нормоксии и при наличии пищи в просвете ЖКТ межорганный обмен АК может возвращаться к физиологической норме по несколько другому «плану», чем натошак.

В то же время изменения уровня гистидина в плазме крови добровольцев в первой группе не сопровождались изменениями уровней свободных серина, треонина и глутамина. Такая «относительная изолированность» изменений может свидетельствовать о вовлечении специфических метаболических путей гистидина. Из таковых внимание привлекают синтез гистамина и карнозина .

Гистамин – важное биологически активное соединение, участвующее в регуляции воспаления, реакций гиперчувствительности, тонуса и проницаемости сосудов (Thangam et al., 2018). Помимо этого, гистидин играет роль нейромедиатора и нейромодулятора в ЦНС (Bolam, Ellender, 2016). На лабораторных животных было постулировано участие рецепторов

гистамина в адаптации к факторам окружающей среды, в том числе – гипоксии (Fan, Y.Y. et al., 2011; Ohshima et al., 2011).

Карнозин – дипептид гистидина и бета-аланина, естественный антиоксидант и скавенджер свободных радикалов (Kucherenko, Bernhardt, 2015). В моделях ишемии/реперфузии на лабораторных животных было продемонстрировано его протективное действие (Zhang, H. et al., 2014), однако неясно, играет ли он значительную роль в процессах адаптации к гипоксии у человека.

Гипоксическое воздействие могло привести к снижению запасов гистамина в клетках, использующих его как нейромедиатор и нейромодулятор, к снижению внутриклеточных уровней карнозина на фоне окислительного стресса. Повышенный, вследствие этого, синтез гистамина и карнозина, а соответственно повышенная утилизация гистидина в клетках, могли привести к определённому снижению уровня этой свободной АК в плазме.

Можно также предположить, почему пик утилизации гистамина в данном случае пришёлся на начало восстановительного периода. Согласно существующим воззрениям, в клетках млекопитающих имеется своеобразная иерархия метаболических процессов, которая определяет их важность для жизнедеятельности (Buttgereit, Brand, 1995). В критических состояниях, при экстремальных воздействиях, клетки затормаживают и отключают метаболические процессы, находящиеся на нижних ступенях иерархии, чтобы увеличить шансы на выживание. Среди таких процессов – *de novo* синтез различных структурных и функциональных молекул, в том числе, вероятно, синтез карнозина и гистамина. В этом случае при устранении экстремального фактора (прекращении гипоксии) должна произойти реактивация синтетических процессов низких иерархических степеней, повышение утилизации гистидина в клетках и, следовательно, активизация его захвата из плазмы крови. Всё это также могло привести к наблюдаемому

значимому снижению уровней этой АК в плазме крови добровольцев первой группы на 10-й минуте восстановительного периода.

Таким образом, наблюдаемое значимое снижение уровней свободного гистидина плазмы после восстановления дыхания атмосферным воздухом могло быть вызвано, по отдельности и или в сочетании, двумя механизмами: снижением работы переносчиков АК, использующих гистидин в качестве обменного субстрата (снижение выхода этой АК из клеток), и повышенным захватом гистидина тканями для удовлетворения метаболического запроса. Для уточнения вклада этих или других механизмов в наблюдаемую картину необходимо проведение дальнейших исследований.

4.6. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободных пролина, гидроксипролина и глицина плазмы крови добровольцев во второй группе

Пролин и его гидроксилированное производное гидроксипролин считаются самыми распространёнными АК составе белков организма человека. Они составляют самую большую часть от сухой массы всех белков в теле человека (Di Lullo et al., 2002). Гидроксипролин является одним из главных производных пролина. Несмотря на то, что остатки гидроксипролина находятся в составе первичной аминокислотной последовательности белков, в первую очередь коллагенов, эта АК не кодируется в ДНК. Весь гидроксипролин в организме является продуктом посттрансляционной трансформации – гидроксилирования остатков пролина, входящих в состав аминокислотных последовательностей белков (Adams, Frank, 1980; Synober, 2004). Третьей АК, играющей ключевую структурную роль в составе коллагенов, является глицин (Shoulders, Raines, 2009).

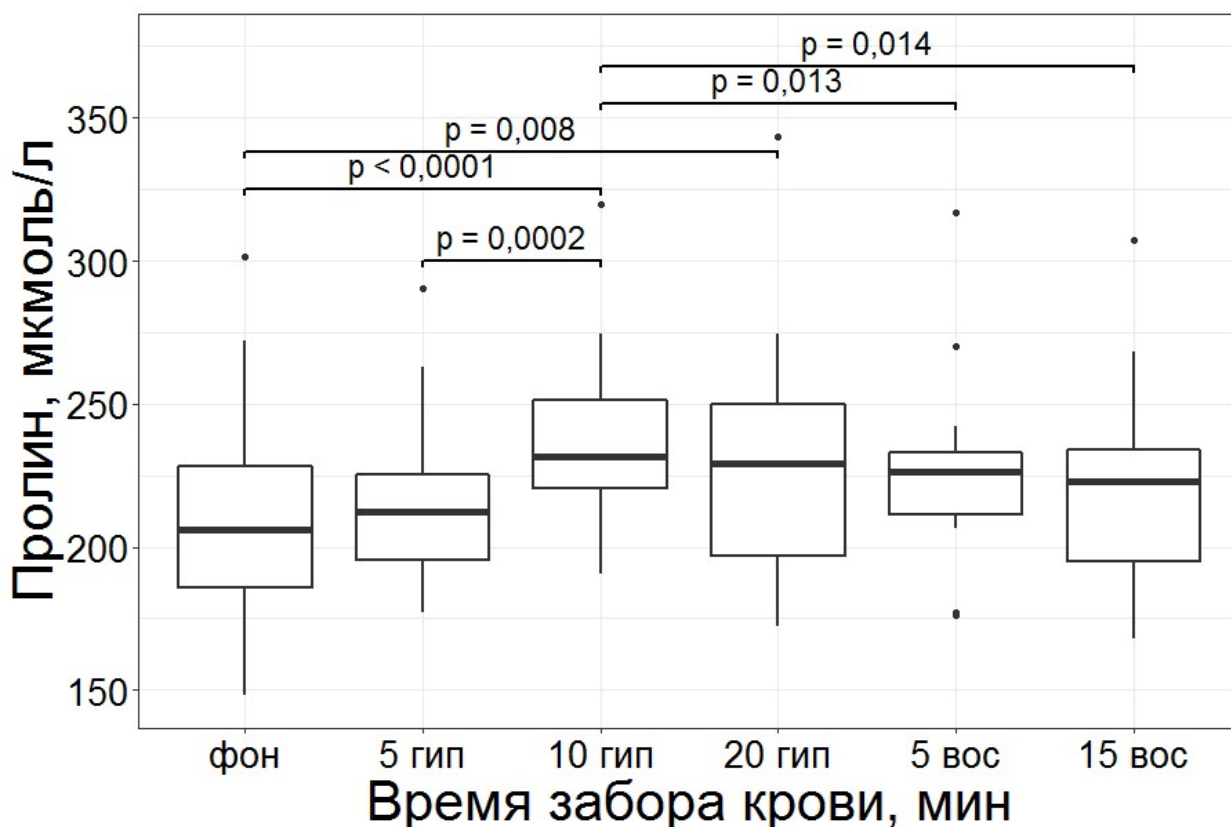


Рисунок 18 – Динамика уровней свободного пролина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

У добровольцев во второй группе, проходивших гипоксическое тестирование натошак, наблюдалось статистически значимое увеличение уровней свободного пролина плазмы крови на фоне гипоксического воздействия по сравнению с фоновыми значениями ($p < 0,05$) и показателями на 5-й минуте гипоксии (рисунок 18). В восстановительном периоде уровни свободного пролина снижались значимо по сравнению с показателями гипоксического периода ($p < 0,05$) и значимо не отличались от показателей до начала гипоксии. Уровень свободного гидроксипролина плазмы у тех же добровольцев (рисунок 19) статистически значимо увеличивался на 10-ой

минуте гипоксического периода по сравнению с фоновым уровнем ($p = 0,023$). Затем, на 20-ой минуте гипоксического периода уровень свободного гидроксипролина снижался, и далее мы не наблюдали каких-либо значимых изменений уровня этой АК ($p > 0,05$).

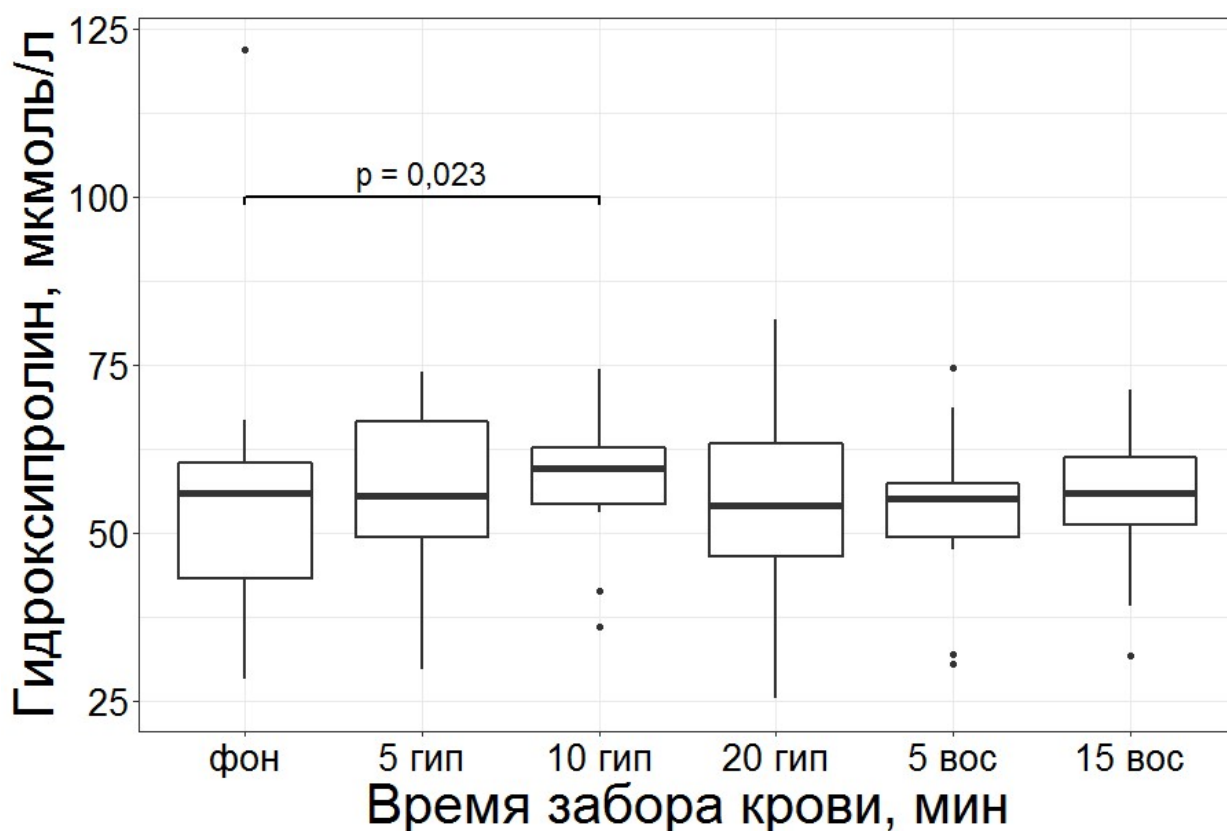


Рисунок 19 – Динамика уровней свободного гидроксипролина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Уровни третьего ключевого компонента коллагенов – глицина – в плазме крови добровольцев второй группы демонстрировали динамику, схожую с динамикой свободного гидроксипролина (рисунок 20).

Наблюдалось статистически значимое повышение уровней этой АК в плазме крови на 10-й минуте гипоксического периода по сравнению с догипоксическим периодом ($p = 0,024$) и 5-й минутой гипоксического воздействия ($p = 0,002$). После 10-й минуты гипоксии значимых различий в динамике уровней свободного глицина плазмы крови у добровольцев второй группы не наблюдалось ($p > 0,05$).

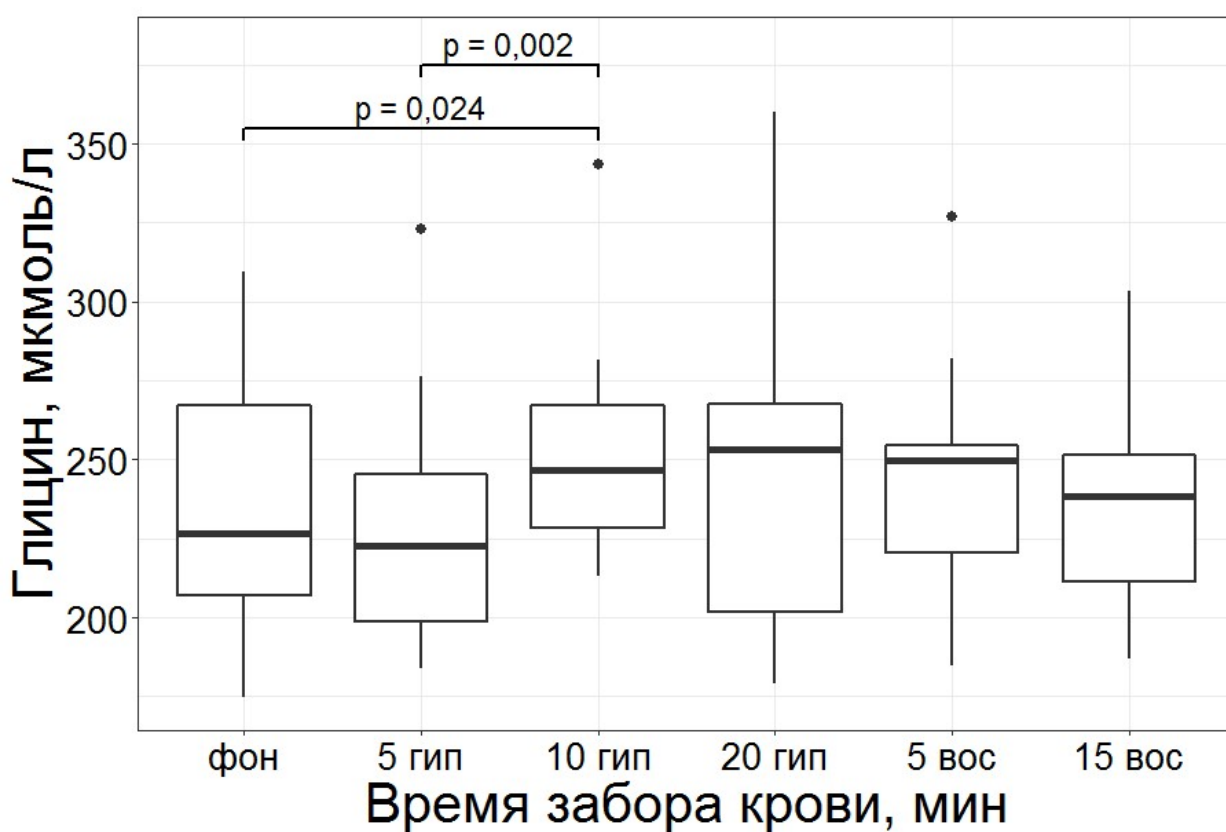


Рисунок 20 – Динамика уровней свободного глицина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Увеличение содержания АК в плазме крови может происходить за счёт увеличения поступления АК из тканей (включая просвет ЖКТ) или уменьшения захвата АК в ткани. Протокол эксперимента во второй группе предусматривал гипоксическое исследование утром натощак, поэтому можно исключить вклад поступления АК из ЖКТ. В отличие от первой группы, во второй группе не наблюдалось сочетанного изменения уровней свободных серина, треонина, глутамина и гистидина (см. раздел 4.2), поэтому можно предположить, что изменение трафика АК через цитоплазматическую мембрану незначительно влияло на наблюдаемую динамику этих трёх заменимых АК в плазме крови. Следовательно, наиболее вероятно, что наблюдаемые изменения были связаны с увеличением высвобождения этих АК в плазму из различных тканей организма.

У человека отсутствует истинное депо свободных АК (Synober, 2004), и поэтому в качестве своеобразного резервуара АК выступают структурные и функциональные белки клеток и межклеточного пространства. Синтез *de novo* из других субстратов возможен в «нормальных» условиях, особенно учитывая тот факт, что все эти три АК (пролин, глицин, и, с оговорками, гидроксипролин) являются заменимыми АК. Однако, как уже говорилось, синтез АК имеет низкий приоритет в иерархии АТФ-затратных процессов при гипоксии, поэтому он вероятнее всего был подавлен при острой нормобарической гипоксии (Buttgereit, Brand, 1995). Трансаминирование тоже не является в данном случае подходящим механизмом в связи со структурными особенностями этих трёх АК, а также поскольку гипоксия подавляет работу трансаминаз (Cepelak et al., 2006). С другой стороны, увеличение катаболизма белков при гипоксии – давно известный феномен (Flick, Kaiser, 2012). Аутофагия – процесс направленного, регулируемого катаболизма собственных компонентов клеток – повышается при гипоксии (Gong et al., 2014), и играет важную роль в адаптации и выживании клеток в экстремальных условиях, поскольку генерирует свободные АК, обладающие

протективными свойствами (Meijer, A. J., Codogno, 2009; Murray, Montgomery, 2014).

В отсутствии у человека истинного депо свободных АК, именно на коллагены, основные белки соединительной ткани, приходится наибольшая фракция пролина, гидроксипролина и глицина, содержащихся в организме (Di Lullo et al., 2002; Szpak, 2011). Согласно данным литературы, гипоксия вызывает активацию экспрессии генов матриксных металлопротеиназ (ММП) – ферментов, разрушающих компоненты межклеточного матрикса, в том числе в первую очередь – коллаген (Ottino et al., 2004; Bauer et al., 2010).

Однако, известно, что процессы, обусловленные изменениями в экспрессии тех или иных генов, требуют для своего развития определённого времени, даже при экстремальных воздействиях: в очагах ишемии головного мозга повышение уровня ММП наблюдалось спустя час после запуска ишемии (Chang et al., 2003). В то же время, некоторые ММП синтезируются конститутивно (Chang et al., 2003) (то есть вне зависимости от наличия или отсутствия специфических стимулов), а их активность регулируется с помощью отдельного семейства белков – тканевых ингибиторов ММП, ТИМП (Turner, Porter, 2012). Относительно быстрое развитие коллагенолиза, опережающее возможности механизмов контроля экспрессии генов, в таком случае может достигаться как раз благодаря деингибированию конститутивных ММП под действием гипоксии. По нашему мнению, сходная динамика и характер корреляционных связей между показателями пролина, гидроксипролина и глицина служат подтверждением гипотезы о том, что наблюдаемое повышение показателей этих АК в гипоксическом периоде связано с их поступлением в кровь вследствие активации лизиса коллагенов межклеточного вещества (рисунок 21).

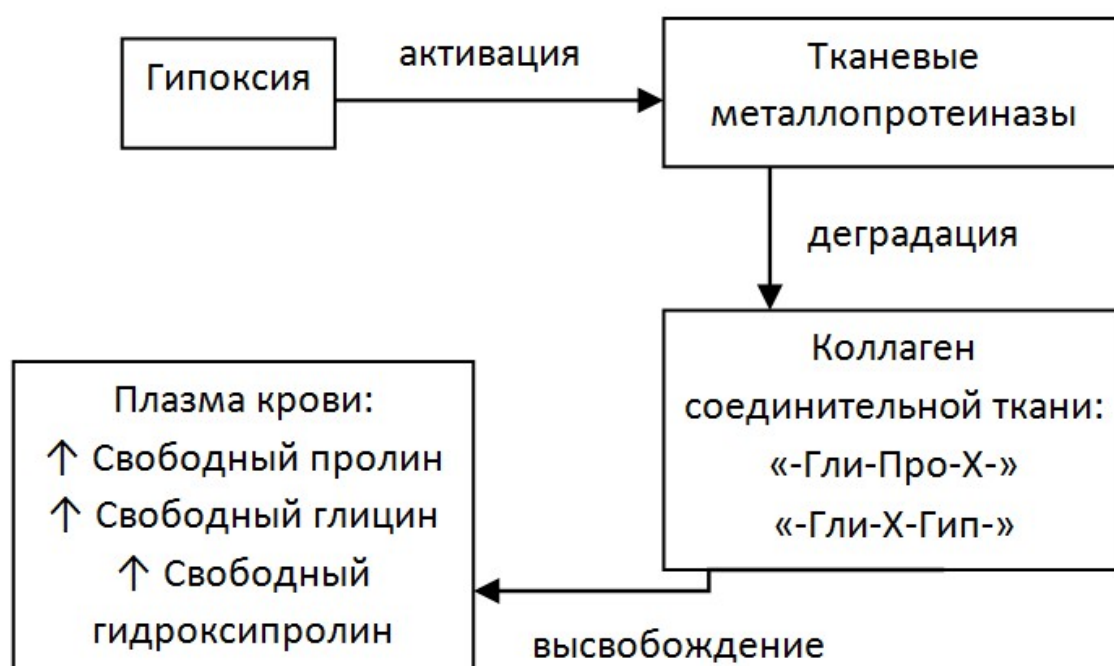


Рисунок 21 – Предполагаемый механизм наблюдаемых изменений показателей свободных пролина, глицина и гидроксипролина.

Подтверждением гипотезы о том, что наблюдаемые изменения уровней трёх ключевых АК, формирующих коллаген, обусловлены в первую очередь быстрой активацией коллагенолиза, может служить то, что уровни всех этих трёх АК повышались более-менее синхронно в гипоксическом периоде (рисунок 18, рисунок 19, рисунок 20). При этом прослеживалась своеобразная динамика корреляционных зависимостей между показателями этих свободных АК (таблица 20, таблица 21, таблица 22).

Таблица 20 – Корреляции между показателями свободных пролина и гидроксипролина плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
R	0,607	0,346	0,356	0,646	0,621	0,430
p	0,021	0,22	0,21	0,013	0,018	0,12

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Таблица 21 – Корреляции между показателями свободных пролина и глицина плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
R	0,930	0,957	0,907	0,979	0,945	0,964
p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Таблица 22 – Корреляции между показателями свободных гидроксипролина и глицина плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
R	0,632	0,480	0,299	0,604	0,617	0,410
p	0,015	0,083	0,299	0,022	0,019	0,15

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Между показателями свободных пролина и глицина во всех точках наблюдения прослеживалась значимая сильная положительная корреляционная связь (таблица 21). В то же время между показателями пролина и гидроксипролина, и гидроксипролина и глицина значимая положительная корреляция средней силы прослеживалась только до начала гипоксического воздействия, на 20-й минуте гипоксии и на 5-й минуте восстановления (таблица 20 и таблица 22). Такие интересные изменения могут указывать на различия в метаболизме этих трёх АК, а также в их захвате и высвобождении непосредственно после лизиса коллагена до мономеров АК.

Особенности метаболизма этих АК могу объяснять как динамику корреляционной связи, так и вероятную физиологическую роль наблюдаемых изменений. Согласно современным воззрениям, существует так называемый цикл пролина, иначе «пролиновый окислительно-

восстановительный челнок» (Phang et al., 2010), который напрямую поставляет восстановленный НАД в митохондрии и, таким образом, создаёт ещё один альтернативный механизм генерации АТФ. Энергетическая эффективность такого шунтирования субстратов по сравнению с гликолизом и циклом трикарбоновых кислот обсуждается учёными, однако ряд феноменов, таких как эффект Варбурга (дисфункция цикла Кребса и окислительного фосфорилирования в опухолевых клетках) (Dang, Semenza, 1999; Fox et al., 2005) не позволяют исключить роль пролинового челнока в обеспечении клетки энергией. Другой механизм, с помощью которого пролин может использоваться для обеспечения энергетических нужд клетки в экстремальных состояниях – синтез из пролина пирролин-5-карбоксилата, глутаминовой и α -кетоглутаровой кислот последовательно, что позволяет утилизировать пролин в ЦТК (Wu, G. Y. et al., 2011). Подтверждением данной гипотезы может служить ряд работ, в которых продемонстрировано повышение деградации пролина клетками на фоне ограничения доступности и эффективной утилизации более «традиционных» субстратов (Pandhare et al., 2009; Liu, W. et al., 2012).

