

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИС-АССОЦИИРОВАННОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ

Е.Д. Кессених¹, К.М. Быкова¹, Е.А. Мурашко^{1}, Я.А. Дубровский¹, В.В. Дорофейков^{1,2}, И.А. Саввина^{1,3}*

¹Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2; *эл. почта: kate.murashko@xmail.ru

²Национальный государственный университет физической культуры, спорта и здоровья имени П.Ф. Лесгафта, 190121, Санкт-Петербург, ул. Декабристов, 35

³Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

Сепсис-ассоциированная энцефалопатия (САЭ) представляет собой острую дисфункцию головного мозга, которая возникает при отсутствии первичного очага инфекции в центральной нервной системе. Целью нашей работы было проведение пилотного нецелевого метаболомного исследования плазмы крови пациентов с САЭ для выявления метаболомических изменений, потенциально связанных с патологическим состоянием, и формирования гипотез для дальнейшего изучения патогенеза, поиска перспективных биомаркеров и оценки тяжести состояния септического пациента. Метаболомное профилирование осуществлялось методом ВЭЖХ-МС-ВР с последующим статистическим анализом полученных данных. В результате слепого рандомизированного контролируемого клинического исследования выявлено существенное различие в метаболомических профилях основной и контрольной групп. Функциональный анализ позволил обнаружить метаболомические пути, наиболее затронутые патологическими процессами у пациентов с САЭ: метаболизм ацилкарнитинов, лизофосфатидилхолинов, таурина, биосинтез фолата и метаболизм лекарственных препаратов — субстрата цитохрома P450. У больных с САЭ с нарушением сознания в виде делирия и комы отмечено снижение уровня длинноцепочечных ацилкарнитинов и содержания лизофосфатидилхолинов. Метаболомные профили пациентов с САЭ значимо различались в группе умерших и выживших пациентов: концентрации серосодержащих аминокислот в группе умерших были значительно ниже, чем в группе выживших. В нашем исследовании установлены 64 кандидата в биомаркеры, которые потенциально могут быть использованы для прогнозирования исходов сепсиса, что требует дальнейшего изучения с использованием расширенной и независимой когорты пациентов.

Ключевые слова: метаболомика; метаболиты; сепсис-ассоциированная энцефалопатия; сепсис

DOI: 10.18097/PBMC1599

ВВЕДЕНИЕ

Сепсис-ассоциированная энцефалопатия (САЭ) представляет собой острую дисфункцию головного мозга, которая возникает при отсутствии первичного очага инфекции в центральной нервной системе (ЦНС) [1]. В последние годы усовершенствованное профилирование метаболитов жидкостей организма, таких как сыворотка и плазма крови, спинномозговая жидкость или моча, известное как “метаболомика”, стало мощным и многообещающим инструментом для выявления новых биомаркеров или “метаболомических отпечатков пальцев” [2]. Во многих исследованиях выявлены нарушения метаболомических путей у пациентов с сепсисом в критическом состоянии, включая метаболизм аминокислот, окисление жирных кислот, метаболизм фосфолипидов, гликолиз и цикл трикарбоновых кислот [3–5]. В рамках нашего исследования мы задались вопросом, насколько информативным может быть первоначальный биохимический профиль заболевания до начала специфической терапии сепсиса или его изменение у пациентов с САЭ.

Метаболомика — одна из омиксных наук, предоставляющая информацию о низкомолекулярных химических соединениях в биологических образцах человека. Метаболомика направлена на качественную и количественную оценку низкомолекулярных соединений (менее 1500 Да), обнаруженных в исследуемой биологической системе, и позволяет идентифицировать и количественно оценить метаболиты, присутствующие в биологическом образце. Метаболом можно считать продуктом клеточных биологических регуляторных процессов с вкладом генома, эпигенома, транскриптома и протеома, а также факторов окружающей среды.

В метаболомике используют три подхода: целевой, при котором количественно определяется и идентифицируется ограниченная группа метаболитов; полупроцессовой, используемый для оценки определённого класса метаболитов (например, аминокислоты, органические кислоты или ацилкарнитины); и нецелевой, который представляет собой определение и количественную оценку всех метаболитов в исследуемом образце с использованием одноплатформенного или мультиплатформенного подходов [6].



МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С САЭ

Целевой и нецелевой метаболомные подходы могут применяться для определения метаболомических “отпечатков пальцев”, которые представляют собой ограниченный набор метаболитов, позволяющий различать фенотипы и использоваться в качестве мультибиомаркера для различных заболеваний, для стратификации пациентов, для мониторинга прогрессирования заболевания или эффективности лечения [7]. Целевое исследование ограничивается конкретным соединением или классом соединений, тогда как нецелевой анализ обеспечивает комплексную химическую характеристику сложной биохимической системы [8].

Наиболее широко применяемый аналитический метод, используемый в метаболомных исследованиях, включает разделение метаболитов в биологической матрице с помощью газовой (ГХ) или жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (МС). Выбор оптимальной стратегии метаболомного анализа зависит от объекта исследования, биологической матрицы, физико-химических свойств определяемых метаболитов, их стабильности, применяемых в лаборатории методов подготовки проб к анализу и аналитических характеристик используемого оборудования.

Целью нашего пилотного исследования было выявление метаболитов плазмы крови у пациентов с сепсис-ассоциированной энцефалопатией до начала специфической терапии сепсиса в качестве кандидатов в биомаркеры для дальнейшего анализа метаболомических путей, связанных с патогенезом заболевания.

МЕТОДИКА

В одноцентровое проспективное слепое рандомизированное контролируемое клиническое исследование, проведенное в период с апреля 2022 г. по декабрь 2023 г., были включены 10 пациентов с подтвержденным диагнозом сепсис согласно международному консенсусу определения сепсиса и септического шока Sepsis-3 (The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock, 2016)

(основная группа) и 10 добровольцев (контрольная группа), сопоставимых по возрасту, полу и сопутствующим заболеваниям с пациентами основной группы (табл. 1). Критерии не включения в исследование — инфекционный процесс в ЦНС, хроническая интоксикация (алкоголь, наркотики) в анамнезе, вирусный гепатит В, С, ВИЧ-инфекция, текущая беременность. Критерии исключения — развитие острого нарушения мозгового кровообращения и очаговой инфекции в ЦНС в процессе лечения пациента, включенного в исследование. Первичным очагом инфекционного процесса были: внутрибольничная пневмония (n = 5, 50%) и вторичный перитонит (n = 5, 50%). Пациенты обеих групп получали длительную сопоставимую базовую терапию сердечно-сосудистых заболеваний, включающую β-адреноблокаторы, ингибиторы АПФ, дезагреганты, диуретики и гастропротекторы. Образцы плазмы крови для метаболомного анализа были отобраны на первый день постановки диагноза сепсиса и до начала специфической терапии сепсиса. Забор крови производили в вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА, образцы центрифугировали в течение 15 мин при 1600 g при комнатной температуре. Плазму крови алиquotировали и хранили при -80°C. Таким образом, обе исследуемые группы были сопоставимы по фоновым заболеваниям и получаемой базовой терапии, что минимизирует влияние хронических заболеваний на межгрупповые различия метаболомных профилей.

Подготовка образцов плазмы крови к ВЭЖХ-МС анализу

Образцы плазмы крови, представленные на анализ, были предварительно плавно разморожены на льду. Образцы контроля качества (QC) были приготовлены путём пулирования одинаковых алиquot всех образцов, отобранных для метаболомного анализа. Плазму крови депротенизировали охлажденным ацетонитрилом в соотношении 1:3, затем центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Для проведения метаболомного исследования методом ВЭЖХ-МС было отобрано по 100 мкл

Таблица 1. Характеристика пациентов с САЭ и контрольной группы

Параметр	Пациенты основной группы с САЭ (n = 10)	Пациенты контрольной группы (n = 10)
Возраст, лет	63,5±8,2	64,5±7,9
Женский пол, n	4	4
Мужской пол, n	6	6
ИМТ, кг/м ²	27,5±3,2	25,5±4,5
ГБ, n	9 (90%)	9 (90%)
ИБС, n	8 (80%)	7 (70%)
СД 2 типа, n	5 (50%)	4 (40%)
Нарушения ритма сердца, n	6 (60%)	5 (50%)
Заболевания органов пищеварения, n	8 (80%)	7 (70%)
Заболевания лёгких, n	5 (50%)	4 (40%)

Примечание: ГБ – гипертоническая болезнь, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИМТ – индекс массы тела, СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа.

супернатанта полученных экстрактов, включая образцы контроля качества и образец отрицательного контроля (бланк).

Нецелевое метаболомное исследование

Метаболомное исследование образцов плазмы крови пациентов с сепсисом проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС-ВР). Для хроматографического разделения использовали жидкостный хроматограф Elute UHPLC (“Bruker Daltonics”, Германия) в режимах обращённо-фазовой (ОФ) и гидрофильной жидкостной HILIC хроматографии с использованием аналитических колонок Intensity Solo 1,8 C18-2 100×2,1 мм с предколоной Acquity BEH C18 1,7 мкм (“Bruker Daltonics”) и SeQuant® ZIC-cHILIC 3 мкм, 100×2,1 мм с предколоной ZIC-cHILIC 3 мкм, 20×2,1 мм (“Supelco Analytical Products”, США). Для детектирования метаболитов в исследуемых образцах использовали времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения Q-TOF Maxis Impact (“Bruker Daltonics”) с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении. Детектирование проводили в режиме сканирования по полному ионному току — регистрация положительно заряженных ионов в диапазоне m/z от 50 а.е.м. до 1300 а.е.м. при следующих настройках масс-спектрометра: режим поток газа-осушителя (азот) — 6 л/мин; давление газа на небулайзере — 26 psi; температура проводящего капилляра — 220°C; напряжение на капилляре — 4500 В; скорость сканирования — 2 Гц.