В то же время гидроксипролин также может служить субстратом синтеза других важных соединений: один из метаболических путей гидроксипролина производит пируват и глиоксилат, поступающие затем в ЦТК (Synober, 2004). Гидроксипролин также участвует в синтезе полиаминов и глутаминовой кислоты, которая может в свою очередь служить субстратом синтеза сукцината в гипоксических условиях (Mudge et al., 1976). Однако, лимитирующие реакции метаболизма гидроксипролина катализируются своими специфическими ферментами, последовательности которых закодированы в другой хромосоме, чем ключевой фермент метаболизма пролина, пролиноксидаза, и регулируются эти гены независимо от гена пролиноксидазы (Wu, G. Y. et al., 2011; Servet et al., 2012). Эти различия в метаболизме пролина и гидроксипролина, предположительно, послужили

причиной изменения функциональных связей между метаболическими системами данных АК, что проявилось в виде отсутствия корреляционной связи между ними на 5-ой и 10-ой минутах гипоксии и 15-й минуте восстановительного периода.

Глицин, самая простая по химическому строению заменимая АК, имеет свою сеть метаболических путей. Возможно, наблюдаемые изменения также носят адаптивный характер при гипоксии, поскольку в экспериментах было показано цитопротективное действие глицина, в том числе и при гипоксических состояниях (Weinberg et al., 1991; Weinberg et al., 2016).

Необходимо также рассмотреть возможность другого механизма увеличения уровня свободного пролина – увеличения синтеза из других АК. Одними из важнейших ферментов метаболизма пролина у человека (помимо пролиноксидазы/пролиндегидрогеназы – фермента, запускающего пролиновый цикл) являются пирролин-5-карбоксилатсинтаза (P5CS) и пирролин-5-карбоксилатредуктаза (P5CR) (Phang et al., 2015). Эти ферменты имеют различные изоформы, которые преимущественно экспрессируются в разных тканях организма, и направляют метаболизм заменимых АК в этих тканях преимущественно в сторону синтеза аргинина или пролина (Pérez-Arellano et al., 2010). Экспрессия P5CS, в частности, регулируется транскрипционным фактором p53, глюкокортикоидными гормонами; оба фермента подвержены регуляции продуктами и субстратами метаболических путей пролина.

Наблюдавшиеся у добровольцев из второй группы значимые изменения уровня свободного пролина плазмы крови могли бы наблюдаться при активации синтеза пролина из других АК – глутаминовой кислоты и орнитина – при посредстве этих двух ферментов. Протеин p53, регулирующий экспрессию генов P5CS, активируется, в частности, гипоксией, по механизму, схожему с активацией HIF-1 α , (Han, E. S. et al., 2008). Повышенная экспрессия генов P5CS в результате активации p53,

возможно, привела бы к заметному повышению уровня свободного пролина в организме, но процессы транскрипции, трансляции, посттрансляционной модификации белков-ферментов требуют времени. В настоящем же исследовании гипоксическое воздействие было тяжёлым, но острым, кратковременным.

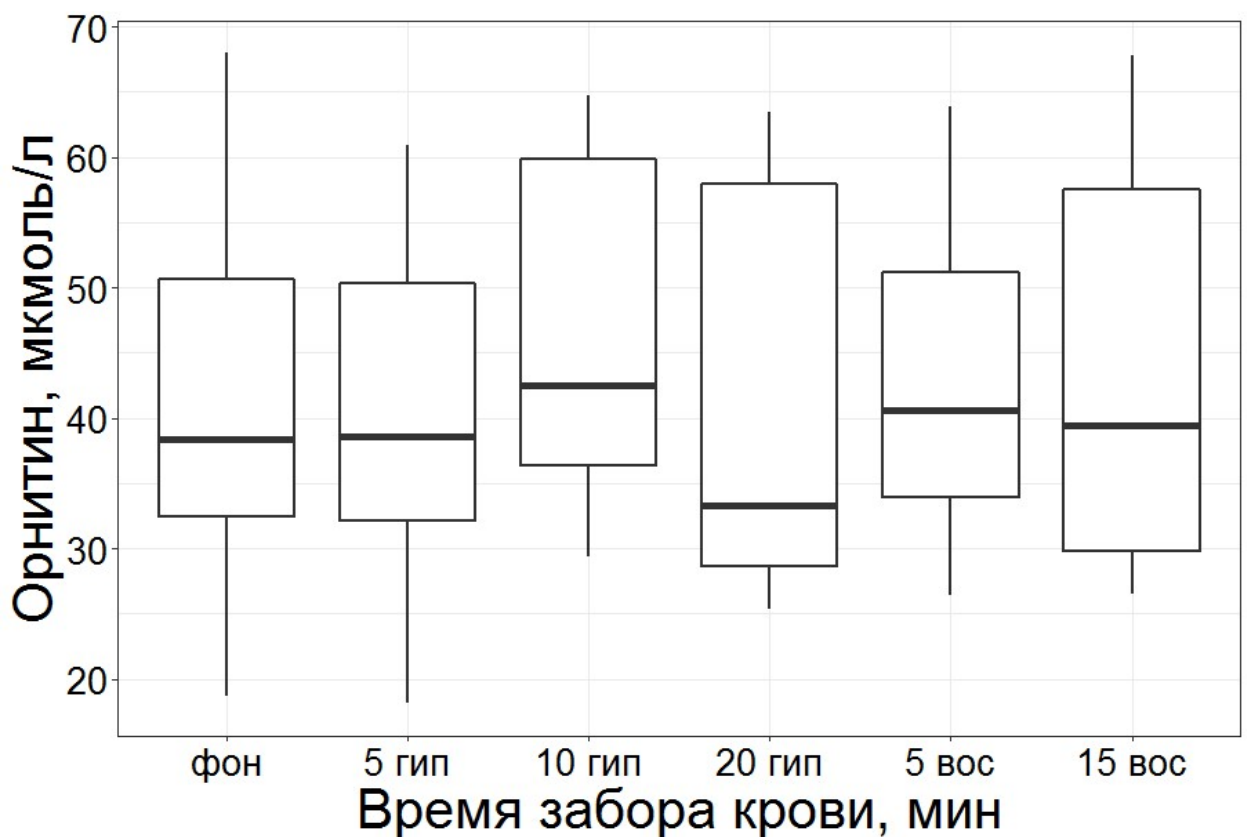


Рисунок 22 – Динамика уровня свободного орнитина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. свободного глицина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления.

Если этот механизм был бы ответственен за наблюдавшееся повышение уровня свободного пролина, то субстратами для его синтеза

послужили бы глутаминовая кислота и орнитин. В таком случае уместно было бы ожидать значимых изменений (а именно – снижения) уровней этих свободных АК в плазме в гипоксический период. Однако мы не выявили статистически значимых изменений уровней свободного орнитина плазмы крови у добровольцев во второй группе (рисунок 22; $p = 0,096$). В то же время динамика уровня свободной глутаминовой кислоты заметно отличалась от предполагаемой в случае если бы глутамат в больших количествах расходовался бы на синтез пролина (см. раздел 4.8.). Однако, в связи со сложностью взаимосвязей метаболических путей, в которых задействована глутаминовая кислота, одних данных о динамике свободного глутамата в плазме крови может быть недостаточно. Проведённый корреляционный анализ показал, что во второй группе между показателями пролина и глутаминовой кислоты плазмы не было значимых корреляций на всём протяжении гипоксического исследования (таблица 23).

Таблица 23 – Корреляции между показателями свободных пролина и глутаминовой кислоты плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
R	0,100	0,169	-0,442	0,086	-0,055	-0,145
p	0,73	0,87	0,11	0,769	0,85	0,62

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

В то же время между показателями свободного пролина и орнитина корреляция прослеживалась значимая положительная корреляция средней и высокой силы на всём протяжении гипоксического исследования, кроме 10-й минуты гипоксии (таблица 24).

Таблица 24 – Корреляции между показателями свободных пролина и орнитина плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
r	0,623	0,717	0,324	0,737	0,569	0,624
p	0,017	0,0039	0,26	0,0026	0,034	0,017

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Из вышесказанного можно сделать вывод, что наблюдавшаяся во второй группе динамика уровней свободного пролина плазмы вероятнее всего не была обусловлена повышением синтеза этой АК из глутаминовой кислоты и/или орнитина.

Таким образом, наблюдаемые изменения уровней трёх свободных АК плазмы крови – пролина, гидроксиролина и глицина – у добровольцев во второй группе были, вероятнее всего, обусловлены активацией коллагенолиза на фоне острой нормобарической гипоксии. Возможно, повышение содержания этих АК в крови играет роль в процессах адаптации к острой нормобарической гипоксии, за счёт участия метаболических, цитопротективных и регуляторных эффектов этих свободных АК.

4.7. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного фенилаланина и свободного тирозина плазмы крови добровольцев во второй группе

В представленном исследовании во второй группе добровольцев (ГГС-9, 25 минут, натошак) были выявлены значимые изменения уровня свободного фенилаланина (рисунок 23). В гипоксическом периоде уровень свободного фенилаланина повышался на 10-й минуте по сравнению с фоном ($p=0,018$) и 5-й минутой гипоксии ($p=0,0006$). На 20-й минуте гипоксии

уровень свободного фенилаланина плазмы был выше, чем до начала гипоксии (фон, $p=0,005$) и на 5-й минуте гипоксии ($p=0,0003$). В восстановительном периоде уровень свободного фенилаланина плазмы снижался, и на 15-й минуте восстановления был значимо ниже, чем на 10-й ($p=0,002$) и 20-й минутах гипоксии ($p=0,0006$).

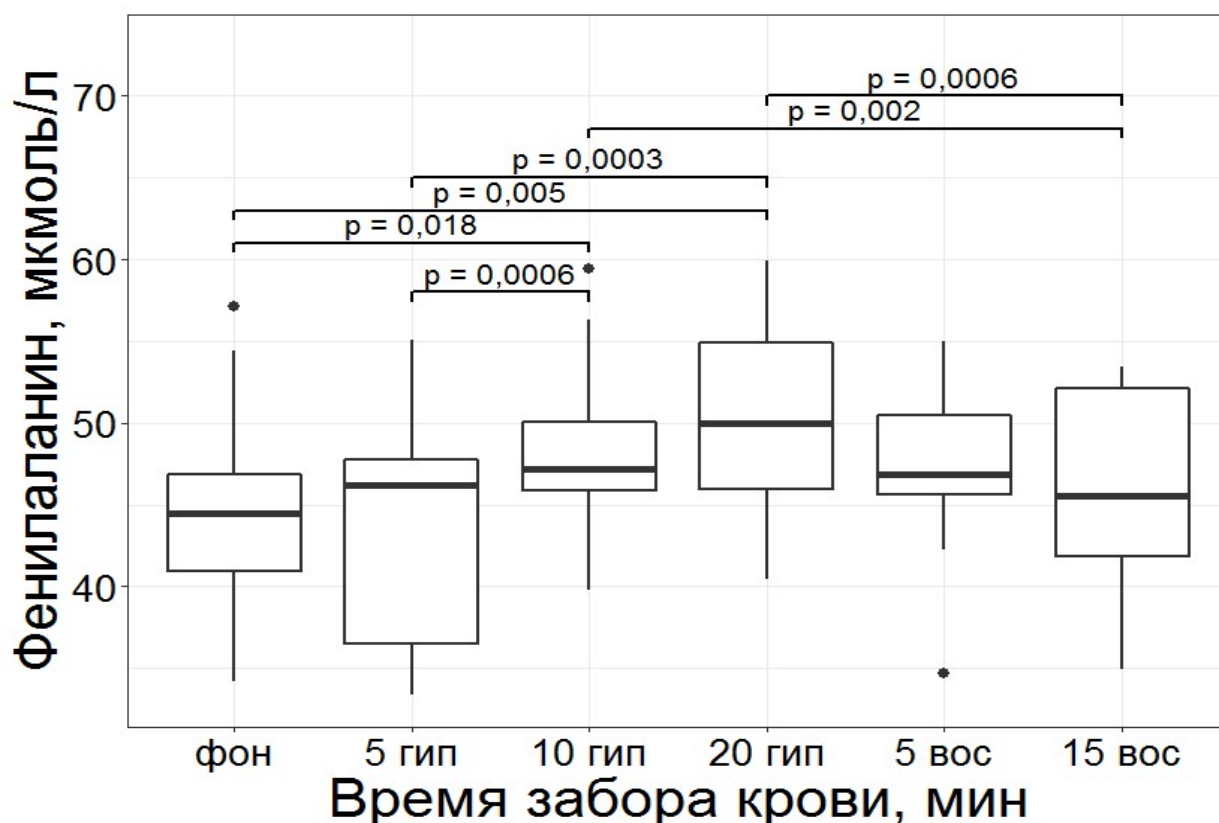


Рисунок 23 – Динамика уровней свободного фенилаланина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

В то же время в первой группе не было выявлено статистически значимых изменений уровня этой свободной АК плазмы крови в динамике гипоксического исследования (рисунок 24).

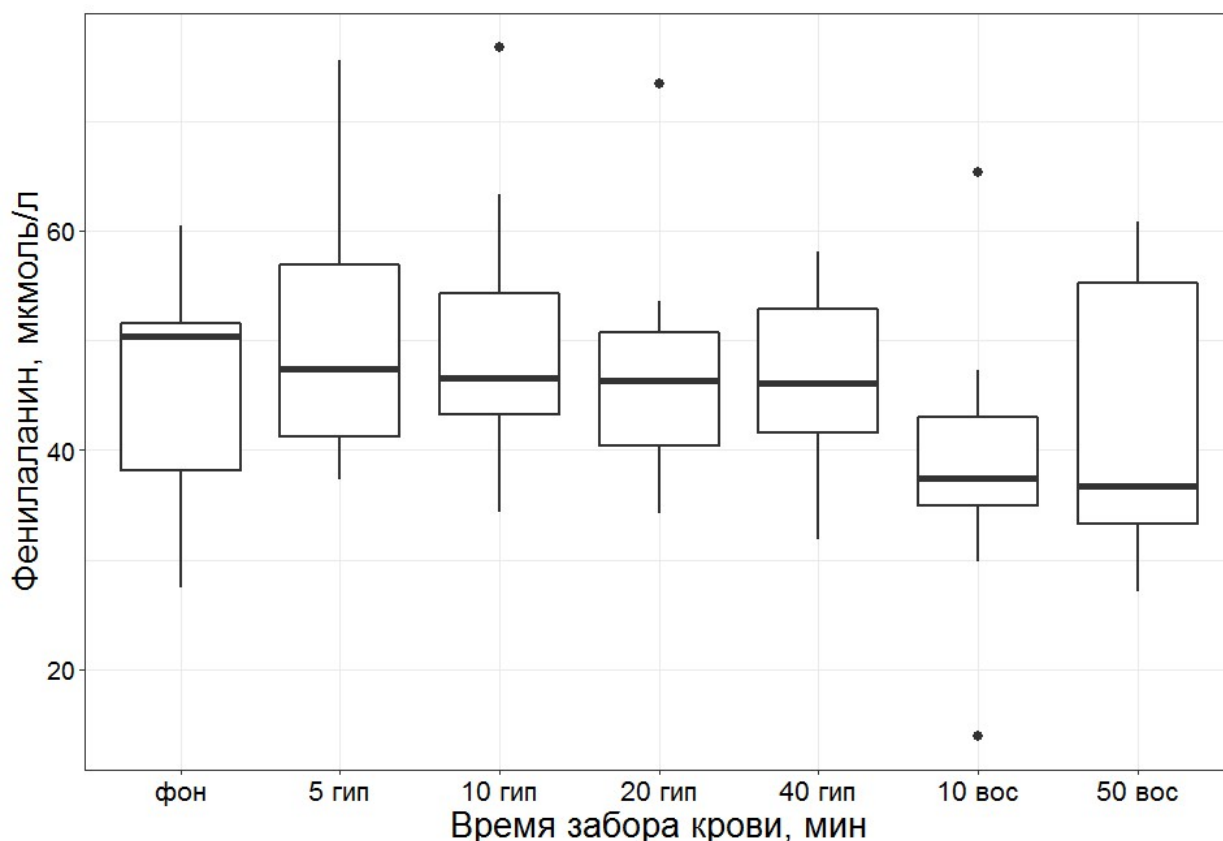


Рисунок 24 – Динамика уровней свободного фенилаланина плазмы крови у добровольцев в первой группе, ммоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Фенилаланин является незаменимой ароматической АК, другими словами не синтезируется в организме человека и полностью поступает из внешних источников (Cynober, 2004; Furst, Stehle, 2004). Таким образом, уровень свободного фенилаланина плазмы определяется балансом процессов поступления и расходования. Если верно предположение, что наблюдаемая во второй группе динамика этой АК связана с увеличением поступления её в кровь, то для этого есть два пути. Первый путь поступления, всасывание из

просвета желудочно-кишечного тракта – основной источник этой АК в организме человека. Следовательно, после приёма пищи уровень свободного фенилаланина плазмы преимущественно определяется поступлением из ЖКТ. Однако, в соответствии с протоколом эксперимента, исследование во второй группе проводилось натощак, что сводит роль алиментарного фактора к минимуму.

Второй путь – увеличение высвобождения этой АК из тканей. Напомним, что у человека отсутствует истинное депо АК (Brosnan, J. T., 2003; Synober, 2004). Фенилаланин – классическая незаменимая АК, поэтому синтез его *de novo* или конверсия из других АК в клетках человеческого организма невозможны. Таким образом, единственный остающийся путь для увеличения высвобождения фенилаланина в кровь – поступление этой АК в результате распада собственных структурных и функциональных белков организма (Synober, 2004), в частности в результате аутофагии (Meijer, Alfred J. et al., 2015).

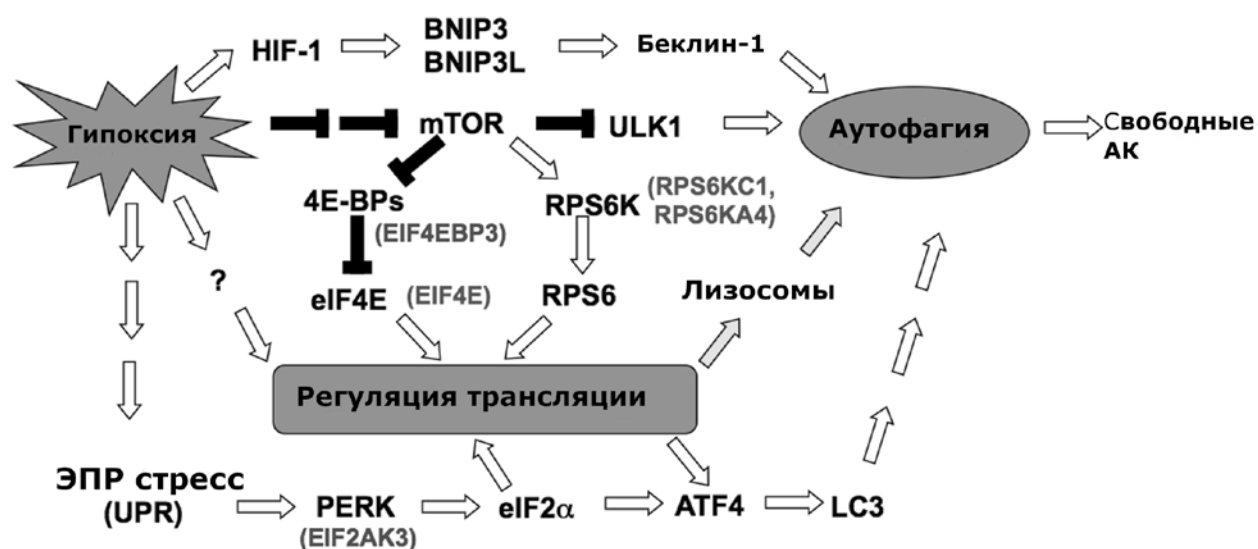


Рисунок 25 – Схема каскадов активации аутофагии при гипоксии (по Lai, M.C., 2016, с изменениями).

Аутофагия (рисунок 25) является важным механизмом не только запрограммированной клеточной гибели, но и поддержания

жизнеспособности клетки (Meijer, A. J., Codogno, 2004; Giordano et al., 2013; Ryter et al., 2013). Известно, что аутофагия является важным компонентом интегративного ответа на стресс, вызванный воздействием различных факторов (Kroemer et al., 2010). В частности, гипоксия приводит к активации аутофагии в клетках (Kroemer et al., 2010; Rzymiski et al., 2010; Lai et al., 2016). Таким образом, можно предположить, что активация аутофагии на фоне острой нормобарической гипоксии во второй группе могла обусловить наблюдаемую динамику уровней свободного фенилаланина у добровольцев в этой группе.

При этом в первой группе, как было показано выше, не наблюдалось значимых изменений уровня свободного фенилаланина в динамике гипоксического тестирования, несмотря на большую длительность самой гипоксии. Мы полагаем, что эти различия были обусловлены разным статусом питания участников: первая группа участвовала в исследовании после лёгкого низкожирового завтрака, вторая группа – натощак.

Основными некатаболическими путями потребления свободного фенилаланина являются синтез белка и синтез тирозина (не только для удовлетворения потребности организма в этой АК, но и как первый этап синтеза биологически активных веществ, гормонов и нейромедиаторов), а также катаболизм. Согласно имеющемуся на настоящий момент пониманию физиологии и биохимии экстремальных состояний, гипоксия подавляет синтез белка в организме (Preedy et al., 1985; Connolly et al., 2006), соответственно именно синтез тирозина и катаболические процессы могут быть основными потребителями свободного фенилаланина в гипоксическом периоде. Динамика уровней свободного тирозина плазмы у добровольцев из первой и второй групп в ходе исследования различалась (рисунок 26 и рисунок 27).

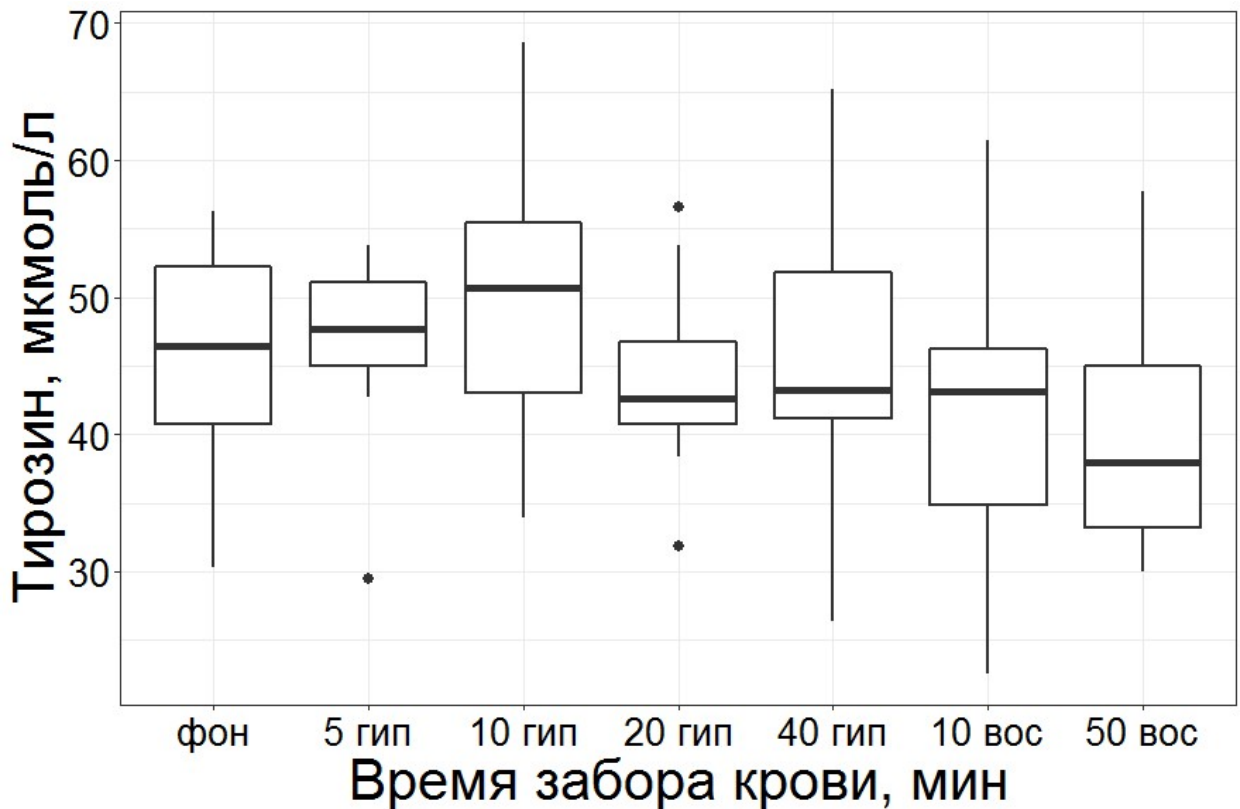


Рисунок 26 – Динамика уровней свободного тирозина плазмы крови у добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

В первой группе не было выявлено значимых изменений уровней свободного тирозина (рисунок 26). Во второй группе (рисунок 27) наблюдалось значимое повышение уровней свободного тирозина на 10-й минуте гипоксии по сравнению с 5-й минутой ($p=0,017$).

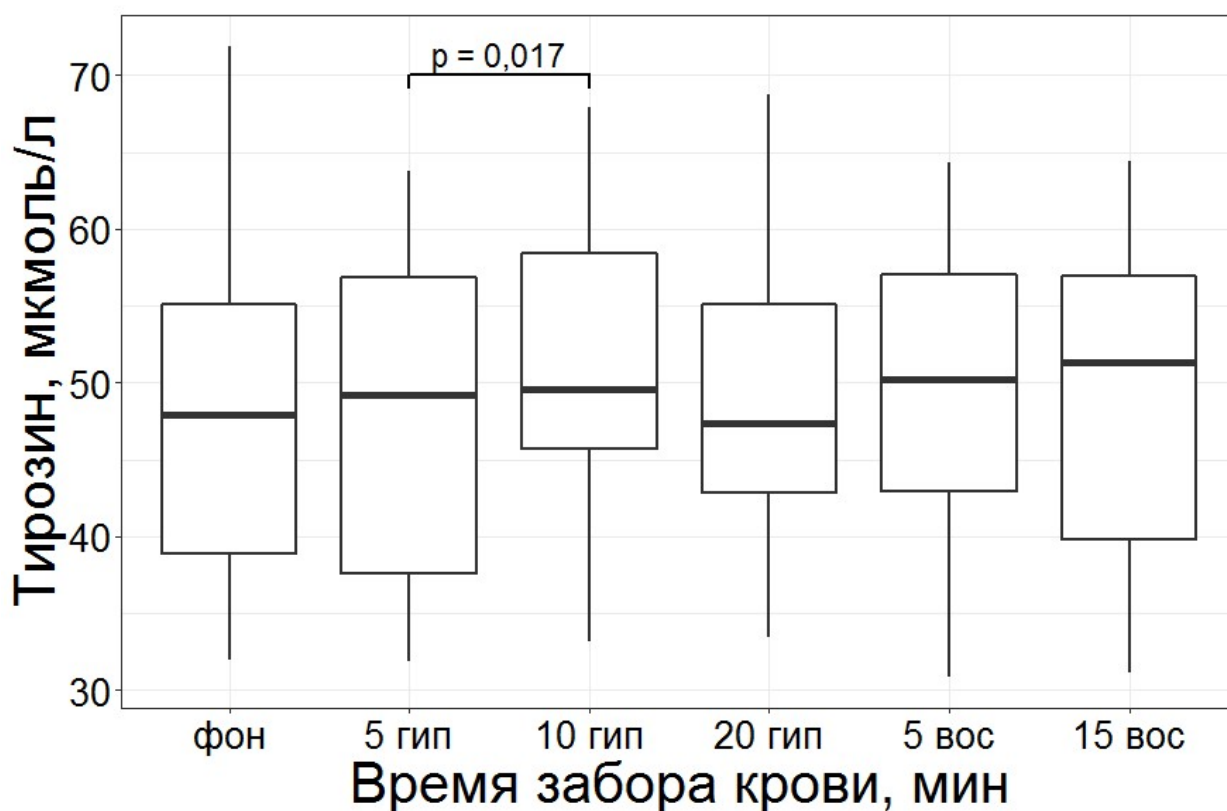


Рисунок 27 – Динамика уровней свободного тирозина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Тирозин – заменимая ароматическая АК; тирозин поступает в организм не только из внешних источников и из распавшихся собственных белков, но и синтезируется из фенилаланина. Свободный тирозин служит в первую очередь субстратом синтеза белков, а также синтеза биологически активных веществ (моноаминов, тиреоидных гормонов, меланина) (Krzysciak, 2011). Фенилаланин и тирозин объединены общностью метаболических ролей, катаболизма (оба являются одновременно глюкогенными и кетогенными

АК), и обычно переносятся через мембраны одними и теми же транспортёрами (Bröer, Bröer, 2017).

Поэтому также представляется необходимым проанализировать корреляции между показателями этих двух свободных АК плазмы у добровольцев в обеих группах. При корреляционном анализе были выявлены примечательные межгрупповые различия. В первой группе при наличии общей значимой слабой положительной корреляции при анализе по всему массиву данных ($r = 0,426$, $p = 0,0005$), анализ отдельно по каждой точке забора крови показал только средней силы положительную корреляцию на 50-й минуте восстановления ($r = 0,678$, $p = 0,045$) – таблица 25.

Таблица 25 – Корреляции между показателями свободных фенилаланина и тирозина плазмы крови у добровольцев в первой группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	40 гип	10 вос	50 вос
R	0,389	-0,212	0,370	0,387	0,512	0,424	0,678
p	0,30	0,59	0,33	0,30	0,16	0,26	0,045

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

В то же время во второй группе добровольцев была выявлена общая значимая положительная корреляция высокой силы между показателями этих двух АК ($r = 0,707$, $p < 0,0001$). При оценке динамики изменений этой корреляционной связи до начала гипоксического воздействия, на 5-й и 10-й минутах гипоксии были выявлены значимые сильные положительные корреляции между показателями свободных фенилаланина и тирозина плазмы (таблица 26). На 20-й минуте гипоксии и на 5-й минуте восстановления эти корреляции исчезали ($p > 0,05$), и восстановление значимой положительной средней силы корреляции наблюдалось только на 15-й минуте восстановительного периода ($r = 0,617$, $p = 0,019$).

Таблица 26 – Корреляции между показателями свободных фенилаланина и тирозина плазмы крови у добровольцев во второй группе

	фон	5 гип	10 гип	20 гип	5 вос	15 вос
r	0,717	0,9163	0,864	0,496	0,439	0,617
p	0,004	<0,0001	<0,0001	0,072	0,12	0,019

Примечание: R – робустный коэффициент корреляции.

Различия корреляционных связей между двумя группами добровольцев вероятно объясняются влиянием фактора питания: возможно, поступление нутриентов (не только АК, но и глюкозы) из просвета ЖКТ приводило к другому характеру срочного адаптивного ответа организма на острую гипоксию. В частности, возможно в первой группе гипоксическая активация аутофагии была выражена в меньшей степени, в результате чего в этой группе не наблюдалось значимого повышения уровней свободного фенилаланина плазмы в гипоксическом периоде, несмотря на большую общую длительность гипоксии (45 минут против 25 минут).

Эта находка, на наш взгляд, представляет интерес, поскольку ранее различными исследователями в экспериментах на животных было продемонстрировано повышение уровней фенилаланина и тирозина при воздействии гипоксии (Bondoli et al., 1980; Muratsubaki, Yamaki, 2011). Подобные эффекты – повышение внутриклеточных уровней фенилаланина и тирозина – были также показаны в исследовании на культуре дрожжей (Gleason et al., 2011). Данных о подобных исследованиях на человеке очень мало, но было показано, что гипобарическая (высотная; по классификации Агаджаняна и Чижова, вероятно, экологическая) гипоксия вызывала повышение уровней фенилаланина в крови (Liao et al., 2016).

Однако, следует учесть, что в последнем случае длительность гипоксии у добровольцев (пребывание на высокогорье) значительно превосходила длительность гипоксического воздействия в нашем эксперименте, а степень

снижения парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе была меньше: 9% кислорода при атмосферном давлении на уровне около 100 м над уровнем моря эквивалентно парциальному давлению кислорода на высоте 6400 м над уровнем моря; в исследовании Liao et al. высота составляла 5300 м над уровнем моря.

Различия между экспериментальными группами в характере корреляционных связей между двумя ароматическими АК – фенилаланином и тирозином – вероятнее всего были обусловлены, как и различия в динамике показателей фенилаланина, статусом питания (после лёгкого низкожирового завтрака и натошак). Динамика корреляций между показателями этих двух АК во второй группе, возможно, была обусловлена углублением гипоксии в ходе эксперимента.

Синтез тирозина из фенилаланина осуществляется ферментом фенилаланингидроксилазой, а для катализа реакции требуется присутствие молекулярного кислорода. Согласно имеющимся данным, угнетение активности этого фермента может происходить уже при физиологических (нелетальных) колебаниях уровня оксигенации тканей (Jones, 1986). Возможно, именно снижение активности фенилаланингидроксилазы у добровольцев во второй группе послужило причиной различной динамики этих АК в этой группе, а также исчезновения корреляций между показателями свободных тирозина и фенилаланина на 20-ой минуте гипоксии и 5-й минуте восстановления. Можно предположить, что значимое увеличение концентрации свободного фенилаланина в плазме крови добровольцев во второй группе было вызвано активацией аутофагии, а не ограничением метаболизации этой АК в тирозин, поскольку в первой группе не было выявлено ни значимых изменений показателей этих АК, ни значимых корреляций между ними (за исключением 50-й минуты восстановления).

В то же время, во второй группе значимое повышение уровня свободного тирозина в ответ на гипоксию было более умеренным, чем повышение фенилаланина. Соотношение динамики этих АК в целом было похоже на соотношение динамики пролина и глицина. Возможно, это связано с активизацией утилизации тирозина в клетках. Такое повышение утилизации может быть вызвано катаболизмом этой АК (тирозин, как фенилаланин, является кето- и глюкогенной АК), а также повышенным расходом этой АК в специфических путях метаболизма (синтез биологически активных веществ, гормонов и медиаторов).

Специфический метаболический путь тирозина, синтезирующий катехоламины, регулируется в первую очередь за счёт регуляции его первого фермента – тирозингидроксилазы (Fernstrom, Fernstrom, 2007). Было продемонстрировано, что гипоксия регулирует активность тирозингидроксилазы на уровне экспрессии гена (Millhorn et al., 1997; Raymond, Millhorn, 1997; Lim, J. et al., 2015), а также, вероятно, влияет на активность уже присутствующего в клетке фермента (Lazar, Barchas, 1982). Таким образом, есть ещё один механизм, способный влиять на содержание свободного тирозина в определённых тканях, и оказывать влияние на межорганный обмен этой АК.

На основе проведенного нами анализа данных изменений уровней фенилаланина и тирозина на фоне острой нормобарической гипоксии можно сделать заключение, что статус питания добровольцев, участвовавших в исследовании (после лёгкого низкожирового завтрака или натошак) оказывает значительное влияние на динамику этих АК в гипоксическом периоде и в восстановительном периоде. В первой группе значимых изменений этих АК не наблюдалось. Во второй группе было выявлено значимое повышение уровней как фенилаланина, так и тирозина при гипоксии. Эти изменения во второй группе, как мы полагаем, были вызваны активацией процессов аутофагии в тканях на фоне гипоксии и увеличением

высвобождения этих АК в плазму. В то же время определённые различия в динамике этих двух АК были, по всей видимости, обусловлены вовлечением в процесс специфических метаболических путей фенилаланина и тирозина. В пользу этого говорит динамика корреляционной связи между показателями этих АК.

4.8. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободной глутаминовой кислоты плазмы крови добровольцев во второй группе

Наличие у глутаминовой кислоты множества очень активных метаболических путей, сильно усложняет анализ полученных нами результатов (рисунок 28). Глутамат активно участвует в работе различных метаболических систем и в шунтировании субстратов из одних систем в другие: реакциях трансаминирования, поставляющих субстраты для специфических метаболических путей различных АК; транспорте аммиака и синтезе мочевины; шунте, объединяющем метаболизм АК и углеводов (Synober, 2004).

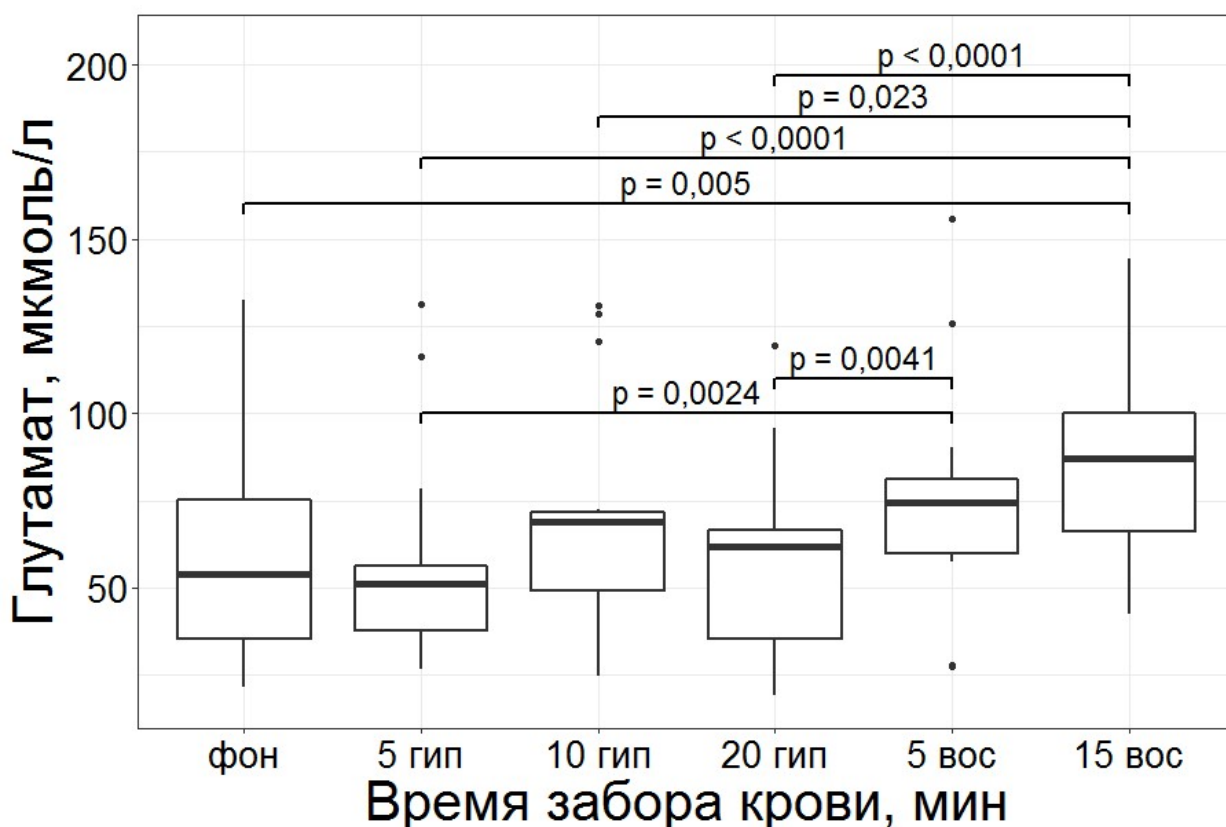


Рисунок 29 – Динамика уровней свободной глутаминовой кислоты плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Во второй группе в гипоксическом периоде мы наблюдали только статистически незначимые изменения уровня свободной глутаминовой кислоты плазмы крови. У добровольцев в этой группе (участвовавших в гипоксическом исследовании натошак) при воздействии гипоксии уровни свободного глутамата плазмы крови повышались на 10-ой минуте гипоксии (рисунок 29) и затем умеренно снижались на 20-ой минуте гипоксии ($p > 0,05$).

В восстановительном периоде динамика изменений была иной. К 5-й минуте восстановления уровни свободного глутамата во второй группе

значимо увеличились по сравнению с 5-й минутой ($p = 0,0024$) и 20-й минутой гипоксии ($p = 0,0041$). На 15-й минуте восстановительного периода уровни свободной глутаминовой кислоты плазмы были статистически значимо выше, чем до начала гипоксии (фон, $p = 0,005$), на 5-й минуте гипоксии ($p < 0,0001$), 10-й минуте ($p = 0,023$) и 20-й минуте гипоксии ($p < 0,0001$).

В литературе имеется множество наблюдений повышения внеклеточного содержания глутамата в ответ на гипоксическое воздействие, однако они касаются процессов, протекающих в ЦНС (Foran, Trotti, 2009; Kirschner et al., 2009). В нервной системе изменения внеклеточной концентрации глутаминовой кислоты связывают с нарушением обратного захвата этого медиатора нейронами и клетками глии на фоне вызванной гипоксией активации глутаматергических нейронов (Mandel, Schreihof, 2009). Однако, межклеточное пространство ЦНС отграничено от системного кровотока гематоэнцефалическим барьером, концентрация глутамата в межклеточном пространстве ЦНС в 25-100 раз ниже, чем в плазме крови, перенос АК через ГЭБ происходит при помощи белков-транспортёров, а общее количество выделяемого в синаптическую щель глутамата недостаточно для значимого повышения системного уровня этой АК в плазме, даже если предположить активную миграцию данного метаболита через ГЭБ (Hawkins, 2009).

При обсуждении АК, уровни которых во второй группе значимо изменялись в гипоксическом периоде (пролин, гидроксипролин, глицин, фенилаланин, тирозин) были высказаны предположения, что наблюдаемая динамика этих АК обусловлена гипоксической активацией процессов коллагенолиза и аутофагии. Однако динамика изменений уровней свободной глутаминовой кислоты плазмы во второй группе (даже при наличии видимой тенденции увеличения уровня на 10-ой минуте гипоксии) заметно отличалась от наблюдавшейся у вышеперечисленных АК (рисунок 29). Отличалась она и

от динамики АК в первой группе, где в восстановительном периоде наблюдалось значимое снижение уровней трёх других свободных АК плазмы: глутамина, аланина и гистидина.

В первой группе добровольцев уровень свободного глутамата не демонстрировал значимых изменений в гипоксическом периоде ($p > 0,05$). Также, не было выявлено значимой динамики этой АК в восстановительном периоде ($p > 0,05$, рисунок 30).

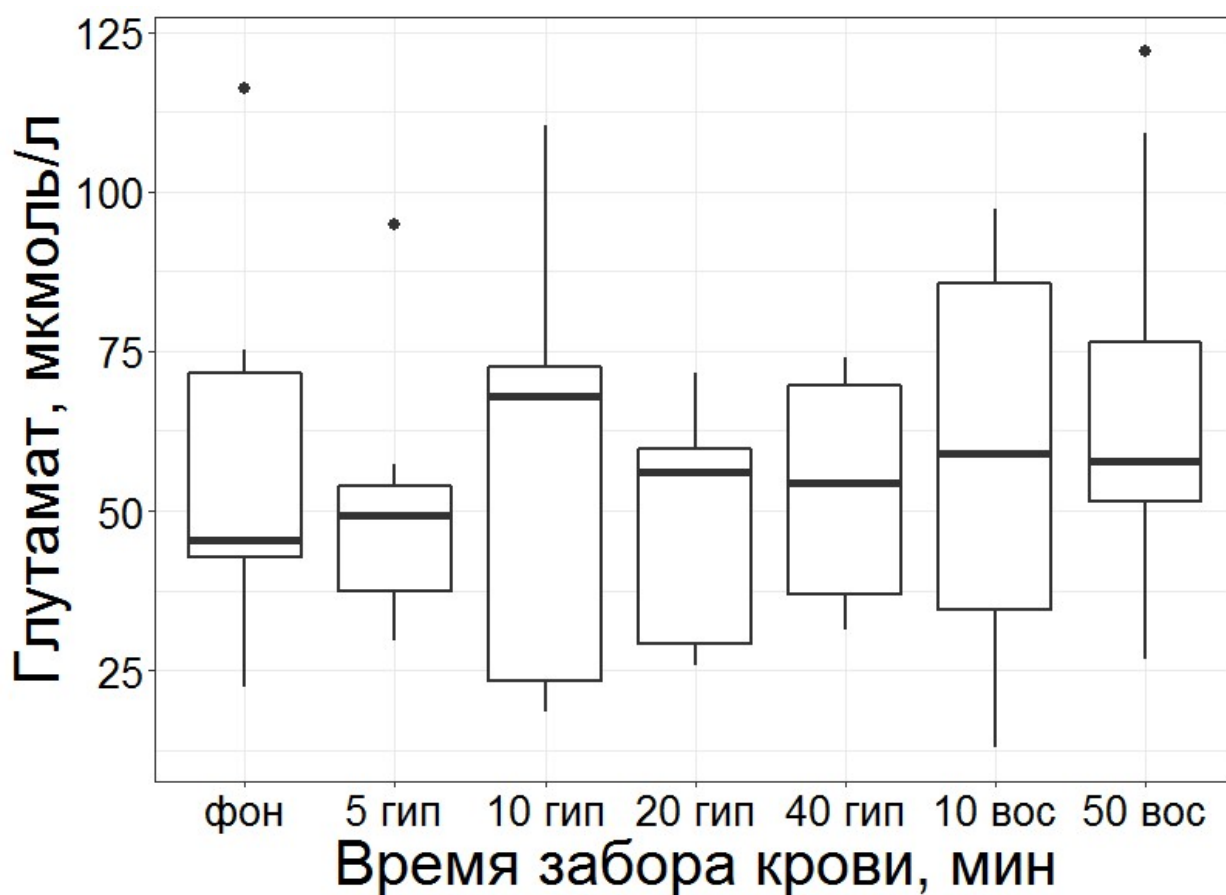


Рисунок 30 – Динамика уровней свободной глутаминовой кислоты плазмы крови у добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

Как уже говорилось, вследствие сложности и большого числа взаимосвязей метаболических путей, в которые вовлечена глутаминовая кислота, анализировать её динамику весьма сложно. Метаболизм глутамата с одной стороны «завязан» на обмен нутриентов и других соединений между различными органами и системами, а с другой стороны своеобразно «разграничен» между тканями, клетками, и, вероятно, отдельными компартментами клетки, в результате чего межорганный обмен этой АК может быть относительно ограничен (Cunober, 2018). Помимо этого, было показано, что гипоксия подавляет активность ферментов-трансаминаз, что в принципе могло снижать поступление глутамата из катаболических путей других АК (Cepelak et al., 2006). Сочетание этих факторов может объяснять наблюдаемую картину динамики этой свободной АК в гипоксическом периоде.

В восстановительном периоде во второй группе мы наблюдали значимое повышение уровней свободного глутамата в плазме. Вероятнее всего, это было связано с активацией процессов трансаминирования АК, в которых глутамат, а точнее пара глутамат- α -кетоглутарат является ключевым донором и акцептором аминогрупп (Brosnan, John T., 2000). Более того, известно, что гипоксия активирует процессы аутофагии (Kroemer et al., 2010; Lai et al., 2016), коллагенолиза (Bauer et al., 2010). Эти процессы при гипоксии и других экстремальных состояниях имеют адаптивное значение, снабжают клетки свободными АК и поддерживают их жизнеспособность (Ryter et al., 2013). Утилизация избытка свободных АК требует их трансаминирования для удаления аминогруппы, акцептором которой очень часто является уже упомянутая пара глутамат- α -кетоглутарат. На фоне восстановления нормальной оксигенации тканей должны растормаживаться и ферменты-трансаминазы. Таким образом, одновременно наличествуют

метаболический запрос и функциональная возможность этот запрос удовлетворить.