Статистическая обработка данных

Предварительную обработку данных, нормализацию, статистический анализ и аннотирование проводили с использованием программного обеспечения Compass DataAnalysis (“Bruker Daltonics”), ProteoWizard MSConvert и онлайн-платформы Metaboanalyst 5.0. В рамках процедуры предварительной обработки данных были осуществлены следующие шаги: детектирование m/z , сглаживание, хроматографическое разрешение, фильтрация и исключение изотопов, объединение и выравнивание полученного массива данных, заполнение пропущенных значений половиной минимального ненулевого значения в пределах каждой переменной, нормализация по медиане для каждого образца с последующим приведением к общей медиане, нормализация по \log_2 . Переменные были отфильтрованы по трём критериям качества: повторяемость с использованием образцов контроля качества QC ($RSD\% \leq 30\%$), межиндивидуальная вариабельность ($RSD > 20\%$ для образцов), распространённость в массиве данных по отношению среднего значения переменной к её медиане в $QC \leq 1,5$.

Сравнение исследуемых групп было осуществлено с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента, а также теста Манна-Уитни. Эффект был оценен при помощи значений кратности изменений средних значений метаболита в группах

($\log_2(FC)$) и стандартизированного размера эффекта по Коуэну (Cohen's d). Контроль множественных сравнений был осуществлён с использованием метода Бенджамини-Хохберга (FDR, $q = 0,05$).

В работе были применены метод главных компонент для уменьшения размерности данных, дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA), а также дискриминантный анализ ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA), построение тепловых карт и метод случайного леса (Random Forest) в качестве классифицирующего алгоритма.

Контроль качества данных

Качество полученных метаболомных данных оценивали по воспроизводимости анализов образцов контроля качества ($n_{QC} = 5$), которые представляли собой пулированный образец плазмы крови пациентов. На рисунке 1 представлены результаты анализа исследуемых групп методом главных компонент (PCA).

Группа образцов контроля качества показывает высокую воспроизводимость результатов, что может говорить о высоком качестве данных в рамках проведённого метаболомного эксперимента.

Техническое качество данных было оценено при помощи коэффициента вариации (CV) по всем обнаруженным метаболитам. Для ОФ и HILIC хроматографии медианные CV составили 17,8% и 16,1% соответственно, при этом 54,8% и 57,9% метаболитов имели $CV < 20\%$, а 69,9% и 70,5% — $CV < 30\%$. Эти значения подтверждают хорошее качество данных и воспроизводимость измерений.

Оценка источников вариации (SS-разложение, decomposition of sums of squares) показала, что для большинства метаболитов ($> 50\%$) доля дисперсии, объясняемая групповой принадлежностью (САЭ vs контроль), составила 6,4% и 10,2% для ОФ и HILIC ВЭЖХ-МС анализа соответственно. Несмотря на ограниченный размер выборки, анализ источников вариации выявил, что для 21,2% (ОФ) и 32,5% (HILIC) метаболитов групповой фактор объясняет более 30% общей дисперсии. Для 6,4% и 10,2% метаболитов — вклад группового фактора превышает 50%, что указывает на наличие стабильных и выраженных различий между группами даже при ограниченном числе наблюдений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Госпитальная летальность у пациентов с сепсисом составила 60%. Средний балл по шкале SOFA в первые сутки диагностики сепсиса составил 9,5 баллов, по шкале SAPS II — 44,5 балла. Первичным очагом инфекционного процесса были: внутрибольничная пневмония — 50%; вторичный перитонит — 50%. Средний уровень прокальцитонина в первые сутки составил 43,9 нг/мл.