Следовательно, значимое повышение свободного глутамата в восстановительном периоде во второй группе было, вероятнее всего, вызвано активацией процессов трансаминции АК в клетках и повышенным выходом наработанной в этих реакциях глутаминовой кислоты в кровь.

4.9. Влияние острой нормобарической гипоксии на уровни свободного метионина плазмы крови добровольцев в обеих группах

Незаменимая АК метионин относится к серосодержащим АК, которые, благодаря общности метаболических путей и исполняемых функций, выделяются в отдельную группу среди всех протеиногенных АК (Synober, 2004).

Примечательно, что динамика уровней свободного метионина плазмы крови была сходной в первой и второй группах добровольцев. В обеих группах в гипоксическом периоде не было выявлено статистически значимых изменений показателей свободного метионина ($p > 0,05$). Зато в восстановительном периоде в первой группе (рисунок 31) было выявлено значимое снижение свободного метионина на 10-й минуте восстановления по сравнению с 10-й минутой гипоксии ($p = 0,047$) и 40-й минутой гипоксии ($p = 0,031$).

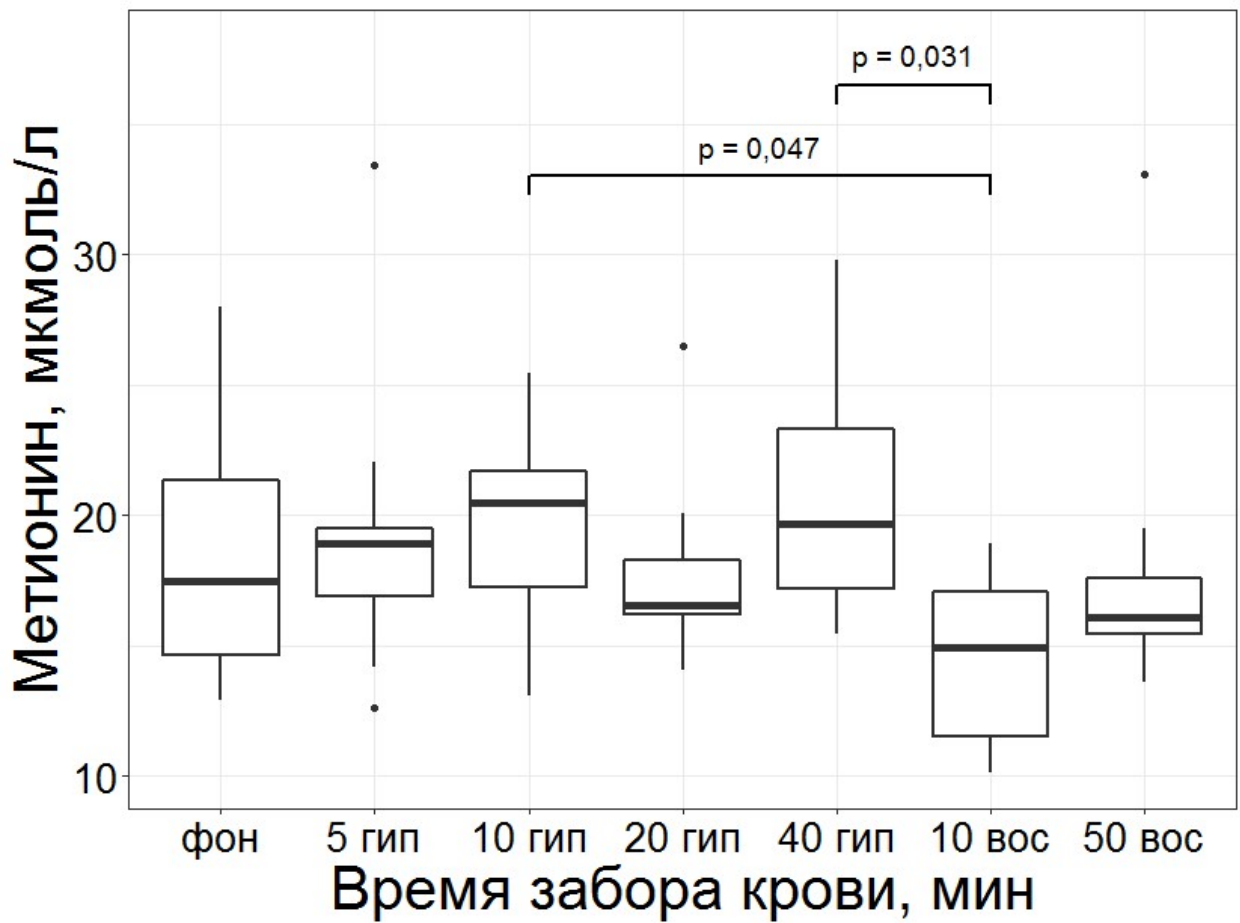


Рисунок 31 – Динамика уровней свободного метионина плазмы крови у добровольцев в первой группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута, 40 гип – 40-я минута гипоксии, 10 вос – 10-я минута восстановления, 50 вос – 50-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

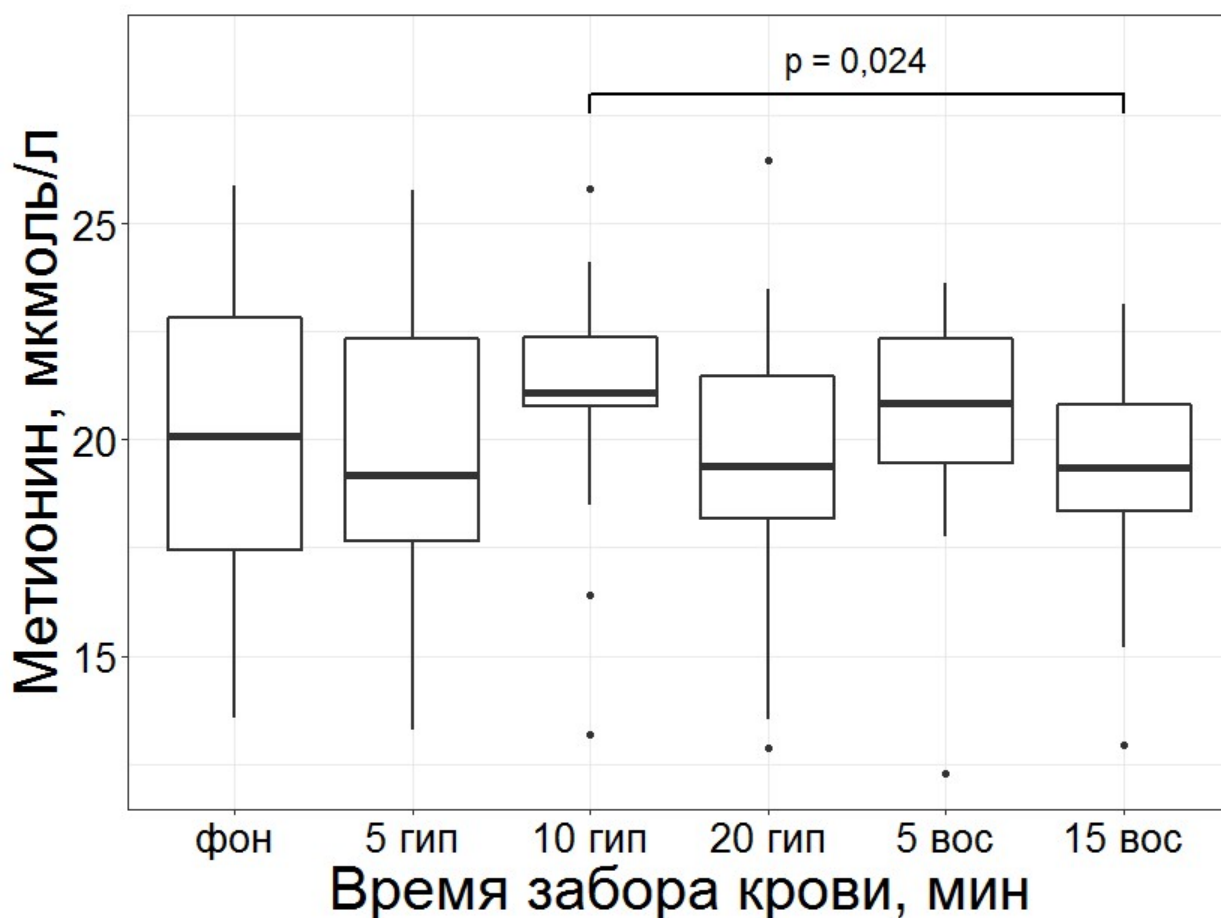


Рисунок 32 – Динамика уровней свободного метионина плазмы крови у добровольцев во второй группе, мкмоль/л. Время забора крови: фон – до начала гипоксии, 5 гип – 5-я минута гипоксии, 10 гип – 10-я минута, 20 гип – 20-я минута гипоксии, 5 вос – 5-я минута восстановления, 15 вос – 15-я минута восстановления. Значимость различий согласно критерия Коновера с поправкой Бенджамини-Хохберг для множественных сравнений.

В то же время, у добровольцев во второй группе на 15-ой минуте восстановительного периода уровень свободного метионина значительно снижался по сравнению с 10-ой минутой гипоксии ($p=0,024$; рисунок 32).

Следует отметить, что в литературе приводятся противоречивые данные о влиянии гипоксии на профиль серосодержащих АК плазмы крови. В одном исследовании было продемонстрировано статистически значимое снижение уровня свободного метионина и многих других АК в результате

гипоксического воздействия (Albekairi, 1989). В другой, более поздней работе было указано на отсутствие каких-либо значимых изменений уровня свободного метионина плазмы в ответ на воздействие острой нормобарической гипоксии (Muratsubaki, Yamaki, 2011). В третьей работе было продемонстрировано повышение уровней почти всех свободных АК плазмы крови, включая метионин, на фоне гипоксического воздействия (Bondoli et al., 1980). Следует отметить, что во всех этих исследованиях объектом эксперимента являлся не человек, а различные лабораторные животные. Исследований эффектов гипоксии на профиль свободных АК плазмы крови человека встречаются значительно реже. Так, в одной работе, посвящённой эффектам гипобарической (высотной гипоксии) было выявлено повышение уровней свободного метионина после определённого времени, проведённого на высокогорье (Liao et al., 2016).

Метионин, вместе с другой серосодержащей АК, цистеином, играет важную роль в антиоксидантной защите организма (Brosnan, J. T., Brosnan, 2006). Метаболизм этих АК связан – один из ключевых метаболических путей метионина приводит к синтезу цистеина (Di Buono et al., 2003). Метионин в первую очередь является «внутрибелковым антиоксидантом» (Moskovitz, 2005), в то время как цистеин и его производные непосредственно участвуют в синтезе одного из ключевых антиоксидантов – глутатиона. Однако, с практической точки зрения определение свободного цистеина представляет большую проблему, поскольку в плазме крови он активно превращается в цистин (Synober, 2004).

Глутатион является одним из важнейших антиоксидантов, причём не только у человека и животных, но и у растений, некоторых бактерий и архей (Rompella et al., 2003). Глутатион не только принимает участие в работе ферментативных антиоксидантных систем, но и сам служит скавенджером активных форм кислорода; по сути дела глутатион определяет окислительно-восстановительный статус внутриклеточной среды (Struzyńska et al., 2005).

Состояние процессов свободно-радикального окисления при гипоксии остаётся сложным вопросом. Известно, что гипоксия вызывает оксидативный стресс и увеличивает генерацию свободных радикалов в клетках (Clanton, 2007; Debevec et al., 2017). Также гипоксия снижает содержание глутатиона в клетках, вероятнее всего вследствие активного расходования, а также подавления в условиях гипоксии активности ферментов синтеза глутатиона (Jackson, Gupta, 2010). Одним из ключевых субстратов для синтеза глутатиона является цистеин, который может поступать из двух источников – клеточного пула свободного цистеина и транссульфурирующего пути метаболизма метионина, а именно реакций, нарабатывающих гомоцистеин (Mosharov et al., 2000). Синтез цистеина из метионина имеет очень важное значение для целого ряда клеток и тканей (Mosharov et al., 2000).

Упомянутый выше специфический метаболизм метионина обычно описывается в виде двух метаболических путей: трансметилирующий и транссульфурирующий. Первый из них, трансметилирующий, также называют «циклом метионина» (рисунок 33). Первая реакция этого цикла синтезирует S-аденозилметионин, основной трансметилирующий агент в клетке, участвующий во множестве реакций как донор метильной группы (Martinov et al., 2010; Shen et al., 2020). Четвёртая реакция цикла осуществляет регенерацию метионина из гомоцистеина. Этот последний этап выступает как своеобразный «переключатель» между «циклом метионина» и вторым специфическим путём метаболизма метионина – транссульфурирующим (Brosnan, J. T., Brosnan, 2006).

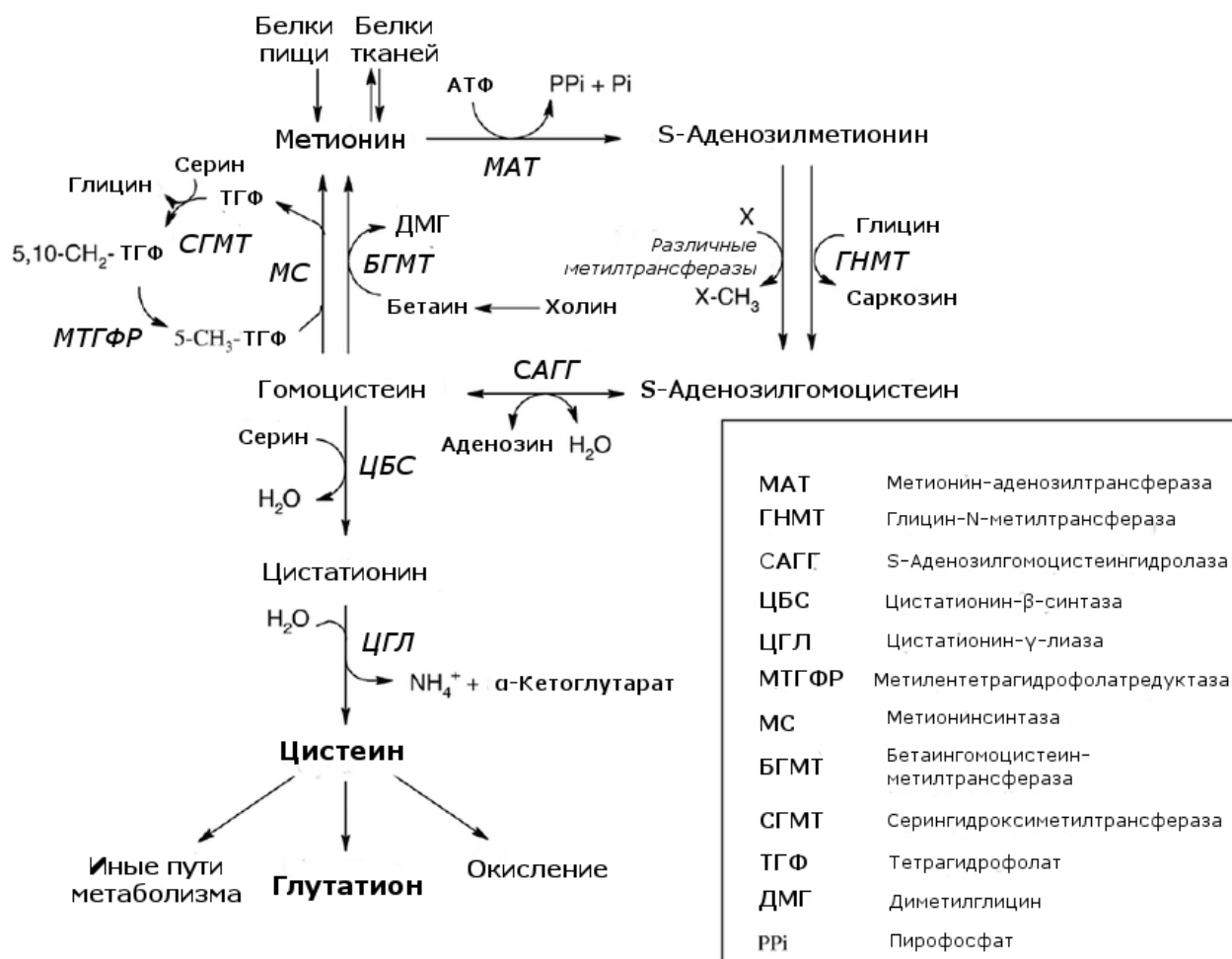


Рисунок 33 – Схема основных метаболических путей серосодержащих аминокислот (по Brosnan J.T., Brosnan M.E., 2006, с изменениями).

Известно, что катаболизм метионина, осуществляющийся последовательно через оба его основных метаболических пути, контролируется по типу отрицательной обратной связи: отношение транссульфурируемой и реметилируемой фракций гомоцистеина зависит от концентрации продуктов катаболизма, в частности – концентрации цистеина (Di Vuono et al., 2003). Избыток цистеина делает более предпочтительным ресинтез метионина, недостаток – синтез цистеина.

Регуляция цикла метионина осуществляется в первую очередь за счёт регуляции работы первого фермента – метионин-аденозилтрансферазы – активность которого снижается при гипоксии (Avila et al., 1998; Corrales et al., 1999). Доступность внутриклеточного цистеина – определяющий фактор

для синтеза глутатиона, поскольку внутриклеточная концентрация цистеина регулирует скорость первой реакции синтеза, катализируемой глутамат-цистеинлигазой (Lu, S. C., 2009; Yu, Long, 2016). При этом есть сообщения, что гипоксия сама снижает активность ключевых ферментов синтеза глутатиона (Jackson, Gupta, 2010).

Гипоксия, вероятно за счёт оксидативного стресса, снижает уровни восстановленного глутатиона и, вероятно, общее его содержание в клетках (Baitharu et al., 2014), и вероятно также, за счёт оксидативного стресса, создаёт клеточный «запрос» на синтез глутатиона *de novo*. Однако, то же самое гипоксическое воздействие способно подавлять синтез глутатиона за счёт как минимум двух механизмов: снижения активности ферментов, непосредственно синтезирующих глутатион, и снижения доступности цистеина вследствие ингибирования метаболизма метионина, как было указано выше.

Таким образом, есть как минимум два механизма, которые вместе или по отдельности могут объяснять то, что у добровольцев в обеих группах не наблюдалось значимых изменений уровня свободного метионина плазмы в гипоксическом периоде. В то же время, наблюдавшееся достоверное снижение уровня свободного метионина в восстановительном периоде может объясняться формированием своеобразного «отсроченного запроса» на глутатион вследствие воздействия гипоксии на клетки (Jackson, Gupta, 2010). Восстановление нормального парциального давления кислорода в тканях после прекращения дыхания гипоксической газовой смесью устранило ингибирующее влияния гипоксии на ферменты метаболизма метионина и ферменты синтеза глутатиона. В этих условиях можно предположить, что внутриклеточный пул метионина будет активно расходоваться на синтез цистеина, который в свою очередь будет активно потребляться для синтеза глутатиона. В результате концентрация метионина в клетках снижается вследствие уменьшения регенерации его из гомоцистеина, который активно

потребляется на синтез цистеина (Di Buono et al., 2003). Клетки активно захватывают метионин из межклеточного пространства, что в итоге, вероятно, и привело к наблюдаемому снижению уровня этой свободной АК в плазме крови в обеих группах, проходивших гипоксическое тестирование.

Особое внимание обращает на себя тот факт, что метионин – АК, которая демонстрировала сходную динамику в обеих группах добровольцев, в отличие от других АК в нашем исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе нами проведён анализ имеющейся информации о физиологической роли и функциях отдельных аминокислот, о различных типах гипоксии, о физиологическом ответе на гипоксическое воздействие со стороны основных органов и систем организма человека. Опираясь на этот анализ, мы обосновали необходимость более глубокого и разностороннего изучения метаболической адаптации организма к воздействию гипоксии, включая изменения в обмене аминокислот.

Поскольку у человека отсутствует «истинное депо» аминокислот, подобное депо глюкозы (гликоген) или липидов (триглицериды жировой ткани), его функции исполняют структурные и функциональные белки клеток и межклеточного вещества. В этих условиях очень важным для межорганного транспорта и обмена является пул свободных аминокислот плазмы крови. Согласно имеющимся в литературе данным, этот пул регулируется в достаточно строгих пределах, поэтому можно предположить, что любые значимые изменения в нём отражают заметные перестройки в метаболизме и транспорте аминокислот в тканях.

Высотная гипоксия – одна из наиболее важных с практической точки зрения разновидностей гипоксии. В то же время высотная гипоксия в природных условиях, а также наиболее близкая к ней модель барокамерной гипоксии, сопровождаются воздействием дополнительных факторов: сниженного барометрического давления, температуры, влажности воздуха. Все эти факторы также оказывают сильное влияние на организм человека, а потому затрудняют анализ «чистых» эффектов гипоксии. Поэтому мы посчитали оптимальной на данном этапе работы нормобарическую модель острой гипоксии, поскольку с помощью неё возможно предъявление изолированного гипоксического стимула.

В настоящей работе представлены результаты двух серий гипоксических исследований с применением модели острой нормобарической гипоксии ГГС-9 (гипоксическая газовая смесь, содержащая 9% O₂ по объёму). Две серии различались по длительности гипоксии. В первой серии добровольцы подвергались воздействию гипоксии в течение 45 минут, поэтому первая группа подвергалась воздействию гипоксии после лёгкого низкожирового завтрака. По результатам первой серии было принято решение снизить продолжительность гипоксии до 25 минут, что позволило добровольцам во второй группе проходить гипоксическое тестирование натощак.

Благодаря этим различиям между группами, нами было выявлено, что фактор питания оказывает значимое влияние на динамику свободных аминокислот в плазме крови при гипоксии. В первой группе, подвергавшейся воздействию гипоксии после лёгкого низкожирового завтрака, нами не было выявлено значимых изменений уровней свободных аминокислот плазмы крови на протяжении 45 минут гипоксии. Мы полагаем, что поступление нутриентов из ЖКТ в постпрандиальном периоде могло оказать своеобразное стабилизирующее воздействие на обмен аминокислот. В то же время, при сравнении уровней свободных аминокислот плазмы крови в первой и второй

(натошакковой) группах в течение первых 20 минут гипоксии, нами были выявлены статистически значимые различия по уровням свободных глутамина, серина, треонина и гистидина.

Две из этих аминокислот: треонин и гистидин – являются незаменимыми, две других: глутамин и серин – заменимыми. Все четыре аминокислоты являются обменными субстратами трёх важных систем трансмембранного переноса аминокислот: ASCT1 (SLC1A4), ASCT2 (SLC1A5) и LAT1 (SC7A5). Важность этих транспортёров заключается в том, что, работая по принципу антипорта (отсюда и обменные субстраты), они способны компенсировать дефицит различных аминокислот, в первую очередь незаменимых, в клетках. Исходя из этого, значимо более высокие концентрации глутамина, серина, треонина и гистидина в плазме крови добровольцев из второй группы, по нашему мнению, свидетельствовали об активизации работы этих транспортёров. На наш взгляд это дополнительно подтверждает предположение, что фактор питания оказывает влияние на транспорт и метаболизм аминокислот при острой гипоксии.

Уже в восстановительном периоде после гипоксического воздействия в первой группе добровольцев наблюдалось снижение уровней свободных глутамина, аланина и гистидина плазмы крови, подобных которым не наблюдалось в восстановительном периоде во второй группе. Изолированные изменения концентраций двух заменимых и одной незаменимой аминокислот, по нашему мнению, свидетельствуют о вовлечении специфических для них метаболических путей. Так, наблюдаемые изменения аланина, вероятнее всего, были связаны со снижением активности глюкозо-аланинового челнока, переносящего аммиак и субстраты глюконеогенеза из мышц в печень, а глюкозу – из печени в мышцы. Изменения содержания свободного глутамина были, вероятнее всего, вызваны изменением его метаболизма в тканях, активно захватывающих эту аминокислоту, например, желудочно-кишечном тракте. Снижение содержания свободного гистидина,

вероятнее всего, было связано с изменением его потребления в клетках на синтез биологически активных веществ (в первую очередь гистамина), карнозина, а также работу трансмембранных переносчиков.

Специфические для второй группы добровольцев (25 минут гипоксии ГГС-9, строго натошак) изменения свободных аминокислот в гипоксическом периоде включали повышение концентраций свободных пролина, гидроксипролина, глицина, фенилаланина и тирозина плазмы крови. По нашему мнению механизмы, стоявшие за этими изменениями, были одновременно различны и сходны. Пролин, гидроксипролин и глицин – ключевые аминокислоты в составе основных белков соединительной ткани и межклеточного вещества, коллагенов. Из ранее проведённых исследований нам известно, что гипоксия активирует процессы коллагенолиза в тканях. Нам также известно, что пролин может использоваться для альтернативного пути генерации АТФ при гипоксии, глицин обладает цитопротективными свойствами при гипоксии, а гидроксипролин может служить субстратом для синтеза других соединений, в том числе для энергетического метаболизма в условиях гипоксии. Таким образом, мы полагаем, что наблюдаемые изменения уровней этих трёх аминокислот у добровольцев из второй группы были связаны с активацией коллагенолиза в тканях, и что этот процесс может иметь адаптивное значение при гипоксии.

Значимое повышение концентрации свободного фенилаланина (и тирозина) в плазме крови добровольцев из второй группы, было, вероятно, вызвано активацией аутофагии в клетках. Аутофагия – разрушение собственных структурных и функциональных белков клетки – имеет как адаптивное, физиологическое, а также патологическое значение. Именно благодаря регулируемой аутофагии внутриклеточные белки могут служить своеобразным «депо» аминокислот. Гипоксия вызывает активацию аутофагии, которая в данном случае имеет адаптивное значение, поскольку

снабжает клетки свободными аминокислотами, которые утилизируются как энергетические и пластические субстраты.

В этом случае проявляется физиологическое сходство двух разных процессов: коллагенолиза и аутофагии. Оба активируются в ответ на острое гипоксическое воздействие и приводят к значимому увеличению уровней ряда свободных аминокислот плазмы крови во время гипоксии. Также доступность нутриентов (статус питания добровольцев), по всей видимости, оказывает значительное влияние на эти процессы, поскольку у добровольцев из первой группы (45 минут гипоксии ГГС-9, после лёгкого низкожирового завтрака), несмотря на большую длительность гипоксического воздействия, мы не наблюдали подобных изменений свободных АК.

В восстановительном периоде после острой нормобарической гипоксии во второй группе мы наблюдали значимое увеличение концентрации свободной глутаминовой кислоты плазмы крови. Мы полагаем, что оно было вызвано активацией процессов транс- и дезаминирования свободных аминокислот, накопленных за время гипоксии, поскольку пара глутамат- α -кетоглутарат является основным донором-акцептором аминогрупп в этих реакциях. У добровольцев из первой группы не наблюдалось подобного изменения концентрации этой аминокислоты, что согласуется с вышесказанным: поступление нутриентов из ЖКТ сдерживает активацию процессов аутофагии и коллагенолиза на фоне гипоксии, в результате чего высвобождается меньше свободных аминокислот. Вследствие этого в первой группе была меньше потребность и их утилизации, требующей в большинстве случаев транс- и дезаминирования, а потому не наблюдалось значимого повышения уровня свободного глутамата плазмы крови.

Единственная аминокислота, изменения которой были схожи в обеих группах добровольцев – серосодержащая незаменимая аминокислота метионин. Метионин, с одной стороны, критически важен для реакций обмена одноуглеродных групп, а с другой – для работы антиоксидантных

систем организма. Гипоксия, как известно из данных литературы, с одной стороны увеличивает интенсивность процессов перекисного окисления, приводя к оксидативному стрессу, а с другой – нарушает нормальную работу антиоксидантных систем за счёт, в частности, снижения активности ферментов синтеза глутатиона. Глутатион – один из ключевых антиоксидантов у человека и других видов; доступность аминокислоты цистеина считается одним из лимитирующих факторов синтеза глутатиона. При этом имеются свидетельства, что значительное количество цистеина, уходящего на синтез глутатиона, в свою очередь синтезируется из метионина, через его трансметилирующий и транссульфурирующий метаболические пути. Поэтому мы предполагаем, что наблюдавшееся в обеих группах добровольцев значимое снижение уровней свободного метионина плазмы крови свидетельствовало об активной утилизации этой аминокислоты клетками для синтеза цистеина и глутатиона. Изменения наблюдались именно в восстановительном, а не в гипоксическом периоде, поскольку гипоксия подавляет не только синтез глутатиона, но и метаболизм метионина. Примечательно, что доступность нутриентов не оказала влияния на динамику концентрации этой аминокислоты в обеих группах, поскольку и в первой (гипоксия после лёгкого низкожирового завтрака), и во второй (гипоксия натощак) группах добровольцев динамика изменений уровней метионина плазмы была сходной.

Таким образом, результаты, представленные в данной работе, позволяют заключить, что острая гипоксия специфически действует на метаболизм ряда аминокислот у человека. Также можно сделать вывод, что алиментарный фактор и доступность нутриентов, поступающих из ЖКТ, модифицируют эффекты гипоксии на профиль свободных аминокислот плазмы крови, в результате чего у двух групп добровольцев, участвовавших в исследовании, характер этих эффектов сильно различался. В то же время, вне зависимости от алиментарного статуса участников исследования, в обеих

группах наблюдалась одинаковая динамика концентрации свободного метионина, аминокислоты, играющей значительную роль в антиоксидантной защите. На наш взгляд это свидетельствует об отсутствии влияния алиментарного фактора на процессы свободнорадикального окисления при острой гипоксии, и, вероятно, о том, что такая реакция является стереотипной и обусловленной в первую очередь интенсивностью гипоксии.

Изложенные в данной работе результаты исследований и их анализ, на наш взгляд, говорят, с одной стороны, о необходимости дальнейшего изучения воздействия острой гипоксии на межорганный транспорт и метаболизм свободных аминокислот. С другой стороны, они могут иметь практическую ценность для медицинской экспертизы и отбора лиц, чья профессиональная деятельность связана с риском воздействия или воздействием острой гипоксии. Дальнейшее изучение влияния гипоксии на обмен аминокислот у человека, в потенциале, может позволить разработать инструменты и подходы к повышению резистентности организма человека к воздействию острой гипоксии, а также к ускорению и облегчению восстановления и реабилитации после таких воздействий.

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 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян Н.А. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии. / Н.А. Агаджанян, А.И. Елфимов – М.: Медицина., 1986. – 272 с.
2. Агаджанян Н.А. Гипоксические, гипокапнические и гиперкапнические состояния. / Н.А. Агаджанян, А.Я. Чижов – М.: Медицина., 2003. – 96 с.
3. Ашмарин И.П. Нейрохимия. / И.П. Ашмарин, Стукалов, П. В. – М: Медицина, 1996. – 469 с.
4. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. / М.В. Биленко – М: Медицина, 1989. – 368 с.
5. Бойко Е.Р. Показатели метаболитов оксида азота у человека при острой нормобарической гипоксии. / Е.Р. Бойко, Э.А. Бурых // Российский физиологический журнал им. И. М.Сеченова. – 2012. – Т. 98, – № 1. – С. 147-154.
6. Бойко Е.Р. Показатели гликемии при выраженной экзогенной острой нормобарической гипоксии у человека в покое. / Е.Р. Бойко, Э.А. Бурых, Н.Н. Потолицына, А.Ю. Людина, Н.А. Вахнина, В.Д. Шадрин, О.И. Паршукова, Л.И. Иржак, Сороко С. И. // Физиология человека. – 2010. – Т. 36, – № 3. – С. 110-116.
7. Быков В.Н. Оценка устойчивости военнослужащих к гипоксии на фоне гипобарии и высокой физической активности. / В.Н. Быков, О.В. Ветряков, В.Н. Цыган, Ю.Ш. Халимов, А.Г. Анохин, И.В. Фатеев, М.В. Калтыгин, О.А. Толстой // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2017. – Т. 59, – № 3. – С. 129-133.
8. Быков Н.П. Влияние газовой гипоксической смеси на функцию органа зрения и зрительно-моторную координацию человека-оператора. / Н.П. Быков // Использование газовых гипоксических смесей для

оптимизации лучевой терапии злокачественных новообразований. – Обнинск: 1984. – С. 58-59.

9. Ветряков О.В. Влияние различных степеней нормобарической гипоксии на физическую работоспособность человека. / О.В. Ветряков, Ю.Ш. Халимов, В.Н. Быков, А.Я. Фисун // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2018. – Т. 62, – № 2. – С. 7-9.
10. Вологжанин Д.А. Белковый обмен и иммунный статус пострадавших при травматической болезни. / Д.А. Вологжанин, А.Е. Сосюкин, Н.М. Калинина, Губанов А.И. // Российский биомедицинский журнал. – 2005. – Т. 6. – С. 530-540.
11. Голубев В.Н. Адаптивные реакции организма человека на воздействие гипоксии / В.Н. Голубев, Ю.Н. Королев, Н.В. Мургаева, К.Г. Стрельцова // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2019. – Т. 38, – № 3. – С. 178-182.
12. Евсеева М.А. Механизмы развития острой гипоксии и пути её фармакологической коррекции. / М.А. Евсеева, А.В. Евсеев, В.А. Правдивцев, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2008. – Т. 6, – № 1. – С. 3-25.
13. Загрядский В.П. Газообмен при гиперкапнии в условиях различного содержания кислорода / В.П. Загрядский, З.К. Сулимо-Самуйло // Косм. биол. и авиакосм. мед. – 1975. – Т. 9, – № 5. – С. 61-65.
14. Караш Ю.М. Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации. / Ю.М. Караш, Р.Б. Стрелков, А.Я. Чижов – М.: Медицина., 1988. – 352 с.
15. Ковалев Г.В. Фармакология кардиотонических средств. / Г.В. Ковалев, В.И. Петров, К.Г. Гурбанов – Москва: АМН СССР, 1988. – 288 с.
16. Колчинская А.З. О классификации гипоксических состояний. / А.З. Колчинская // Патофизиол. и эксперим. терапия. – 1981. – № 4. – С. 3-10.

17. Кулинский В.И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы. / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, – № 1. – С. 107-123.
18. Лукьянова Л.Д. Методические рекомендации к экспериментальному изучению препаратов, предназначенных для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. / Л.Д. Лукьянова – М., 1990. – 18 с.
19. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: Понятие, механизмы и способы коррекции / Л.Д. Лукьянова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1997. – Т. 124, – № 9. – С. 244-254.
20. Новиков В.С. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. / В.С. Новиков, Е.Б. Шустов, В.В. Гаранчук – СПб.: Наука, 1998. – 544 с.
21. Рыжков И.А. Влияние циркуляторной и гемической гипоксии на микроциркуляцию в коже / И.А. Рыжков, Ю.В. Заржецкий // Регионарное кровообращение и микроциркуляция –2018. – Т. 17, – № 2. – С. 64-70.
22. Сороко С.И. Индивидуальные особенности системных реакций организма человека на острую гипоксию / С.И. Сороко, С.С. Бекшаев, В.П. Рожков, Е.Р. Бойко // Российский физиологический журнал им. И. М.Сеченова. – 2012. – Т. 98, – № 11. – С. 1396-1415.
23. Сосин Д.В. Механизмы формирования острой экзогенной гипоксии и возможности ее фармакологической коррекции антигипоксантами / Д.В. Сосин, О.Е. Шалаева, А.В. Евсеев, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т. 13, – № 1. – С. 3-24.
24. Ушаков И.Б. Современные аспекты проблемы гипоксии в теории и практике высотной физиологии и авиационной медицины. / И.Б. Ушаков, В.М. Усов, М.В. Дворников, И.В. Бухтияров // В кн.:

- Проблемы гипоксии: Молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. / Лукьянова Л. Д., Ушаков И. Б. – М.: Истоки, 2004. – С. 170-200.
25. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Р.У. Хабриев – 2-е изд. изд. – М.: Издательство "Медицина", 2005. – 832 с.
 26. Чалисова Н.И. Регуляторное влияние кодируемых аминокислот на основные клеточные процессы у молодых и старых животных / Н.И. Чалисова, Е.А. Концевая, М.А. Войцеховская, А.В. Комашня // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, – № 2. – С. 189-197.
 27. Черных А.А. Метаболизм ароматических аминокислот при выраженной острой кратковременной экспериментальной нормобарической гипоксии у человека. / А.А. Черных // Экология человека. – 2013. – № 7. – С. 59-64.
 28. Шабанов П.Д. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. / П.Д. Шабанов, А.А. Лебедев, Ш.К. Мещеров – СПб.: Лань, 2002. – 208 с.
 29. Adams E. Metabolism of proline and the hydroxyprolines / E. Adams, L. Frank // Annu Rev Biochem. – 1980. – V. 49. – P. 1005-10061.
 30. Adeva-Andany M. Insulin resistance and glycine metabolism in humans / M. Adeva-Andany, G. Souto-Adeva, E. Ameneiros-Rodríguez, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García, A. Domínguez-Montero // Amino Acids. – 2018. – V. 50, – № 1. – P. 11-27.
 31. Adeva-Andany M.M. Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans / M.M. Adeva-Andany, L. López-Maside, C. Donapetry-García, C. Fernández-Fernández, C. Sixto-Leal // Amino Acids. – 2017. – V. 49, – № 6. – P. 1005-1028.
 32. M.M. Adeva-Andany, N. Pérez-Felpete, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García, C. Pazos-García. Liver glucose metabolism in humans /

- M.M. Adeva-Andany, N. Pérez-Felpete, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García, C. Pazos-García // *Biosci Rep.* – 2016. – V. 36, – № 6.
33. Ahlmann-Eltze C. Ggsignif: Significance brackets for 'ggplot2'. R package version 0.6.0. // Book Ggsignif: Significance brackets for 'ggplot2'. R package version 0.6.0. / Editor, 2020. – C. R package version 0.6.0.
 34. Albekairi A.M. Effect of hypoxia and or cold stress on plasma and brain amino-acids in rat / A.M. Albekairi // *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology.* – 1989. – V. 64, – № 2. – P. 287-297.
 35. Alberti K.G. The biochemical consequences of hypoxia. / K.G. Alberti // *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* – 1977. – V. 11. – P. 14-20.
 36. Aledo J.C. Glutamine breakdown in rapidly dividing cells: Waste or investment? / J.C. Aledo // *Bioessays.* – 2004. – V. 26. – P. 778-785.
 37. Amaral F.G.D. A brief review about melatonin, a pineal hormone / F.G.D. Amaral, J. Cipolla-Neto // *Arch Endocrinol Metab.* – 2018. – V. 62, – № 4. – P. 472-479.
 38. Aristoy M.C. Deproteinization techniques for hplc amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham / M.C. Aristoy, F. Toldra // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1991. – V. 39, – № 10. – P. 1792-1795.
 39. Aussel C. Plasma branched-chain keto acids in burn patients / C. Aussel, L. Cynober, N. Lioret, C. Coudray-Lucas, M. Vaubourdolle, R. Saizy, J. Giboudeau // *Am J Clin Nutr.* – 1986. – V. 44, – № 6. – P. 825-831.
 40. Avila M.A. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. / M.A. Avila, M.V. Carretero, E.N. Rodriguez, J.M. Mato // *Gastroenterology.* – 1998. – V. 114, – № 2. – P. 364-371.
 41. Badzhinian S.A. Changes in structural and functional properties of the erythrocyte membrane under the action of ionizing radiation / S.A.

- Badzhinian, P.A. Kazarian, S.E. Akopov, A.V. Saarian // *Radiats Biol Radioecol.* – 1995. – V. 35, – № 3. – P. 364-369.
42. Bailey D.M. Continuous and intermittent exposure to the hypoxia of altitude: Implications for glutamine metabolism and exercise performance / D.M. Bailey, L.M. Castell, E.A. Newsholme, B. Davies // *British Journal of Sports Medicine.* – 2000. – V. 34, – № 3. – P. 210-212.
 43. Bailey D.M. Physical exercise and normobaric hypoxia: Independent modulators of peripheral cholecystokinin metabolism in man / D.M. Bailey, B. Davies, L.M. Castell, E.A. Newsholme, J. Calam // *Journal of Applied Physiology.* – 2001. – V. 90, – № 1. – P. 105-113.
 44. Bailey D.M. A metabolic role for elevated plasma cholecystokinin in the anorexia and weight loss of acute mountain sickness in man? / D.M. Bailey, B. Davies, J.S. Milledge, L.M. Castell, E.A. Newsholme, M. Richards, M. Jordinson, J. Calam // *Journal of Physiology-London.* – 2000. – V. 525. – P. 33P-33P.
 45. Baitharu I. Withanolide a prevents neurodegeneration by modulating hippocampal glutathione biosynthesis during hypoxia / I. Baitharu, V. Jain, S.N. Deep, S. Shroff, J.K. Sahu, P.K. Naik, G. Ilavazhagan // *PLOS ONE.* – 2014. – V. 9, – № 10. – P. e105311.
 46. Barros-Miñones L. Modulation of the ask1-mkk3/6-p38/mapk signalling pathway mediates sildenafil protection against chemical hypoxia caused by malonate / L. Barros-Miñones, L. Orejana, B. Goñi-Allo, V. Suquía, I. Hervías, N. Aguirre, E. Puerta // *Br J Pharmacol.* – 2013. – V. 168, – № 8. – P. 1820-34.
 47. Bastings J.J.A.J. D-amino acids in health and disease: A focus on cancer / J.J.A.J. Bastings, H.M. van Eijk, S.W. Olde Damink, S.S. Rensen // *Nutrients.* – 2019. – V. 11, – № 9. – P. 2205.
 48. Bauer A.T. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. / A.T. Bauer, H.F.

- Bürgers, T. Rabie, H.H. Marti // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2010. – V. 30, – № 4. – P. 837-848.
49. Benjamini Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing / Y. Benjamini, Y. Hochberg // *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* – 1995. – V. 57, – № 1. – P. 289-300.
 50. Bergstrom J. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue / J. Bergstrom, P. Furst, L.O. Noree, E. Vinnars // *J Appl Physiol.* – 1974. – V. 36, – № 6. – P. 693-697.
 51. Bernardino K. Pinpointing disulfide connectivities in cysteine-rich proteins / K. Bernardino, M.E.F. Pinto, V.S. Bolzani, A.F. de Moura, J.M. Batista Junior // *Chem Commun (Camb).* – 2017. – V. 53, – № 53. – P. 7337-7340.
 52. Bhutia Y.D. Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. / Y.D. Bhutia, V. Ganapathy // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – V. 1863, – № 10. – P. 2531-2539.
 53. Billard J.-M. D-amino acids in brain neurotransmission and synaptic plasticity / J.-M. Billard // *Amino Acids.* – 2012. – V. 43, – № 5. – P. 1851-1860.
 54. Bilo G. Blood pressure at high altitude: Physiology and clinical implications / G. Bilo, S. Caravita, C. Torlasco, G. Parati // *Kardiol Pol.* – 2019. – V. 77, – № 6. – P. 596-603.
 55. Black J.C. Histone lysine methylation dynamics: Establishment, regulation, and biological impact / J.C. Black, C. Van Rechem, J.R. Whetstone // *Mol Cell.* – 2012. – V. 48, – № 4. – P. 491-507.
 56. Blomstrand E. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise / E. Blomstrand, J. Eliasson, H.K.R. Karlsson, R. Kohnke // *Journal of Nutrition.* – 2006. – V. 136, – № 1. – P. 269S-273S.

57. Boku S. Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis / S. Boku, S. Nakagawa, H. Toda, A. Hishimoto // *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. – 2018. – V. 72, – № 1. – P. 3-12.
58. Bolam J.P. Histamine and the striatum / J.P. Bolam, T.J. Ellender // *Neuropharmacology*. – 2016. – V. 106. – P. 74-84.
59. Bondoli A. Amino acid distribution in guinea pig plasma, cerebrospinal fluid, and brain tissue in acute experimental hypoxia / A. Bondoli, S.I. Magalini, D. Camaioni, A. Gagliardi, S. Barbi // *Resuscitation*. – 1980. – V. 8, – № 2. – P. 85-93.
60. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia / R.G. Boutilier // *Journal of Experimental Biology*. – 2001. – V. 204, – № 18. – P. 3171-3181.
61. Boutilier R.G. Surviving hypoxia without really dying / R.G. Boutilier, J. St-Pierre // *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*. – 2000. – V. 126, – № 4. – P. 481-490.
62. Breum L. Twenty-four-hour plasma tryptophan concentrations and ratios are below normal in obese subjects and are not normalized by substantial weight reduction / L. Breum, M.H. Rasmussen, J. Hilsted, J.D. Fernstrom // *Am J Clin Nutr*. – 2003. – V. 77, – № 5. – P. 1112-1118.
63. Bröer S. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms / S. Bröer, A. Bröer // *Biochemical Journal*. – 2017. – V. 474, – № 12. – P. 1935-1963.
64. Brosnan J.T. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism / J.T. Brosnan // *The Journal of Nutrition*. – 2000. – V. 130, – № 4. – P. 988S-990S.
65. Brosnan J.T. Interorgan amino acid transport and its regulation / J.T. Brosnan // *Journal of Nutrition*. – 2003. – V. 133, – № 6. – P. 2068S-2072S.

66. Brosnan J.T. The sulfur-containing amino acids: An overview / J.T. Brosnan, M.E. Brosnan // *Journal of Nutrition*. – 2006. – V. 136, – № 6. – P. 1636S-1640S.
67. Bunn H.F. Erythropoietin: A model system for studying oxygen-dependent gene regulation / H.F. Bunn, J. Gu, L.E. Huang, J.W. Park, H. Zhu // *Journal of Experimental Biology*. – 1998. – V. 201, – № 8. – P. 1197-1201.
68. Burnett A.L. Nitric oxide - a physiological mediator of penile erection / A.L. Burnett, C.J. Lowenstein, D.S. Bredt, T.S.K. Chang, S.H. Snyder // *Science*. – 1992. – V. 257, – № 5068. – P. 401-403.
69. Burr S.A. Cyanide / S.A. Burr, Y.L. Leung // In: *Encyclopedia of toxicology* (third edition) – Oxford: Academic Press, 2014. – C. 1093-1095.
70. Buttgereit F. A hierarchy of atp-consuming processes in mammalian cells / F. Buttgereit, M.D. Brand // *Biochemical Journal*. – 1995. – V. 312, – № 1. – P. 163-167.
71. Cabrales P. Low oxygen-affinity hemoglobin solution increases oxygenation of partially ischemic tissue during acute anemia / P. Cabrales // *Journal of the American College of Surgeons*. – 2010. – V. 210, – № 3. – P. 271-279.
72. Calder P.C. Branched-chain amino acids and immunity / P.C. Calder // *Journal of Nutrition*. – 2006. – V. 136, – № 1. – P. 288S-293S.
73. Canepa A. Free amino acids in plasma, red blood cells, polymorphonuclear leukocytes, and muscle in normal and uraemic children. / A. Canepa, J.C. Filho, A. Gutierrez, A. Carrea, A.M. Forsberg, E. Nilsson, E. Verrina, F. Perfumo, J. Bergström // *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. – 2002. – V. 17, – № 3. – P. 413-421.
74. Castell L.M. Biochemical markers of possible immunodepression in military training in harsh environments / L.M. Castell, C.D. Thake, W. Ensign // *Mil Med*. – 2010. – V. 175, – № 3. – P. 158-165.