У всех пациентов диагностировали септический шок (артериальная гипотензия, не устраняемая инфузионной терапией и требующая

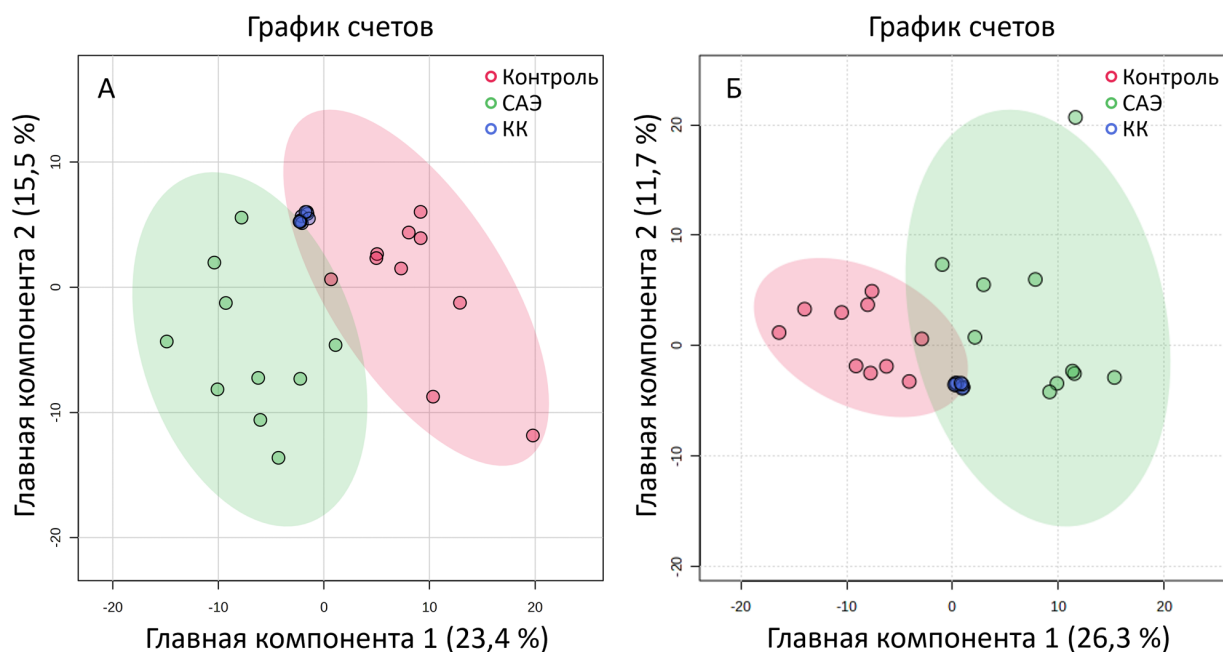


Рисунок 1. Результаты анализа полученных экспериментальных данных методом главных компонент (PCA) – дифференциация групп контроля, заболевания и образцов контроля качества (КК) для ОФ (А) и HILIC (Б) хроматографии. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

применение вазопрессоров для поддержания среднего артериального давления выше 65 мм рт. ст., и повышение концентрации лактата артериальной крови более 2 ммоль/л).

На момент забора крови на метаболомное исследование пациентов с клиническим вариантом САЭ по типу делирия в основной группе не было. Все пациенты в первые сутки сепсиса были с угнетением сознания от оглушения до комы, с вегетативной нестабильностью, к ним применялась методика многокомпонентной нейровегетативной стабилизации (опиоидный анальгетик фентанил + пропופол).

В рамках данной работы для изучения метаболома плазмы крови пациентов с САЭ был применён нецелевой метаболомный подход. Несмотря на ограниченный размер выборки, групповой фактор (САЭ, контроль) объясняет более 30% наблюдаемой вариабельности данных для 21,2% и 32,5% метаболитов, и более 50% — для 6,4% и 10,2% для ОФ и HILIC ВЭЖХ-МС анализа соответственно. Лишь 40,4% и 31,3% переменных показали менее 10% объяснённой дисперсии, что указывает на существенную долю биологически систематичных различий между исследуемыми группами. Наиболее значимые метаболиты, в свою очередь, показали высокие значения эффекта ($\log_2(FC)$ и Cohen's d), подтверждённые согласованностью непараметрического теста.

В двух исследуемых группах образцов после нормализации данных был проведён хемометрический анализ с использованием дискриминантного анализа методом частичных наименьших квадратов (PLS-DA), а также дискриминантный анализ ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA). Как видно из рисунка 2, между исследуемыми

группами наблюдается значительное различие. Поскольку такие методы анализа являются контролируруемыми многомерными методами, склонными к переоценке данных и описывающими направление максимальной ковариации между набором данных и принадлежностью к группе, нами была произведена перекрёстная проверка полученных моделей и оценена её прогностическая способность. Полученные модели показали высокую объясняющую и предсказательную способность ($R^2Y = 0,933$ и $0,718$; $Q^2 = 0,861$ и $0,619$). По результатам перестановочных тестов ($n = 20, 100$ и 1000 перестановок) ни одна из случайных моделей не превысила показатели исходной, что свидетельствует о статистической значимости OPLS-DA моделей ($p < 0,001$).

При проведении OPLS-DA анализа экспериментальных данных была оценена значимость вклада переменных в прогнозе, используемом в модели. Высокое значение показателя VIP может служить основой для выбора переменных в качестве потенциальных биомаркеров заболевания.

В рамках проведённого статистического анализа данных были построены диаграммы Volcano plot (диапазон различия $FC \geq 2,0$; частота ложных открытий $q < 0,01$) и произведена оценка направления, величины и значимости изменений в интенсивности переменных в исследуемых группах (рис. 3). Приведённые данные позволяют визуализировать и выделить группы переменных, достоверно увеличивающихся или уменьшающихся в исследуемых группах, а также оценить их корреляцию между исследуемыми группами пациентов.

Полученный массив экспериментальных данных был проанализирован с помощью алгоритма машинного обучения Random Forest с использованием ансамбля решающих деревьев (количество

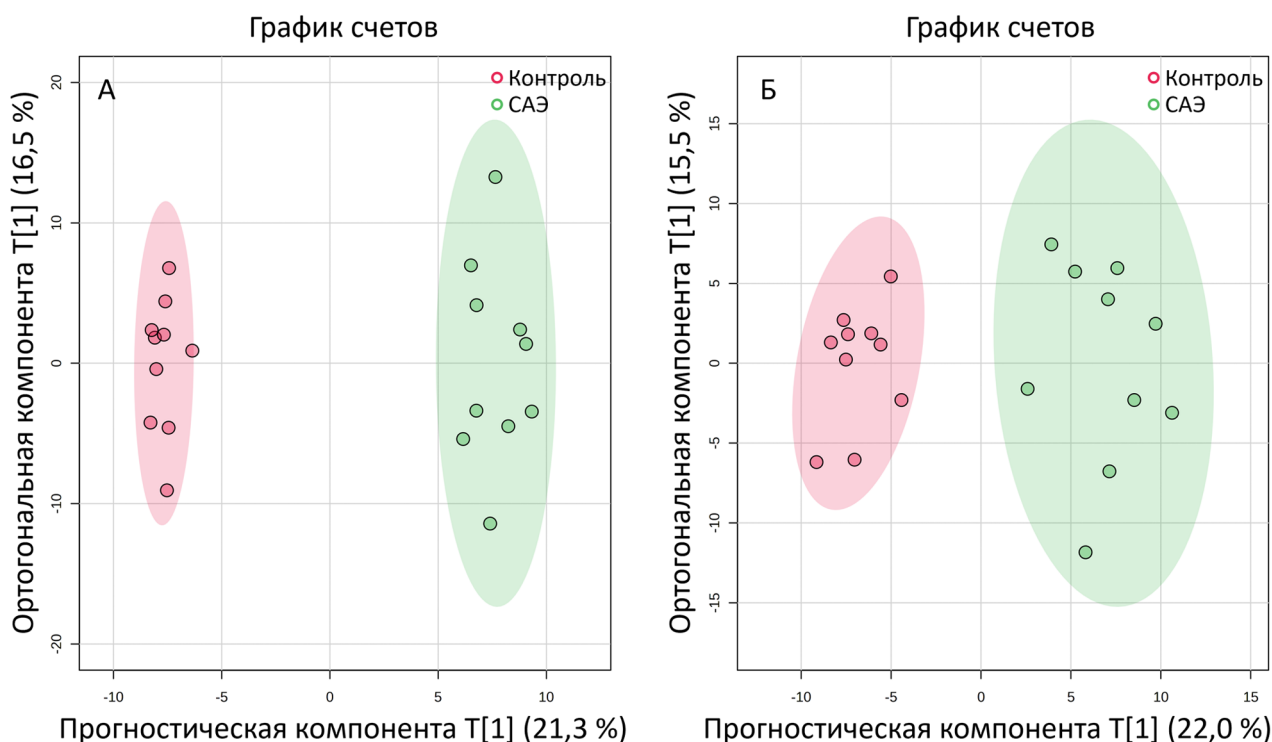


Рисунок 2. OPLS-DA анализ полученных нормализованных экспериментальных данных для образцов плазмы крови пациентов с сепсисом (группа заболеваний) и без (группа контроля) для ОФ (А) и HILIC (Б) хроматографии. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

деревьев — 500, количество предикторов — 7). Данный метод, в отличие от PLS-DA, не является контролируемым. Конечным прогнозом классификации образцов является среднее значение прогнозов отдельных деревьев. Для расчёта значимости переменных используется метод среднего снижения точности (Mean Decrease Accuracy) модели среди всех кросс-валидированных прогнозов. Оценка производительности классификатора была осуществлена с помощью OOB ошибки.