75. Cepelak I. Enzyme catalytic activities in chronic obstructive pulmonary disease. / I. Cepelak, S. Dodig, D. Romic, N. Ruljancic, S. Popovic-Grle, A. Malic // Arch Med Res. . – 2006. – V. 37, – № 5. – P. 624-629.
76. Chang D.I. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. / D.I. Chang, N. Hosomi, J. Lucero, J.H. Heo, T. Abumiya, A.P. Mazar, G.J. del Zoppo // J Cereb Blood Flow Metab. – 2003. – V. 23, – № 12. – P. 1408-1419.
77. Chatfield M. The skillings-mack test (friedman test when there are missing data) / M. Chatfield, A. Mander // The Stata journal. – 2009. – V. 9, – № 2. – P. 299-305.
78. Chilmonczyk Z. Functional selectivity and antidepressant activity of serotonin 1a receptor ligands / Z. Chilmonczyk, A.J. Bojarski, A. Pilc, I. Sylte // International journal of molecular sciences. – 2015. – V. 16, – № 8. – P. 18474-18506.
79. Clanton T.L. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle / T.L. Clanton // Journal of Applied Physiology. – 2007. – V. 102, – № 6. – P. 2379-2388.
80. Colovic M.B. Sulphur-containing amino acids: Protective role against free radicals and heavy metals / M.B. Colovic, V.M. Vasic, D.M. Djuric, D.Z. Krstic // Curr Med Chem. – 2018. – V. 25, – № 3. – P. 324-335.
81. Comai S. Chapter five - tryptophan in health and disease / S. Comai, A. Bertazzo, M. Brughera, S. Crotti. // In: Advances in clinical chemistry / edit. G. S. Makowski. – Elsevier, 2020. – C. 165-218.
82. Connolly E. Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4e-bp1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mtor and uncoupled in breast cancer cells. / E. Connolly, S. Braunstein, S. Formenti, R.J. Schneider // Mol Cell Biol. – 2006. – V. 26, – № 10. – P. 3955-3965.

83. Cornett E.M. Lysine methylation regulators moonlighting outside the epigenome / E.M. Cornett, L. Ferry, P.A. Defossez, S.B. Rothbart // *Mol Cell*. – 2019. – V. 75, – № 6. – P. 1092-1101.
84. Corrales F.J. In vivo regulation by glutathione of methionine adenosyltransferase s-nitrosylation in rat liver. / F.J. Corrales, F. Ruiz, J.M. Mato // *J Hepatol*. – 1999. – V. 31, – № 5. – P. 887-894.
85. Cross M. Classification of hypoxia / M. Cross, E. Plunkett // In: *Physics, pharmacology and physiology for anaesthetists: Key concepts for the FRCA* – Cambridge: Cambridge University Press, 2014. – C. 226-227.
86. Cruz B. A leucine-rich diet modulates the mtor cell signalling pathway in the gastrocnemius muscle under different walker-256 tumour growth conditions / B. Cruz, A. Oliveira, G. Ventrucchi, M.C.C. Gomes-Marcondes // *BMC Cancer*. – 2019. – V. 19, – № 1. – P. 349.
87. Cruzat V. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation / V. Cruzat, M. Macedo Rogero, K. Noel Keane, R. Curi, P. Newsholme // *Nutrients*. – 2018. – V. 10, – № 11. – P. 1564.
88. Cynober L. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: Characteristics, regulation, and metabolic significance / L. Cynober // *Nutrition*. – 2002. – V. 18, – № 9. – P. 761-766.
89. Cynober L. Metabolic & therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. / L. Cynober – 2nd edition. – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, 2004. – 755 c.
90. Cynober L. Metabolism of dietary glutamate in adults / L. Cynober // *Annals of Nutrition and Metabolism*. – 2018. – V. 73(suppl 5), – № 5. – P. 5-14.
91. D'Aniello A. D-aspartic acid: An endogenous amino acid with an important neuroendocrine role / A. D'Aniello // *Brain Res Rev*. – 2007. – V. 53, – № 2. – P. 215-234.
92. Dang C.V. Oncogenic alterations of metabolism / C.V. Dang, G.L. Semenza // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1999. – V. 24, – № 2. – P. 68-72.

93. Davis K.L. Novel effects of nitric oxide / K.L. Davis, E. Martin, I.V. Turko, F. Murad // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2001. – V. 41. – P. 203-236.
94. de Vijlder J.J.M. Primary congenital hypothyroidism: Defects in iodine pathways / J.J.M. de Vijlder // *European Journal of Endocrinology*. – 2003. – V. 149, – № 4. – P. 247-256.
95. Debevec T. Hypoxia-induced oxidative stress modulation with physical activity / T. Debevec, G.P. Millet, V. Pialoux // *Frontiers in physiology*. – 2017. – V. 8. – P. 84-84.
96. Deijen J.B. Effect of tyrosine on cognitive function and blood pressure under stress / J.B. Deijen, J.F. Orlebeke // *Brain Research Bulletin*. – 1994. – V. 33, – № 3. – P. 319-323.
97. Deijen J.B. Tyrosine improves cognitive performance and reduces blood pressure in cadets after one week of a combat training course / J.B. Deijen, C.J.E. Wientjes, H.F.M. Vullings, P.A. Cloin, J.J. Langefeld // *Brain Research Bulletin*. – 1999. – V. 48, – № 2. – P. 203-209.
98. Dempsey J.A. Humans in hypoxia: A conspiracy of maladaptation?! / J.A. Dempsey, B.J. Morgan // *Physiology (Bethesda)*. – 2015. – V. 30, – № 4. – P. 304-316.
99. Deryck M. Animal-models of cerebral stroke - pharmacological protection of function / M. Deryck // *European Neurology*. – 1990. – V. 30. – P. 21-27.
100. Detmar M. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor vascular endothelial growth factor (vpf/vegf) and its receptors in human skin / M. Detmar, L.F. Brown, B. Berse, R.W. Jackman, B.M. Elicker, H.F. Dvorak, K.P. Claffey // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1997. – V. 108, – № 3. – P. 263-268.
101. Di Buono M. Regulation of sulfur amino acid metabolism in men in response to changes in sulfur amino acid intakes. / M. Di Buono, L.J.

- Wykes, D.E. Cole, R.O. Ball, P.B. Pencharz // J Nutr. – 2003. – V. 133, – № 3. – P. 733-739.
102. Di Lullo G.A. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type i collagen / G.A. Di Lullo, S.M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko, J.D. San Antonio // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 277, – № 6. – P. 4223-4231.
 103. Dickens D. Modulation of lat1 (slc7a5) transporter activity and stability by membrane cholesterol / D. Dickens, G.N. Chiduzza, G.S.A. Wright, M. Pirmohamed, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – P. 43580-43580.
 104. Dillon E.L. Nutritionally essential amino acids and metabolic signaling in aging / E.L. Dillon // Amino Acids. – 2012. – V. 45, – № 3. – P. 431-441.
 105. DiPasquale D.M. Hypoxia, hypobaria, and exercise duration affect acute mountain sickness / D.M. DiPasquale, G.E. Strangman, N.S. Harris, S.R. Muza // Aerosp Med Hum Perform. – 2015. – V. 86, – № 7. – P. 614-619.
 106. Donald S.P. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. / S.P. Donald, X.Y. Sun, C.A. Hu, J. Yu, J.M. Mei, D. Valle, J.M. Phang // Cancer Res. – 2001. – V. 61, – № 5. – P. 1810-1815.
 107. Drabkin H.J. Initiator-elongator discrimination in vertebrate trnas for protein synthesis / H.J. Drabkin, M. Estrella, U.L. Rajbhandary // Mol Cell Biol. – 1998. – V. 18, – № 3. – P. 1459-1466.
 108. Drummond M.J. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis / M.J. Drummond, B.B. Rasmussen // Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. – 2008. – V. 11, – № 3. – P. 222-226.
 109. Ducker G.S. One-carbon metabolism in health and disease / G.S. Ducker, J.D. Rabinowitz // Cell Metab. – 2017. – V. 25, – № 1. – P. 27-42.

110. Eddahibi S. L-arginine restores endothelium-dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats / S. Eddahibi, S. Adnot, C. Carville, Y. Blouquit, B. Raffestin // *American Journal of Physiology*. – 1992. – V. 263, – № 2. – P. L194-L200.
111. Edwards L.M. The effect of high-altitude on human skeletal muscle energetics: P-31-mrs results from the Caudwell xtreme everest expedition / L.M. Edwards, A.J. Murray, D.J. Tyler, G.J. Kemp, C.J. Holloway, P.A. Robbins, S. Neubauer, D. Levett, H.E. Montgomery, M.P. Grocott, K. Clarke, G. Caudwell Xtreme Everest Res // *Plos One*. – 2010. – V. 5, – № 5.
112. Fagan J.M. Effects of oxygen deprivation on incubated rat soleus muscle / J.M. Fagan, M.E. Tischler // *Life Sciences*. – 1989. – V. 44, – № 10. – P. 677-681.
113. Falanga V. Hypoxia up-regulates the synthesis of tgfbeta-1 by human dermal fibroblasts / V. Falanga, S.W. Qian, D. Danielpour, M.H. Katz, A.B. Roberts, M.B. Sporn // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1991. – V. 97, – № 4. – P. 634-637.
114. Fan Y.P. Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery / Y.P. Fan, J.C. Yu, W.M. Kang, Q. Zhang // *Chin Med Sci J*. – 2009. – V. 24, – № 1. – P. 55-59.
115. Fan Y.Y. Activation of the central histaminergic system is involved in hypoxia-induced stroke tolerance in adult mice. / Y.Y. Fan, W.W. Hu, H.B. Dai, J.X. Zhang, L.Y. Zhang, P. He, Y. Shen, H. Ohtsu, E.Q. Wei, Z. Chen // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2011. – V. 31, – № 1. – P. 305-314.
116. Felig P. The glucose-alanine cycle / P. Felig // *Metabolism*. – 1973. – V. 22, – № 2. – P. 179-207.
117. Felig P. Amino acid metabolism during prolonged starvation / P. Felig, O.E. Owen, J. Wahren, G.F. Cahill, Jr. // *The Journal of clinical investigation*. – 1969. – V. 48, – № 3. – P. 584-594.

118. Fernstrom J.D. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain / J.D. Fernstrom // *Physiological Reviews*. – 1983. – V. 63, – № 2. – P. 484-546.
119. Fernstrom J.D. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain / J.D. Fernstrom, M.H. Fernstrom // *J Nutr*. – 2007. – V. 137, – № 6 Suppl 1. – P. 1539S-1547S; discussion 1548S.
120. Ferrando A.A. Increased protein intake in military special operations. / A.A. Ferrando // *J Nutr*. – 2013. – V. 143, – № 11. – P. 1852-1856.
121. Filho J.C. Simultaneous measurements of free amino acid patterns of plasma, muscle and erythrocytes in healthy human subjects. / J.C. Filho, J. Bergström, P. Stehle, P. Fürst // *Clin Nutr*. – 1997. – V. 16, – № 6. – P. 299-305.
122. Fisslthaler B. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin / B. Fisslthaler, A.E. Loot, A. Mohamed, R. Busse, I. Fleming // *Circulation Research*. – 2008. – V. 102, – № 12. – P. 1520-1528.
123. Flanagan J.L. Role of carnitine in disease / J.L. Flanagan, P.A. Simmons, J. Vehige, M.D. Willcox, Q. Garrett // *Nutrition & metabolism*. – 2010. – V. 7. – P. 30-30.
124. Flick K. Protein degradation and the stress response / K. Flick, P. Kaiser // *Semin Cell Dev Biol*. – 2012. – V. 23, – № 5. – P. 515-522.
125. Foran E. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis / E. Foran, D. Trotti // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2009. – V. 11, – № 7. – P. 1587-1602.
126. Forkner I. Hyperoxia-induced tissue hypoxia: A danger? / I. Forkner, C. Piantadosi, N. Scafetta, R. Moon // *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. – 2007. – V. 106, – № 5. – P. 1051-1055.

127. Forsythe J.A. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 / J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, G.L. Semenza // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – V. 16, – № 9. – P. 4604-4613.
128. Foster A.C. Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors / A.C. Foster, G.E. Fagg // *Brain Res.* – 1984. – V. 319, – № 2. – P. 103-164.
129. Fox C.J. Fuel feeds function: Energy metabolism and the t-cell response / C.J. Fox, P.S. Hammerman, C.B. Thompson // *Nature Reviews Immunology*. – 2005. – V. 5, – № 11. – P. 844-852.
130. Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of d-amino acids / M. Friedman // *Chem Biodivers.* – 2010. – V. 7, – № 6. – P. 1491-1530.
131. Fulton D. Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating tyr-83 / D. Fulton, J.E. Church, L. Ruan, C.Y. Li, S.G. Sood, B.E. Kemp, I.G. Jennings, R.C. Venema // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280, – № 43. – P. 35943-35952.
132. Furst P. What are the essential elements needed for the determination of amino acid requirements in humans? / P. Furst, P. Stehle // *Journal of Nutrition*. – 2004. – V. 134, – № 6. – P. 1558S-1565S.
133. Gannon N.P. Bcaa metabolism and insulin sensitivity - dysregulated by metabolic status? / N.P. Gannon, J.K. Schnuck, R.A. Vaughan // *Mol Nutr Food Res.* – 2018. – V. 62, – № 6. – P. e1700756.
134. Genchi G. An overview on d-amino acids / G. Genchi // *Amino Acids*. – 2017. – V. 49, – № 9. – P. 1521-1533.
135. Gibbs N.K. Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology / N.K. Gibbs, J. Tye, M. Norval // *Photochem Photobiol Sci.* – 2008. – V. 7, – № 6. – P. 655-667.

136. Gil J. Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective / J. Gil, A. Ramírez-Torres, S. Encarnación-Guevara // J Proteomics. – 2017. – V. 150. – P. 297-309.
137. Giordano S. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. / S. Giordano, V. Darley-Usmar, J. Zhang // Redox Biol. – 2013. – V. 2. – P. 82-90.
138. Girish B.N. Alterations in plasma amino acid levels in chronic pancreatitis. / B.N. Girish, G. Rajesh, K. Vaidyanathan, V. Balakrishnan // Journal of the pancreas. – 2011. – V. 12, – № 1. – P. 11-18.
139. Gleason J.E. Analysis of hypoxia and hypoxia-like states through metabolite profiling / J.E. Gleason, D.J. Corrigan, J.E. Cox, A.R. Reddi, L.A. McGinnis, V.C. Culotta // PLOS ONE. – 2011. – V. 6, – № 9. – P. e24741.
140. Goldberg M.A. Regulation of the erythropoietin gene - evidence that the oxygen sensor is a heme protein / M.A. Goldberg, S.P. Dunning, H.F. Bunn // Science. – 1988. – V. 242, – № 4884. – P. 1412-1415.
141. Gollnick P.D. Biochemical adaptations to exercise: Anaerobic metabolism / P.D. Gollnick, L. Hermansen // Exerc Sport Sci Rev. – 1973. – V. 1. – P. 1-43.
142. Gómez-Tamayo J.C. Analysis of the interactions of sulfur-containing amino acids in membrane proteins / J.C. Gómez-Tamayo, A. Cordoní, M. Olivella, E. Mayol, D. Fourmy, L. Pardo // Protein Sci. – 2016. – V. 25, – № 8. – P. 1517-1524.
143. Gong G. Upregulation of hif-1 α protein induces mitochondrial autophagy in primary cortical cell cultures through the inhibition of the mtor pathway. / G. Gong, L. Hu, Y. Liu, S. Bai, X. Dai, L. Yin, Y. Sun, X. Wang, L. Hou // Int J Mol Med. – 2014. – V. 34, – № 4. – P. 1133-1140.
144. Gorres K.L. Prolyl 4-hydroxylase / K.L. Gorres, R.T. Raines // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2010. – V. 45, – № 2. – P. 106-124.

145. Gu L. Rapid lc-ms/ms profiling of protein amino acids and metabolically related compounds for large-scale assessment of metabolic phenotypes / L. Gu, A.D. Jones, R.L. Last // *Methods Mol Biol.* – 2012. – V. 828. – P. 1-11.
146. Hammarqvist F. Stress hormone and amino-acid infusion in healthy-volunteers - short-term effects on protein-synthesis and amino-acid-metabolism in skeletal-muscle / F. Hammarqvist, A. Vonderdecken, E. Vinnars, J. Wernerman // *Metabolism-Clinical and Experimental.* – 1994. – V. 43, – № 9. – P. 1158-1163.
147. Han E.S. The in vivo gene expression signature of oxidative stress. / E.S. Han, F.L. Muller, V.I. Pérez, W. Qi, H. Liang, L. Xi, C. Fu, E. Doyle, M. Hickey, J. Cornell, C.J. Epstein, L.J. Roberts, H. Van Remmen, A. Richardson // *Physiol Genomics.* – 2008. – V. 34, – № 1. – P. 112-126.
148. Han Q. Editorial: Aromatic amino acid metabolism / Q. Han, R.S. Phillips, J. Li // *Frontiers in molecular biosciences.* – 2019. – V. 6. – P. 22-22.
149. Hao S.Z. Separation-induced body weight loss, impairment in alternation behavior, and autonomic tone: Effects of tyrosine / S.Z. Hao, Y. Avraham, O. Bonne, E.M. Berry // *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* – 2001. – V. 68, – № 2. – P. 273-281.
150. Hardeland R. On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals / R. Hardeland, I. Balzer, B. Poeggeler, B. Fuhrberg, H. Uría, G. Behrmann, R. Wolf, T.J. Meyer, R.J. Reiter // *J Pineal Res.* – 1995. – V. 18, – № 2. – P. 104-111.
151. Hardie D.G. Amp-activated protein kinase: The energy charge hypothesis revisited / D.G. Hardie, S.A. Hawley // *Bioessays.* – 2001. – V. 23, – № 12. – P. 1112-1119.
152. Harik N. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density / N.

- Harik, S.I. Harik, N.T. Kuo, K. Sakai, R.J. Przybylski, J.C. LaManna // Brain Research. – 1996. – V. 737, – № 1-2. – P. 335-338.
153. Hashimoto E. Rapid induction of vascular endothelial growth-factor expression by transient ischemia in rat-heart / E. Hashimoto, T. Ogita, T. Nakaoka, R. Matsuoka, A. Takao, Y. Kira // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 1994. – V. 267, – № 5 Pt 2. – P. H1948-H1954.
 154. Haussinger D. Glutamine metabolism in mammalian tissues. / D. Haussinger, H. Sies – 1 изд.: Springer Science & Business Media, 2012. – 300 с.
 155. Hawkins R.A. The blood-brain barrier and glutamate / R.A. Hawkins // The American journal of clinical nutrition. – 2009. – V. 90, – № 3. – P. 867S-874S.
 156. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity / L. Hedstrom // Chem Rev. – 2002. – V. 102, – № 12. – P. 4501-4524.
 157. Himmerich H. The relevance of the tnfr-alpha system in psychiatric disorders / H. Himmerich, M. Berthold-Losleben, T. Pollmacher // Fortschritte Der Neurologie Psychiatrie. – 2009. – V. 77, – № 6. – P. 334-345.
 158. Hiraoka A. Efficacy of branched-chain amino acid supplementation and walking exercise for preventing sarcopenia in patients with liver cirrhosis / A. Hiraoka, K. Michitaka, D. Kiguchi, H. Izumoto, H. Ueki, M. Kaneto, S. Kitahata, T. Aibiki, T. Okudaira, H. Tomida, Y. Miyamoto, H. Yamago, Y. Suga, R. Iwasaki, K. Mori, H. Miyata, E. Tsubouchi, M. Kishida, T. Ninomiya, S. Kohgami, M. Hirooka, Y. Tokumoto, M. Abe, B. Matsuura, Y. Hiasa // Eur J Gastroenterol Hepatol. – 2017. – V. 29, – № 12. – P. 1416-1423.
 159. Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia / P.W. Hochachka // Science. – 1986. – V. 231, – № 4735. – P. 234-241.

160. Hochachka P.W. Mechanism and evolution of hypoxia-tolerance in humans / P.W. Hochachka // *Journal of Experimental Biology*. – 1998. – V. 201, – № 8. – P. 1243-1254.
161. Hochachka P.W. Evolution of human hypoxia tolerance physiology // *Oxygen sensing: Molecule to man* / Lahiri S. и др., 2000. – С. 25-43.
162. Hohnholt M.C. Glutamate dehydrogenase is essential to sustain neuronal oxidative energy metabolism during stimulation / M.C. Hohnholt, V.H. Andersen, J.V. Andersen, S.K. Christensen, M. Karaca, P. Maechler, H.S. Waagepetersen // *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2018. – V. 38, – № 10. – P. 1754-1768.
163. Howes O.D. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version iii--the final common pathway / O.D. Howes, S. Kapur // *Schizophrenia bulletin*. – 2009. – V. 35, – № 3. – P. 549-562.
164. Hue L. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian-tissues / L. Hue, M.H. Rider // *Biochemical Journal*. – 1987. – V. 245, – № 2. – P. 313-324.
165. Hyde R. Insulin promotes the cell surface recruitment of the sat2/ata2 system a amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells / R. Hyde, K. Peyrollier, H.S. Hundal // *The Journal of biological chemistry*. – 2002. – V. 277, – № 16. – P. 13628-13634.
166. Imai K. Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins / K. Imai, S. Mitaku // *Biophysics (Nagoya-shi, Japan)*. – 2005. – V. 1. – P. 55-65.
167. Ingle R.A. Histidine biosynthesis / R.A. Ingle // *The arabidopsis book*. – 2011. – V. 9. – P. e0141-e0141.
168. International Civil Aviation Organization. Manual of civil aviation medicine. / International Civil Aviation Organization – 3rd ed. – Montréal : ICAO, 2012. – 580 c.

169. Jackson R.M. Hypoxia and kinase activity regulate lung epithelial cell glutathione. / R.M. Jackson, C. Gupta // *Exp Lung Res.* – 2010. – V. 36, – № 1. – P. 45-56.
170. Jansen E.M. Quantitative analysis of contralateral hemisphere hypertrophy and sensorimotor performance in adult rats following unilateral neonatal ischemic-hypoxic brain injury / E.M. Jansen, W.C. Low // *Brain Research.* – 1996. – V. 708, – № 1-2. – P. 93-99.
171. Jiang B. The functions of the mammalian methionine sulfoxide reductase system and related diseases / B. Jiang, J. Moskovitz // *Antioxidants* (Basel, Switzerland). – 2018. – V. 7, – № 9. – P. 122.
172. Jockers R. Update on melatonin receptors: Iuphar review 20 / R. Jockers, P. Delagrang, M.L. Dubocovich, R.P. Markus, N. Renault, G. Tosini, E. Cecon, D.P. Zlotos // *Br J Pharmacol.* – 2016. – V. 173, – № 18. – P. 2702-2725.
173. Jones D.P. Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic-injury / D.P. Jones // *Annual Review of Physiology.* – 1986. – V. 48. – P. 33-50.
174. Kalhan S.C. Resurgence of serine: An often neglected but indispensable amino acid / S.C. Kalhan, R.W. Hanson // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287, – № 24. – P. 19786-19791.
175. Kamaura M. Lifestyle modification in metabolic syndrome and associated changes in plasma amino acid profiles / M. Kamaura, K. Nishijima, M. Takahashi, T. Ando, S. Mizushima, O. Tochikubo // *Circ J.* – 2010. – V. 74, – № 11. – P. 2434-2440.
176. Kao C.C. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis / C.C. Kao, V. Bandi, K.K. Guntupalli, M.H. Wu, L. Castillo, F. Jahoor // *Clinical Science.* – 2009. – V. 117, – № 1. – P. 23-39.
177. Kassambara A. Ggpubr: 'Ggplot2' based publication ready plots // *Book Ggpubr: 'Ggplot2' based publication ready plots* / Editor, 2019.