В рамках нецелевого метаболомного подхода необходимо осуществить аннотирование и предварительную идентификацию метаболитов и провести последующий анализ метаболитических путей. Метаболитические пути представляют собой цепочку катализируемых ферментами химических реакций, которые происходят внутри клетки в ходе преобразования субстратов в конечные продукты. Анализ обогащения (Enrichment Analysis) — это биоинформатический подход, используемый для выявления биологических путей, которые наиболее затронуты интересующими метаболитами, выявленными при исследовании экспериментальных данных. Такой подход позволяет идентифицировать соответствующие пути, связанные с патологическим состоянием.

Нами был осуществлён анализ путей (Pathway Analysis) с использованием алгоритма Mummichog, позволяющий отобразить все возможные совпадения метаболитов на метаболитической карте и найти локальное обогащение, которое отражает истинную активность (рис. 4).

Функциональный анализ позволил выявить метаболитические пути, наиболее затронутые патологическими процессами у пациентов с сепсисом (рис. 4). Наибольшее внимание привлекли метаболизм таурина, ацилкарнитин, биосинтез фолата и метаболизм ксенобиотиков — субстратов цитохрома P450. Все значимые переменные, аннотированные с использованием алгоритма Mummichog и участвующие в описанных метаболитических процессах, также используются при построении модели OPLS-DA и имеют значение $VIP > 1,0$, то есть имеют статистически значимое изменение между экспериментальными группами.

Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) экспериментальных данных также позволил получить преаннотированный перечень метаболитов и метаболитических путей, представляющих интерес в нецелевом метаболомном исследовании (рис. 5).

Предварительное аннотирование полученных переменных было осуществлено на основании полученных аналитических характеристик (значение точной массы, время удерживания, MS/MS-спектр) с использованием библиотек KEGG (Kyoto Gene and Kyoto Encyclopedia), Lipidmaps, HMDB (Human Metabolome Database), NIST20, а также сервисов MZmine и GNPS со встроенными масс-спектрометрическими библиотеками GNPS, HMDB, Massbank, Fiehn, MetaboBASE и другими.

На основании результатов, полученных при хемометрической обработке экспериментальных

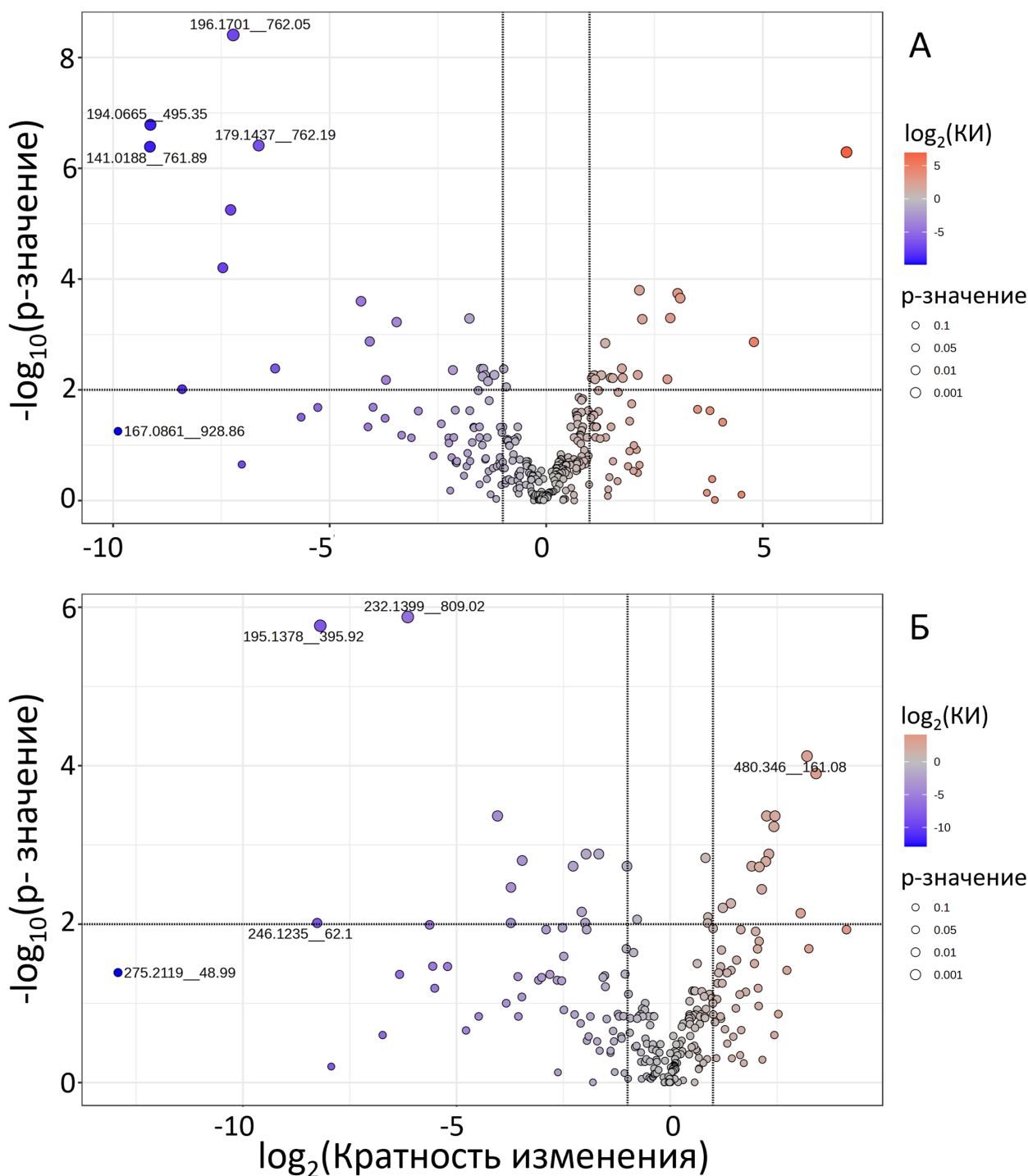


Рисунок 3. Диаграммы Volcano plot для образцов плазмы крови пациентов с сепсисом (группа заболеваний) и без (группа контроля) для ОФ (А) и HILIC (Б) хроматографии. Синим цветом обозначены переменные, интенсивность которых увеличивается в группе заболевания; красным – уменьшается. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

данных с использованием методов Volcano plot, OPLS-DA и Random Forest, а также с учётом функционального анализа метаболических путей, были выбраны переменные, используемые для построения моделей всеми описанными алгоритмами. Были использованы следующие ограничительные условия: кратность изменения интенсивностей переменных между экспериментальными группами $FC > 2,0$ и частота ложных открытий (FDR) $q < 0,01$

(Volcano plot); значимость вклада переменных в прогнозе $VIP > 1,0$ (OPLS-DA) и Mean Decrease Accuracy MDA $> 0,0$ (Random Forest). В итоге для последующего аннотирования были выбраны 20 значимых переменных для ОФ хроматографии, для HILIC — 44. Визуализация значимо изменённых метаболитов между исследуемыми группами с помощью построения тепловой карты представлена на рисунке S1 Дополнительных материалов.

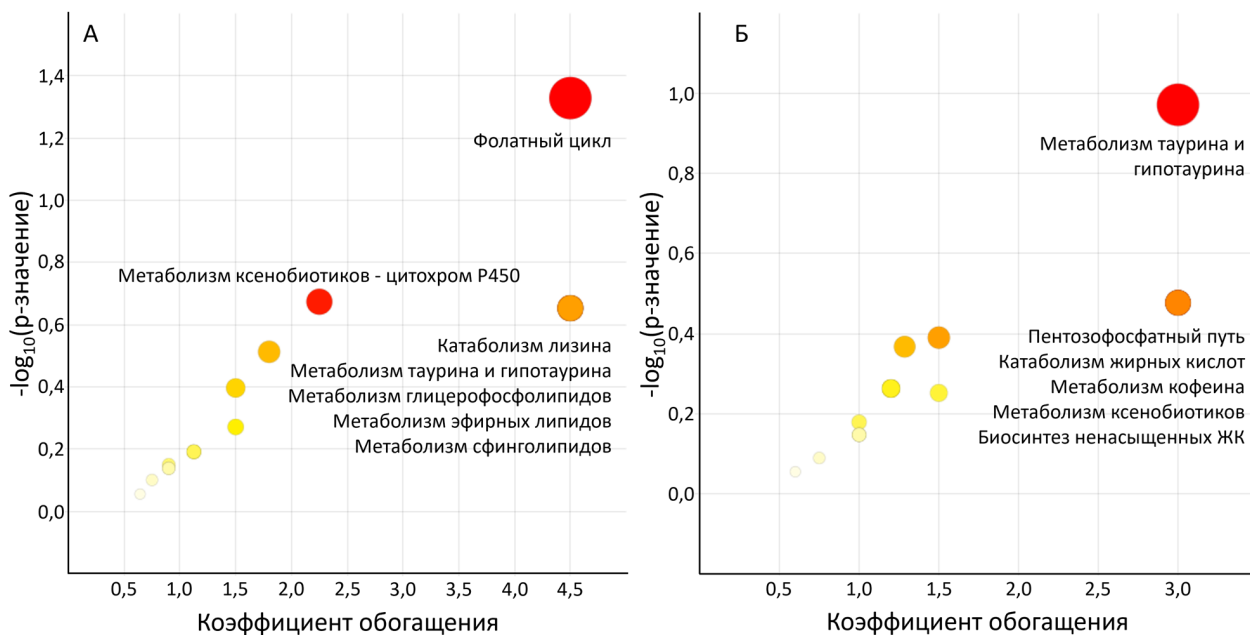


Рисунок 4. Анализ метаболических путей с использованием алгоритма Mummichog и библиотеки KEGG ($p < 0,05$) для ОФ (А) и NILIC (Б) хроматографии. На графиках представлены значения и степень воздействия на метаболические пути патологического состояния на основе полученных экспериментальных данных.