178. Kayser B. Reappraisal of acetazolamide for the prevention of acute mountain sickness: A systematic review and meta-analysis / B. Kayser, L. Dumont, C. Lysakowski, C. Combescure, G. Haller, M.R. Tramèr // *High Alt Med Biol.* – 2012. – V. 13, – № 2. – P. 82-92.
179. Kimball S.R. New functions for amino acids: Effects on gene transcription and translation / S.R. Kimball, L.S. Jefferson // *American Journal of Clinical Nutrition.* – 2006. – V. 83, – № 2. – P. 500S-507S.
180. Kimura T. Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks. / T. Kimura, Y. Noguchi, N. Shikata, M. Takahashi // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* – 2009. – V. 12, – № 1. – P. 49-53.
181. Kirschner D.L. Simultaneous efflux of endogenous d-ser and l-glu from single acute hippocampus slices during oxygen glucose deprivation / D.L. Kirschner, A.L. Wilson, K.L. Drew, T.K. Green // *Journal of Neuroscience Research.* – 2009. – V. 87, – № 12. – P. 2812-2820.
182. Klassen P. Plasma free amino acid concentrations in healthy guatemalan adults and in patients with classic dengue / P. Klassen, P. Fürst, C. Schulz, M. Mazariegos, N.W. Solomons // *Am J Clin Nutr.* – 2001. – V. 73, – № 3. – P. 647-652.
183. Kroemer G. Autophagy and the integrated stress response / G. Kroemer, G. Mariño, B. Levine // *Molecular Cell.* – 2010. – V. 40, – № 2. – P. 280-293.
184. Krzysciak W. Activity of selected aromatic amino acids in biological systems / W. Krzysciak // *Acta Biochimica Polonica.* – 2011. – V. 58, – № 4. – P. 461-466.
185. Kucherenko Y.V. Natural antioxidants improve red blood cell "survival" in non-leukoreduced blood samples. / Y.V. Kucherenko, I. Bernhardt // *Cell Physiol Biochem.* – 2015. – V. 35, – № 5. – P. 2055-2068.
186. Lai M.-C. Hypoxia induces autophagy through translational up-regulation of lysosomal proteins in human colon cancer cells / M.-C. Lai, C.-M. Chang, H.S. Sun // *PLOS ONE.* – 2016. – V. 11, – № 4. – P. e0153627.

187. Langkamp-Henken B. Arginine supplementation is well tolerated but does not enhance mitogen-induced lymphocyte proliferation in elderly nursing home residents with pressure ulcers / B. Langkamp-Henken, K.A. Herrlinger-Garcia, J.K. Stechmiller, J.A. Nickerson-Troy, B. Lewis, L. Moffatt // *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. – 2000. – V. 24, – № 5. – P. 280-287.
188. Layman D.K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis / D.K. Layman // *Journal of Nutrition*. – 2003. – V. 133, – № 1. – P. 261S-267S.
189. Layman D.K. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. / D.K. Layman, J.I. Baum // *J Nutr*. – 2004. – V. 134, – № 4. – P. 968-973.
190. M.A. Lazar, J.D. Barchas. The regulation of tyrosine hydroxylase activity by phosphorylation / M.A. Lazar, J.D. Barchas // In: *Advances in dopamine research*. – Oxford: Pergamon, 1982. – C. 285-290.
191. Le Boucher J. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: Performance of hitachi l-8500a. / J. Le Boucher, C. Charret, C. Coudray-Lucas, J. Giboudeau, L. Cynober // *Clinical Chemistry*. – 1997. – V. 43, – № 8. – P. 1421-1428.
192. Leach R.M. Clinical aspects of hypoxic pulmonary vasoconstriction / R.M. Leach, D.F. Treacher // *Experimental Physiology*. – 1995. – V. 80, – № 5. – P. 865-875.
193. Levine R.L. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins / R.L. Levine, L. Mosoni, B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – V. 93, – № 26. – P. 15036-15040.
194. Lian G. Glutathione de novo synthesis but not recycling process coordinates with glutamine catabolism to control redox homeostasis and directs murine t cell differentiation / G. Lian, J.R. Gnanaprakasam, T. Wang, R. Wu, X. Chen, L. Liu, Y. Shen, M. Yang, J. Yang, Y. Chen, V. Vasiliou, T.A. Cassel,

- D.R. Green, Y. Liu, T.W. Fan, R. Wang // *eLife*. – 2018. – V. 7. – P. e36158.
195. Liang X. Proline mechanisms of stress survival / X. Liang, L. Zhang, S.K. Natarajan, D.F. Becker // *Antioxidants & redox signaling*. – 2013. – V. 19, – № 9. – P. 998-1011.
 196. Liao W.T. Metabolite modulation in human plasma in the early phase of acclimatization to hypobaric hypoxia / W.T. Liao, B. Liu, J. Chen, J.H. Cui, Y.X. Gao, F.Y. Liu, G. Xu, B.D. Sun, E.L. Zhang, Z.B. Yuan, G. Zhang, Y.Q. Gao // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6. – P. 22589.
 197. Lim J. Hypoxia-inducible factor-1 α upregulates tyrosine hydroxylase and dopamine transporter by nuclear receptor γ in sh-sy5y cells / J. Lim, H.I. Kim, Y. Bang, W. Seol, H.S. Choi, H.J. Choi // *Neuroreport*. – 2015. – V. 26, – № 6. – P. 380-386.
 198. Lim J.M. Methionine in proteins: It's not just for protein initiation anymore / J.M. Lim, G. Kim, R.L. Levine // *Neurochemical research*. – 2019. – V. 44, – № 1. – P. 247-257.
 199. Ling R. Involvement of transporter recruitment as well as gene expression in the substrate-induced adaptive regulation of amino acid transport system a / R. Ling, C.C. Bridges, M. Sugawara, T. Fujita, F.H. Leibach, P.D. Prasad, V. Ganapathy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2001. – V. 1512, – № 1. – P. 15-21.
 200. Liu B. From serotonin to neuroplasticity: Evolvment of theories for major depressive disorder / B. Liu, J. Liu, M. Wang, Y. Zhang, L. Li // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2017. – V. 11. – P. 305-305.
 201. Liu W. Proline oxidase promotes tumor cell survival in hypoxic tumor microenvironments / W. Liu, K. Glunde, Z.M. Bhujwalla, V. Raman, A. Sharma, J.M. Phang // *Cancer Research*. – 2012. – V. 72, – № 14. – P. 3677-3686.

202. López N. Gender-associated impact of early leucine supplementation on adult predisposition to obesity in rats / N. López, J. Sánchez, A. Palou, F. Serra // *Nutrients*. – 2018. – V. 10, – № 1. – P. 76.
203. Lu H. Reversible inactivation of hif-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal hif-1 / H. Lu, C.L. Dalgard, A. Mohyeldin, T. McFate, A.S. Tait, A. Verma // *J Biol Chem*. – 2005. – V. 280, – № 51. – P. 41928-41939.
204. Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis / S.C. Lu // *Mol Aspects Med*. – 2009. – V. 30, – № 1-2. – P. 42-59.
205. Luo S. Methionine in proteins defends against oxidative stress / S. Luo, R.L. Levine // *FASEB J*. – 2009. – V. 23, – № 2. – P. 464-472.
206. Lynch C.J. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue / C.J. Lynch, B.J. Patson, J. Anthony, A. Vaval, L.S. Jefferson, T.C. Vary // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2002. – V. 283, – № 3. – P. E503-E513.
207. Mach M. Experimental modeling of hypoxia in pregnancy and early postnatal life / M. Mach, M. Dubovický, J. Navarová, I. Brucknerová, E. Ujházy // *Interdiscip Toxicol*. – 2009. – V. 2, – № 1. – P. 28-32.
208. MacInnis M.J. A meta-analysis of exhaled nitric oxide in acute normobaric hypoxia. / M.J. MacInnis, E.A. Carter, J. Donnelly, M.S. Koehle // *Aerosp Med Hum Perform*. – 2015. – V. 86, – № 8. – P. 693-697.
209. MacKay M.-A.B. D-serine: Potential therapeutic agent and/or biomarker in schizophrenia and depression? / M.-A.B. MacKay, M. Kravtsenyuk, R. Thomas, N.D. Mitchell, S.M. Dursun, G.B. Baker // *Frontiers in psychiatry*. – 2019. – V. 10. – P. 25-25.
210. Madala P.K. Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites / P.K. Madala, J.D. Tyndall, T. Nall, D.P. Fairlie // *Chem Rev*. – 2010. – V. 110, – № 6. – P. Pr1-31.

211. Magill R.A. Effects of tyrosine, phentermine, caffeine d-amphetamine, and placebo on cognitive and motor performance deficits during sleep deprivation / R.A. Magill, W.F. Waters, G.A. Bray, J. Volaufova, S.R. Smith, H.R. Lieberman, N. McNevin, D.H. Ryan // *Nutritional Neuroscience*. – 2003. – V. 6, – № 4. – P. 237-246.
212. Mair P., Wilcox R.R. Robust statistical methods in r using the wrs2 package / P. Mair, R.R. Wilcox // *Behavior Research Methods*. – 2019.
213. Malinovsky A.V. Why threonine is an essential amino acid in mammals and birds: Studies at the enzyme level / A.V. Malinovsky // *Biochemistry (Mosc)*. – 2018. – V. 83, – № 7. – P. 795-799.
214. Mandel D.A. Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats / D.A. Mandel, A.M. Schreihofer // *Journal of Physiology-London*. – 2009. – V. 587, – № 2. – P. 461-475.
215. Marchesini G. Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: A double-blind, randomized trial / G. Marchesini, G. Bianchi, M. Merli, P. Amodio, C. Panella, C. Loguercio, F.R. Fanelli, R. Abbiati, B.S.G. Italian // *Gastroenterology*. – 2003. – V. 124, – № 7. – P. 1792-1801.
216. Marchesini G. Branched-chain amino acid supplementation in patients with liver diseases / G. Marchesini, R. Marzocchi, M. Noia, G. Bianchi // *Journal of Nutrition*. – 2005. – V. 135, – № Suppl 6. – P. 1596S-1601S.
217. Marret E. The effects of a polymerized bovine-derived hemoglobin solution in a rabbit model of arterial thrombosis and bleeding / E. Marret, P. Bonnin, E. Mazoyer, B. Riou, T. Jacobs, P. Coriat, C.M. Samama // *Anesthesia and Analgesia*. – 2004. – V. 98, – № 3. – P. 604-610.
218. Marsin A.S. Phosphorylation and activation of heart pfk-2 by ampk has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia / A.S. Marsin, L. Bertrand, M.H. Rider, J. Deprez, C. Beauloye, M.F. Vincent, G. Van den

- Berghe, D. Carling, L. Hue // *Current Biology*. – 2000. – V. 10, – № 20. – P. 1247-1255.
219. Martinov M.V. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle / M.V. Martinov, V.M. Vitvitsky, R. Banerjee, F.I. Ataullakhanov // *Biochimica et biophysica acta*. – 2010. – V. 1804, – № 1. – P. 89-96.
 220. Matés J.M. Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. / J.M. Matés, J.A. Segura, M. Martín-Rufián, J.A. Campos-Sandoval, F.J. Alonso, J. Márquez // *Curr Mol Med*. – 2013. – V. 13, – № 4. – P. 514-534.
 221. Mazna P. The role of proline residues in the structure and function of human mt2 melatonin receptor / P. Mazna, L. Grycova, A. Balik, H. Zemkova, E. Friedlova, V. Obsilova, T. Obsil, J. Teisinger // *J Pineal Res*. – 2008. – V. 45, – № 4. – P. 361-372.
 222. McCommis K.S. Loss of mitochondrial pyruvate carrier 2 in the liver leads to defects in gluconeogenesis and compensation via pyruvate-alanine cycling. / K.S. McCommis, Z. Chen, X. Fu, W.G. McDonald, J.R. Colca, R.F. Kletzien, S.C. Burgess, B.N. Finck // *Cell Metab*. – 2015. – V. 22, – № 4. – P. 682-694.
 223. Medelli J. Variation in plasma amino acid concentrations during a cycling competition / J. Medelli, J. Lounana, D. Hill // *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. – 2003. – V. 43, – № 2. – P. 236-242.
 224. Meek S.E. Differential regulation of amino acid exchange and protein dynamics across splanchnic and skeletal muscle beds by insulin in healthy human subjects / S.E. Meek, M. Persson, G.C. Ford, K.S. Nair // *Diabetes*. – 1998. – V. 47, – № 12. – P. 1824-1835.
 225. Meijer A.J. Regulation and role of autophagy in mammalian cells / A.J. Meijer, P. Codogno // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2004. – V. 36, – № 12. – P. 2445-2462.

226. Meijer A.J. Autophagy: Regulation and role in disease / A.J. Meijer, P. Codogno // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. – 2009. – V. 46, – № 4. – P. 210-240.
227. Meijer A.J. Regulation of autophagy by amino acids and mtor-dependent signal transduction / A.J. Meijer, S. Lorin, E.F. Blommaart, P. Codogno // *Amino acids*. – 2015. – V. 47, – № 10. – P. 2037-2063.
228. Meisinger E. The influence of two different essential amino acid/keto analogue preparations on the clinical status of patients with chronic renal failure / E. Meisinger, M. Strauch // *Z Ernährungswiss.* – 1985. – V. 24, – № 2. – P. 96-104.
229. Menchini R.J. Multifaceted regulation of the system a transporter slc38a2 suggests nanoscale regulation of amino acid metabolism and cellular signaling / R.J. Menchini, F.A. Chaudhry // *Neuropharmacology*. – 2019. – V. 161. – P. 107789.
230. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia / C. Michiels // *American Journal of Pathology*. – 2004. – V. 164, – № 6. – P. 1875-1882.
231. Miles J.M. Effects of epinephrine infusion on leucine and alanine kinetics in humans / J.M. Miles, S.L. Nissen, J.E. Gerich, M.W. Haymond // *American Journal of Physiology*. – 1984. – V. 247, – № 2 Pt 1. – P. E166-E172.
232. Millhorn D.E. Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia / D.E. Millhorn, R. Raymond, L. Conforti, W. Zhu, D. BeitnerJohnson, T. Filisko, M.B. Genter, S. Kobayashi, M. Peng // *Kidney International*. – 1997. – V. 51, – № 2. – P. 527-535.
233. Millward D.J. Protein metabolism in skeletal muscle: The effect of feeding and fasting on muscle rna, free amino acids and plasma insulin concentrations / D.J. Millward, D.O. Nnanyelugo, W.P.T. James, P.J. Garlick // *British Journal of Nutrition*. – 1974. – V. 32, – № 1. – P. 127-142.

234. Milsom J.P. Factors affecting plasma amino acid concentrations in control subjects / J.P. Milsom, M.Y. Morgan, S. Sherlock // *Metabolism*. – 1979. – V. 28, – № 4. – P. 313-319.
235. Minchenko A. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (pfkfb3) gene - its possible role in the warburg effect / A. Minchenko, I. Leshchinsky, I. Opentanova, N.L. Sang, V. Srinivas, V. Armstead, J. Caro // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277, – № 8. – P. 6183-6187.
236. Mitrega K. Beneficial effects of l-leucine and l-valine on arrhythmias, hemodynamics and myocardial morphology in rats / K. Mitrega, M. Zorniak, B. Varghese, D. Lange, J. Nozynski, M. Porc, S. Bialka, T.F. Krzeminski // *Pharmacological Research*. – 2011. – V. 64, – № 3. – P. 218-225.
237. Mizushima N. The role of the atg1/ulk1 complex in autophagy regulation / N. Mizushima // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2010. – V. 22, – № 2. – P. 132-139.
238. Mordier S. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in c2c12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway / S. Mordier, C. Deval, D. Bechet, A. Tassa, M. Ferrara // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275, – № 38. – P. 29900-29906.
239. Morlion B.J. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery - a randomized, double-blind, controlled study / B.J. Morlion, P. Stehle, P. Wachtler, H.P. Siedhoff, M. Koller, W. Konig, P. Furst, C. Puchstein // *Annals of Surgery*. – 1998. – V. 227, – № 2. – P. 302-308.
240. Morris S.M., Jr. Arginine: Master and commander in innate immune responses / S.M. Morris, Jr. // *Science Signaling*. – 2010. – V. 3, – № 135.
241. Morris S.M., Jr. Arginine: Beyond protein / S.M. Morris, Jr. // *Am J Clin Nutr*. – 2006. – V. 83, – № 2. – P. 508s-512s.

242. Morris S.M., Jr. Arginine metabolism revisited / S.M. Morris, Jr. // *The Journal of Nutrition*. – 2016. – V. 146, – № 12. – P. 2579S-2586S.
243. Mortazavi A. Altitude-related hypoxia: Risk assessment and management for passengers on commercial aircraft / A. Mortazavi, M.J. Eisenberg, D. Langleben, P. Ernst, R.L. Schiff // *Aviat Space Environ Med*. – 2003. – V. 74, – № 9. – P. 922-927.
244. Mosharov E. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes / E. Mosharov, M.R. Cranford, R. Banerjee // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39, – № 42. – P. 13005-13011.
245. Moskovitz J. Methionine sulfoxide reductases: Ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases / J. Moskovitz // *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. – 2005. – V. 170, – № 3. – P. 213-219.
246. Mudge G.H. Alterations of myocardial amino acid metabolism in chronic ischemic heart disease / G.H. Mudge, R.M. Mills, H. Taegtmeyer, R. Gorlin, M. Lesch // *J Clin Invest*. – 1976. – V. 58, – № 5. – P. 1185-1192.
247. Muñoz-Sánchez J. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model / J. Muñoz-Sánchez, M.E. Cháñez-Cárdenas // *Journal of Applied Toxicology*. – 2019. – V. 39, – № 4. – P. 556-570.
248. Muratsubaki H. Profile of plasma amino acid levels in rats exposed to acute hypoxic hypoxia / H. Muratsubaki, A. Yamaki // *Indian J Clin Biochem*. – 2011. – V. 26, – № 4. – P. 416-419.
249. Murray A.J. How wasting is saving: Weight loss at altitude might result from an evolutionary adaptation / A.J. Murray, H.E. Montgomery // *Bioessays*. – 2014. – V. 36, – № 8. – P. 721-729.
250. Nair K.S. Leucine as a regulator of whole-body and skeletal-muscle protein-metabolism in humans / K.S. Nair, R.G. Schwartz, S. Welle // *American Journal of Physiology*. – 1992. – V. 263, – № 5 Pt 1. – P. E928-E934.

251. Nasrallah P. Branched-chain amino acids mediate resilience to chronic social defeat stress by activating bdnf/trkb signaling / P. Nasrallah, E.A. Haidar, J.S. Stephan, L. El Hayek, N. Karnib, M. Khalifeh, N. Barmo, V. Jabre, R. Houbeika, A. Ghanem, J. Nasser, N. Zeeni, M. Bassil, S.F. Sleiman // *Neurobiology of Stress*. – 2019. – V. 11. – P. 100170.
252. Neri D.F. The effects of tyrosine on cognitive performance during extended wakefulness / D.F. Neri, D. Wiegmann, R.R. Stanny, S.A. Shappell, A. McCardie, D.L. McKay // *Aviation Space and Environmental Medicine*. – 1995. – V. 66, – № 4. – P. 313-319.
253. Neuhäuser M. Exact tests based on the baumgartner-weiß-schindler statistic—a survey / M. Neuhäuser // *Statistical Papers*. – 2005. – V. 46, – № 1. – P. 1-29.
254. Newport D.J. Ketamine and other nmda antagonists: Early clinical trials and possible mechanisms in depression / D.J. Newport, L.L. Carpenter, W.M. McDonald, J.B. Potash, M. Tohen, C.B. Nemeroff // *Am J Psychiatry*. – 2015. – V. 172, – № 10. – P. 950-966.
255. Newsholme P. Why is l-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? / P. Newsholme // *Journal of Nutrition*. – 2001. – V. 131, – № Suppl 9. – P. 2515S-2522S.
256. Newsholme P. Glutamine and glutamate as vital metabolites / P. Newsholme, M.M. Lima, J. Procopio, T.C. Pithon-Curi, S.Q. Doi, R.B. Bazotte, R. Curi // *Braz J Med Biol Res*. – 2003. – V. 36, – № 2. – P. 153-163.
257. Nie C. Branched chain amino acids: Beyond nutrition metabolism / C. Nie, T. He, W. Zhang, G. Zhang, X. Ma // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – V. 19, – № 4. – P. 954.
258. Nilsson M. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: Studies using glucose-equivalent drinks / M. Nilsson, J.J. Holst, I.M. Björck // *Am J Clin Nutr*. – 2007. – V. 85, – № 4. – P. 996-1004.

259. Noguchi Y. Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use / Y. Noguchi, Q.W. Zhang, T. Sugimoto, Y. Furuhashi, R. Sakai, M. Mori, M. Takahashi, T. Kimura // *Am J Clin Nutr.* – 2006. – V. 83, – № 2. – P. 513s-519s.
260. Nygren J. Differential regulation of protein dynamics in splanchnic and skeletal muscle beds by insulin and amino acids in healthy human subjects / J. Nygren, K.S. Nair // *Diabetes.* – 2003. – V. 52, – № 6. – P. 1377-1385.
261. Ohshima Y. Effects of fasting on hypoxic ventilatory responses and the contribution of histamine h1 receptors in mice. / Y. Ohshima, M. Iwase, M. Izumizaki, H. Nakayama, I. Narita, I. Homma // *J Physiol Sci.* . – 2011. – V. 61, – № 2. – P. 73-82.
262. Ohtsu H. Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice. / H. Ohtsu // *Adv Exp Med Biol.* – 2011. – V. 709. – P. 21-31.
263. Oka K. Up-regulation of cyclin-e(1) via proline-mtor pathway is responsible for hgf-mediated g(1)/s progression in the primary culture of rat hepatocytes. / K. Oka, W. Ohya-Shimada, S. Mizuno, T. Nakamura // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. – V. 435, – № 1. – P. 120-125.
264. Ottino P. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the vegf system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase a(2) activity / P. Ottino, J. Finley, E. Rojo, A. Ottlecz, G.N. Lambrou, H.E.P. Bazan, N.G. Bazan // *Molecular Vision.* – 2004. – V. 10, – № 43. – P. 341-350.
265. Paisley R.D.. Nutritional and sports supplement use among deployed US Army soldiers in a remote, austere combat outpost in eastern Afghanistan / R.D. Paisley // *Military Medicine.* – 2015. – V. 180, – № 4. – P. 391-401.
266. Pandhare J. Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress / J. Pandhare, S.P. Donald, S.K. Cooper, J.M. Phang // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2009. – V. 107, – № 4. – P. 759-768.

267. Pérez-Arellano I. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. / I. Pérez-Arellano, F. Carmona-Alvarez, A.I. Martínez, J. Rodríguez-Díaz, J. Cervera // *Protein Sci.* – 2010. – V. 19, – № 3. – P. 372-382.
268. Perfilova V.N. Glutamate ionotropic receptors: Structure, localisation, function / V.N. Perfilova, I.N. Tyurenkov // *Usp Fiziol Nauk.* – 2016. – V. 47, – № 1. – P. 80-96.
269. Perfilova V.N. Glutamate metabotropic receptors: Structure, localisation, functions / V.N. Perfilova, I.N. Tyurenkov // *Usp Fiziol Nauk.* – 2016. – V. 47, – № 2. – P. 98-112.
270. Peters V. Intrinsic carnosine metabolism in the human kidney / V. Peters, C.Q.F. Klessens, H.J. Baelde, B. Singler, K.A.M. Veraar, A. Zutinic, J. Drozak, J. Zschocke, C.P. Schmitt, E. de Heer // *Amino acids.* – 2015. – V. 47, – № 12. – P. 2541-2550.
271. Petrassi F.A. Hypoxic hypoxia at moderate altitudes: Review of the state of the science. / F.A. Petrassi, P.D. Hodgkinson, P.L. Walters, S.J. Gaydos // *Aviat Space Environ Med.* – 2012. – V. 83, – № 10. – P. 975-984.
272. Phang J.M. Proline metabolism and cancer: Emerging links to glutamine and collagen. / J.M. Phang, W. Liu, C.N. Hancock, J.W. Fischer // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* – 2015. – V. 18, – № 1. – P. 71-77.
273. Phang J.M. Proline metabolism and microenvironmental stress / J.M. Phang, W. Liu, O. Zabornyk // *Annual review of nutrition.* – 2010. – V. 18, – P. 441-463.
274. Pichon A. Long-term ventilatory adaptation and ventilatory response to hypoxia in plateau pika (*Ochotona curzoniae*): Role of nNOS and dopamine / A. Pichon, Z.Z. Bai, F. Favret, G.E. Jin, S.F. Han, D. Marchant, J.P. Richalet, R.L. Ge // *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* – 2009. – V. 297, – № 4. – P. R978-R987.

275. Pisarenko O.I. Mechanisms for improving the energy metabolism and function of the hypoxic myocardium with amino acids / O.I. Pisarenko, I.M. Studneva, V.N. Khlopkov, E.S. Solomatina, E.K. Ruuge // *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova*. – 1988. – V. 74, – № 2. – P. 234-240.
276. Pohlert T. PMCMRplus: Calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended // *Book Pmcmrplus: Calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended* / Editor, 2018.
277. Poletti S. Kynurenine pathway and white matter microstructure in bipolar disorder / S. Poletti, A.M. Myint, G. Schüetze, I. Bollettini, E. Mazza, D. Grillitsch, C. Locatelli, M. Schwarz, C. Colombo, F. Benedetti // *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. – 2018. – V. 268, – № 2. – P. 157-168.
278. Pollegioni L. Metabolism of the neuromodulator d-serine / L. Pollegioni, S. Sacchi // *Cell Mol Life Sci*. – 2010. – V. 67, – № 14. – P. 2387-2404.
279. Pompella A. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. / A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, A.F. Casini // *Biochem Pharmacol*. – 2003. – V. 66, – № 8. – P. 1499-1503.
280. Preedy V.R. The effects of 6 hours of hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro. / V.R. Preedy, D.M. Smith, P.H. Sugden // *Biochem J*. – 1985. – V. 228, – № 1. – P. 179-185.
281. Priviero F.B.M. Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation / F.B.M. Priviero, R.C. Webb // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2010. – V. 56, – № 3. – P. 229-233.
282. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. // *Book R: A language and environment for statistical computing*. / Editor. – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
283. Rajendram R. Glutamine in clinical nutrition. / R. Rajendram, V.R. Preedy, V.B. Patel: Springer, 2014. – 551 c.

284. Rao R. Role of glutamine in protection of intestinal epithelial tight junctions. / R. Rao, G. Samak // *J Epithel Biol Pharmacol.* – 2012. – № 5(Suppl 1-M7). – P. 47-54.
285. Rao R. Circles within circles: Crosstalk between protein ser/thr/tyr-phosphorylation and met oxidation / R. Rao, D. Xu, J.J. Thelen, J.A. Miernyk // *BMC Bioinformatics.* – 2013. – V. 14 Suppl 14, – № Suppl 14. – P. S14.
286. Rasmussen D.D. Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma-catecholamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations / D.D. Rasmussen, B. Ishizuka, M.E. Quigley, S.S.C. Yen // *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 1983. – V. 57, – № 4. – P. 760-763.
287. Raymond R. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression during hypoxia: Role of ca^{2+} and pkc / R. Raymond, D. Millhorn // *Kidney Int.* – 1997. – V. 51, – № 2. – P. 536-541.
288. Reeds P.J. Dispensable and indispensable amino acids for humans / P.J. Reeds // *Journal of Nutrition.* – 2000. – V. 130, – № 7. – P. 1835S-1840S.
289. Reid M.A. Serine synthesis through *phgdh* coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism / M.A. Reid, A.E. Allen, S. Liu, M.V. Liberti, P. Liu, X. Liu, Z. Dai, X. Gao, Q. Wang, Y. Liu, L. Lai, J.W. Locasale // *Nature Communications.* – 2018. – V. 9, – № 1. – P. 5442.
290. Reinstein D.K. Dietary tyrosine suppresses the rise in plasma-corticosterone following acute stress in rats / D.K. Reinstein, H. Lehnert, R.J. Wurtman // *Life Sciences.* – 1985. – V. 37, – № 23. – P. 2157-2163.
291. Rennie M.J. Branched-chain amino acids as fuels and anabolic signals in human muscle / M.J. Rennie, J. Bohe, K. Smith, H. Wackerhage, P. Greenhaff // *Journal of Nutrition.* – 2006. – V. 136, – № Suppl 1. – P. 264S-268S.
292. Rieu I. Leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats / I. Rieu, C. Sornet, G.

- Bayle, J. Prugnaud, C. Pouyet, M. Balage, I. Papet, J. Grizard, D. Dardevet // *Journal of Nutrition*. – 2003. – V. 133, – № 4. – P. 1198-1205.
293. Rolfe D.F.S. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals / D.F.S. Rolfe, G.C. Brown // *Physiological Reviews*. – 1997. – V. 77, – № 3. – P. 731-758.
294. Ron-Harel N. T cell activation depends on extracellular alanine / N. Ron-Harel, J.M. Ghergurovich, G. Notarangelo, M.W. LaFleur, Y. Tsubosaka, A.H. Sharpe, J.D. Rabinowitz, M.C. Haigis // *Cell Rep*. – 2019. – V. 28, – № 12. – P. 3011-3021.e4.
295. Rose W.C. The amino acid requirements of adult man / W.C. Rose // *Nutrition abstracts and reviews. Series A: Human and experimental*. – 1957. – V. 27, – № 3. – P. 631-647.
296. Roth B.L. Molecular pharmacology of metabotropic receptors targeted by neuropsychiatric drugs / B.L. Roth // *Nature structural & molecular biology*. – 2019. – V. 26, – № 7. – P. 535-544.
297. Russo S. Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: Molecular evidence and psychiatric implications / S. Russo, I.P. Kema, F. Bosker, J. Haavik, J. Korf // *World Journal of Biological Psychiatry*. – 2009. – V. 10, – № 4. – P. 258-268.
298. Ryter S.W. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. / S.W. Ryter, S.M. Cloonan, A.M. Choi // *Mol Cells*. – 2013. – V. 36, – № 1. – P. 7-16.
299. Rzymiski T. Regulation of autophagy by atf4 in response to severe hypoxia / T. Rzymiski, M. Milani, L. Pike, F. Buffa, H.R. Mellor, L. Winchester, I. Pires, E. Hammond, I. Ragoussis, A.L. Harris // *Oncogene*. – 2010. – V. 29, – № 31. – P. 4424-4435.
300. Samaja M. Acid-base balance and o-2 transport at high altitude / M. Samaja, C. Mariani, A. Prestini, P. Cerretelli // *Acta Physiologica Scandinavica*. – 1997. – V. 159, – № 3. – P. 249-256.

301. Sapirstein L.A. Effect of hemorrhage on the cardiac output and its distribution in the rat / L.A. Sapirstein, E.H. Sapirstein, A. Bredemeyer // *Circ Res.* – 1960. – V. 8. – P. 135-148.
302. Scalise M. The human slc7a5 (lat1): The intriguing histidine/large neutral amino acid transporter and its relevance to human health / M. Scalise, M. Galluccio, L. Console, L. Pochini, C. Indiveri // *Frontiers in Chemistry.* – 2018. – V. 6, – № 243.
303. Scalise M. The human slc1a5 (asct2) amino acid transporter: From function to structure and role in cell biology / M. Scalise, L. Pochini, L. Console, M.A. Losso, C. Indiveri // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2018. – V. 6, – № 96.
304. J.D. Schaechter, R.J. Wurtman. Serotonin release varies with brain tryptophan levels / J.D. Schaechter, R.J. Wurtman // *Brain Research.* – 1990. – V. 532, – № 1-2. – P. 203-210.
305. Schmidt E.S. Glutamate dehydrogenase: Biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme / E.S. Schmidt, F.W. Schmidt // *Clin Chim Acta.* – 1988. – V. 173, – № 1. – P. 43-55.
306. Schousboe A. A tribute to Mary C. McKenna: Glutamate as energy substrate and neurotransmitter-functional interaction between neurons and astrocytes / A. Schousboe // *Neurochem Res.* – 2017. – V. 42, – № 1. – P. 4-9.
307. Schutz Y. Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis / Y. Schutz // *Int J Vitam Nutr Res.* . – 2011. – V. 81, – № 2-3. – P. 101-107.
308. Serafini G. Pharmacological properties of glutamatergic drugs targeting nmda receptors and their application in major depression / G. Serafini, M. Pompili, M. Innamorati, Y. Dwivedi, G. Brahmachari, P. Girardi // *Curr Pharm Des.* – 2013. – V. 19, – № 10. – P. 1898-1922.
309. Servet C. Proline dehydrogenase: A key enzyme in controlling cellular homeostasis / C. Servet, T. Ghelis, L. Richard, A. Zilberstein, A. Savoure // *Frontiers in Bioscience-Landmark.* – 2012. – V. 17. – P. 607-620.

310. Shambaugh G.E. Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle / G.E. Shambaugh // *Am J Clin Nutr.* – 1977. – V. 30, – № 12. – P. 2083-2087.
311. Shen W. Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling / W. Shen, C. Gao, R. Cueto, L. Liu, H. Fu, Y. Shao, W.Y. Yang, P. Fang, E.T. Choi, Q. Wu, X. Yang, H. Wang // *Redox Biology.* – 2020. – V. 28. – P. 101322.
312. Shimomura Y. Exercise promotes bcaa catabolism: Effects of bcaa supplementation on skeletal muscle during exercise / Y. Shimomura, T. Murakami, N. Nakai, M. Nagasaki, R.A. Harris // *J Nutr.* – 2004. – V. 134, – № 6 Suppl. – P. 1583s-1587s.
313. Shoulders M.D. Collagen structure and stability / M.D. Shoulders, R.T. Raines // *Annual review of biochemistry.* – 2009. – V. 78. – P. 929-958.
314. Singel D.J. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: The role of nitric oxide and s-nitrosohemoglobin / D.J. Singel, J.S. Stamler // *Annual Review of Physiology.* – 2005. – V. 67. – P. 99-145.
315. Smith H. The effects of severe hypoxia on glycolytic flux and enzyme activity in a model of solid tumours. / H. Smith, M. Board, A. Pellagatti, H. Turley, J. Boulton, R. Callaghan // *J Cell Biochem.* – 2016. – V. 117, – № 8. – P. 1890-1901.
316. Sokalingam S. A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein / S. Sokalingam, G. Raghunathan, N. Soundrarajan, S.-G. Lee // *PloS one.* – 2012. – V. 7, – № 7. – P. e40410-e40410.
317. Solberg R. Metabolomic analyses of plasma reveals new insights into asphyxia and resuscitation in pigs. / R. Solberg, D. Enot, H.P. Deigner, T. Koal, S. Scholl-Bürgi, O.D. Saugstad, M. Keller // *PLoS One.* – 2010. – V. 5, – № 3. – P. e9606.

318. Stein W.H. The free amino acids of human blood plasma. / W.H. Stein, S. Moore // J Biol Chem. – 1954. – V. 211, – № 2. – P. 915-926.
319. Struzyńska L. The role of astroglia in pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. / L. Struzyńska, M. Chalimoniuk, G. Sulkowski // Toxicology. – 2005. – V. 212, – № 2-3. – P. 185-194.
320. Suhara T. Inhibition of the oxygen sensor phd2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the cori cycle / T. Suhara, T. Hishiki, M. Kasahara, N. Hayakawa, T. Oyaizu, T. Nakanishi, A. Kubo, H. Morisaki, W.G. Kaelin, Jr., M. Suematsu, Y.A. Minamishima // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – V. 112, – № 37. – P. 11642-11647.
321. Sutton J.R. Hypoxia. / J.R. Sutton, G. Coates, J. Remmers – Philadelphia: B. C. Decker, 1990. – 198 c.
322. Szpak P. Fish bone chemistry and ultrastructure: Implications for taphonomy and stable isotope analysis / P. Szpak // Journal of Archaeological Science. – 2011. – V. 38, – № 12. – P. 3358-3372.
323. Tabarean I.V. Histamine receptor signaling in energy homeostasis / I.V. Tabarean // Neuropharmacology. – 2016. – V. 106. – P. 13-19.
324. Tamarappoo B.K. Glucocorticoid regulation of splanchnic glutamine, alanine, glutamate, ammonia, and glutathione fluxes / B.K. Tamarappoo, M. Nam, M.S. Kilberg, T.C. Welbourne // Am J Physiol. – 1993. – V. 264, – № 4 Pt 1. – P. E526-E533.
325. Tan I.K. Plasma and urine amino acid profiles in a healthy adult population of singapore / I.K. Tan, B. Gajra // Annals Academy of Medicine Singapore. – 2006. – V. 35, – № 7. – P. 468-475.
326. Tapiero H. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies - I. Arginine / H. Tapiero, G. Mathe, P. Couvreur, K.D. Tew // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2002. – V. 56, – № 9. – P. 439-445.

327. Thangam E.B. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets / E.B. Thangam, E.A. Jemima, H. Singh, M.S. Baig, M. Khan, C.B. Mathias, M.K. Church, R. Saluja // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – V. 9, – № 1873.
328. Tinton S. Role of protein-phosphorylation events in the anoxia signal-transduction pathway leading to the inhibition of total protein synthesis in isolated hepatocytes / S. Tinton, Q.N. Tran-Nguyen, P. Buc-Calderon // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – V. 249, – № 1. – P. 121-126.
329. Tremblay E. Transient increased density of nmda binding-sites in the developing rat hippocampus / E. Tremblay, M.P. Roisin, A. Represa, C. Charriaudmarlangue, Y. Benari // *Brain Research*. – 1988. – V. 461, – № 2. – P. 393-396.
330. Turner N.A. Regulation of myocardial matrix metalloproteinase expression and activity by cardiac fibroblasts. / N.A. Turner, K.E. Porter // *IUBMB Life*. – 2012. – V. 64, – № 2. – P. 143-150.
331. Valls-Lacalle L. Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition / L. Valls-Lacalle, I. Barba, E. Miró-Casas, J.J. Albuquerque-Béjar, M. Ruiz-Meana, M. Fuertes-Agudo, A. Rodríguez-Sinovas, D. García-Dorado // *Cardiovasc Res*. – 2016. – V. 109, – № 3. – P. 374-84.
332. van de Poll M.C.G. Interorgan amino acid exchange in humans: Consequences for arginine and citrulline metabolism / M.C.G. van de Poll, M.P.C. Siroen, P.A.M. van Leeuwen, P.B. Soeters, G.C. Melis, P.G. Boelens, N.E.P. Deutz, C.H.C. Dejong // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2007. – V. 85, – № 1. – P. 167-172.
333. Van Liew H.D. Cardiorespiratory functions during histotoxic hypoxia caused by cobalt / H.D. Van Liew, P.Y. Chen // *J Appl Physiol*. – 1972. – V. 32, – № 3. – P. 315-319.

334. Varis N. Hypoxia hangover and flight performance after normobaric hypoxia exposure in a hawk simulator / N. Varis, K.I. Parkkola, T.K. Leino // *Aerosp Med Hum Perform.* – 2019. – V. 90, – № 8. – P. 720-724.
335. Vohra R. Potential metabolic markers in glaucoma and their regulation in response to hypoxia / R. Vohra, L.M. Dalgaard, J. Vibaek, M.A. Langbøl, L.H. Bergersen, N.V. Olsen, B. Hassel, F.A. Chaudhry, M. Kolko // *Acta Ophthalmol.* – 2019. – V. 97, – № 6. – P. 567-576.
336. Waldron M. The effects of acute branched-chain amino acid supplementation on recovery from a single bout of hypertrophy exercise in resistance-trained athletes / M. Waldron, K. Whelan, O. Jeffries, D. Burt, L. Howe, S.D. Patterson // *Appl Physiol Nutr Metab.* – 2017. – V. 42, – № 6. – P. 630-636.
337. Wang L. Molecular link between glucose and glutamine consumption in cancer cells mediated by ctbp and sirt4 / L. Wang, J.-j. Li, L.-y. Guo, P. Li, Z. Zhao, H. Zhou, L.-j. Di // *Oncogenesis.* – 2018. – V. 7, – № 3. – P. 26.
338. Weinberg J.M. The role of glycine in regulated cell death / J.M. Weinberg, A. Bienholz, M.A. Venkatachalam // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – V. 73, – № 11-12. – P. 2285-308.
339. Weinberg J.M. Metabolic aspects of protection by glycine against hypoxic injury to isolated proximal tubules. / J.M. Weinberg, D.N. Buchanan, J.A. Davis, M. Abarzua // *J Am Soc Nephrol.* – 1991. – V. 1, – № 7. – P. 949-958.
340. Wickham H. Ggplot2: Elegant graphics for data analysis // *Book Ggplot2: Elegant graphics for data analysis* / Editor. – New York, USA: Springer-Verlag, 2016.
341. Wilmore D.W. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury / D.W. Wilmore // *J Nutr.* – 2001. – V. 131, – № 9 Suppl. – P. 2543S-2549S; discussion 2550S-2551S.

342. Wise D.R. Glutamine addiction: A new therapeutic target in cancer / D.R. Wise, C.B. Thompson // Trends in Biochemical Sciences. – 2010. – V. 35, – № 8. – P. 427-433.
343. Witte M.B. Arginine physiology and its implication for wound healing / M.B. Witte, A. Barbul // Wound Repair and Regeneration. – 2003. – V. 11, – № 6. – P. 419-423.
344. Wolf M. Physiological consequences of rapid or prolonged aircraft decompression: Evaluation using a human respiratory model / M. Wolf // Aviat Space Environ Med. – 2014. – V. 85, – № 4. – P. 466-472.
345. World Medical Association. World medical association declaration of helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects / World Medical Association // Bulletin of the World Health Organization. – 2001. – V. 79, – № 4. – P. 373-374.
346. World Medical Association. World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects / World Medical Association // JAMA. – 2013. – V. 310, – № 20. – P. 2191-2194.
347. Wu D. Induction and testing of hypoxia in cell culture / D. Wu, P. Yotnda // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2011.10.3791/2899 – № 54. – P. 2899.
348. Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition / G. Wu // Amino Acids. – 2009. – V. 37, – № 1. – P. 1-17.
349. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health / G. Wu // Amino Acids. – 2013. – V. 45, – № 3. – P. 407-411.
350. Wu G.Y. Proline and hydroxyproline metabolism: Implications for animal and human nutrition / G.Y. Wu, F.W. Bazer, R.C. Burghardt, G.A. Johnson, S.W. Kim, D.A. Knabe, P. Li, X.L. Li, J.R. McKnight, M.C. Satterfield, T.E. Spencer // Amino Acids. – 2011. – V. 40, – № 4. – P. 1053-1063.

351. Wu G.Y. Arginine deficiency in preterm infants: Biochemical mechanisms and nutritional implications / G.Y. Wu, L.A. Jaeger, F.W. Bazer, J.M. Rhoads // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2004. – V. 15, – № 8. – P. 442-451.
352. Wu G.Y. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond / G.Y. Wu, S.M. Morris // *Biochemical Journal*. – 1998. – V. 336, – № Pt 1. – P. 1-17.
353. Xi Z.X. Blockade of ionotropic glutamatergic transmission in the ventral tegmental area reduces heroin reinforcement in rat / Z.X. Xi, E.A. Stein // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2002. – V. 164, – № 2. – P. 144-150.
354. Yamauchi M. Lysine post-translational modifications of collagen / M. Yamauchi, M. Sricholpech // *Essays in biochemistry*. – 2012. – V. 52. – P. 113-133.
355. Yerushalmi H.F. Role of polyamines in arginine-dependent colon carcinogenesis in *apc(min) (+)* mice. / H.F. Yerushalmi, D.G. Besselsen, N.A. Ignatenko, K.A. Blohm-Mangone, J.L. Padilla-Torres, D.E. Stringer, J.M. Guillen, H. Holubec, C.M. Payne, E.W. Gerner // *Mol Carcinog*. – 2006. – V. 45, – № 10. – P. 764-773.
356. Yoo J.H. Ventral tegmental area glutamate neurons co-release GABA and promote positive reinforcement / J.H. Yoo, V. Zell, N. Gutierrez-Reed, J. Wu, R. Ressler, M.A. Shenasa, A.B. Johnson, K.H. Fife, L. Faget, T.S. Hnasko // *Nature communications*. – 2016. – V. 7. – P. 13697-13697.
357. Yoon M.-S. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism / M.-S. Yoon // *Nutrients*. – 2016. – V. 8, – № 7. – P. 405.
358. Yoshizawa F. New therapeutic strategy for amino acid medicine: Notable functions of branched chain amino acids as biological regulators / F. Yoshizawa // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2012. – V. 118, – № 2. – P. 149-155.

359. Young V.R. Adult amino-acid-requirements - the case for a major revision in current recommendations / V.R. Young // *Journal of Nutrition*. – 1994. – V. 124, – № Suppl 8. – P. S1517-S1523.
360. Yu X. Crosstalk between cystine and glutathione is critical for the regulation of amino acid signaling pathways and ferroptosis / X. Yu, Y.C. Long // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6, – № 1. – P. 30033.
361. Yuan H. Histamine and migraine / H. Yuan, S.D. Silberstein // *Headache*. – 2018. – V. 58, – № 1. – P. 184-193.
362. Yuan X.J. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric-arteries / X.J. Yuan, M.L. Tod, L.J. Rubin, M.P. Blaustein // *American Journal of Physiology*. – 1990. – V. 259, – № 2 Pt 2. – P. H281-H289.
363. Yuneva M. Deficiency in glutamine but not glucose induces myc-dependent apoptosis in human cells / M. Yuneva, N. Zamboni, P. Oefner, R. Sachidanandam, Y. Lazebnik // *J Cell Biol*. – 2007. – V. 178, – № 1. – P. 93-105.
364. Zadnipyany I.V. Grape polyphenols concentrate demonstrates cardioprotection in terms of hypoxic myocardial injury / I.V. Zadnipyany, T.P. Sataieva, O.S. Tretiakova, A.V. Kubyshkin, W. Zukow // *Russian Open Medical Journal*. – 2017. – V. 6, – № 4. – P. 7.
365. Zafra F. Glycine transporters and its coupling with NMDA receptors / F. Zafra, I. Ibáñez, D. Bartolomé-Martín, D. Piniella, M. Arribas-Blázquez, C. Giménez // *Adv Neurobiol*. – 2017. – V. 16. – P. 55-83.
366. Zhang H. Treatment with carnosine reduces hypoxia-ischemia brain damage in a neonatal rat model. / H. Zhang, S. Guo, L. Zhang, L. Jia, Z. Zhang, H. Duan, J. Zhang, J. Liu, W. Zhang // *Eur J Pharmacol*. – 2014. – V. 727. – P. 174-180.
367. Zhang Q. Effect of threonine on secretory immune system using a chicken intestinal *ex vivo* model with lipopolysaccharide challenge / Q. Zhang, X.

- Chen, S.D. Eicher, K.M. Ajuwon, T.J. Applegate // *Poult Sci.* – 2017. – V. 96, – № 9. – P. 3043-3051.
368. Zhang W.R. Chronic sustained hypoxia enhances both evoked epscs and norepinephrine inhibition of glutamatergic afferent inputs in the nucleus of the solitary tract / W.R. Zhang, F.R. Carreno, J.T. Cunningham, S.W. Mifflin // *Journal of Neuroscience.* – 2009. – V. 29, – № 10. – P. 3093-3102.
369. Zheng L. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A review in the theme: Cellular responses to hypoxia. / L. Zheng, C.J. Kelly, S.P. Colgan // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2015. – V. 309, – № 6. – P. C350-C360.
370. Zheng L. Dietary supplementation of branched-chain amino acids increases muscle net amino acid fluxes through elevating their substrate availability and intramuscular catabolism in young pigs / L. Zheng, F. Zuo, S. Zhao, P. He, H. Wei, Q. Xiang, J. Pang, J. Peng // *British Journal of Nutrition.* – 2017. – V. 117, – № 7. – P. 911-922.