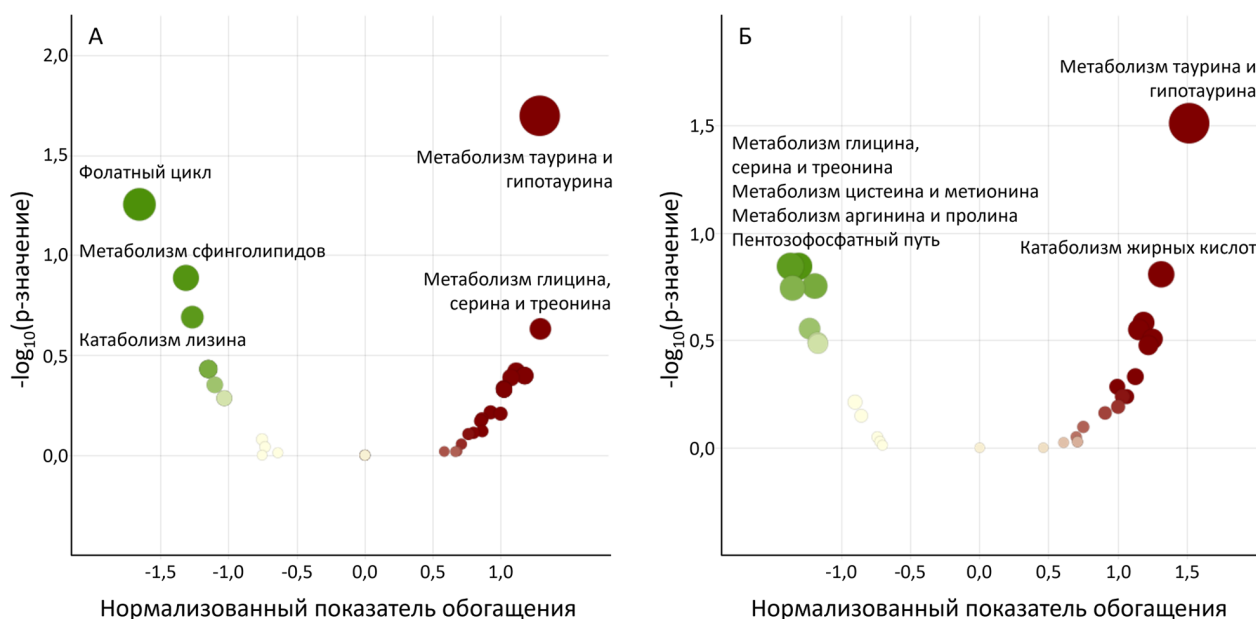


Рисунок 5. Анализ метаболических путей с использованием алгоритма GSEA и библиотеки KEGG ($p < 0,05$) для ОФ (А) и NILIC (Б) хроматографии. На графиках представлены значения и степень воздействия на метаболические пути патологического состояния на основе полученных экспериментальных данных.

В таблице 2 приведены результаты расчёта статистической мощности для значимых аннотированных метаболитов, которая показывает, насколько велика вероятность выявить наблюдаемый эффект при текущем размере выборки. Так, значения мощности более 0,8 говорят о достаточном размере выборки, в то время как значение стандартизованного размера эффекта по Коуэну ($d > 0,8$ для больших эффектов и $d > 1,0$ для очень больших эффектов) для отдельных метаболитов позволяет утверждать, что в условиях ограниченной выборки пилотного

исследования нами были выявлены статистически значимые результаты.

Значения мощности теста при $\alpha = 0,05$ для большинства метаболитов близки к 1, что отражает достаточно крупные эффекты при значениях Cohen's $d > 1,5-5,0$. Применение FDR-коррекции по методу Бенджамини-Хохберга позволило сохранить высокую мощность тестов ($> 0,7$ для значимых метаболитов) при приемлемом контроле ложноположительных открытий и соблюдении баланса чувствительности и строгости метода для полученных метаболомных данных.

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С САЭ

Таблица 2. Оценка статистической мощности для кандидатов в биомаркеры

Метаболит	$\log_2(\text{FC})$	Cohen's d	p -value (t-test)	p_{adj} (FDR)	Мощность ($\alpha = 0,05$)	Мощность (α_{corr})
ОФ-ВЭЖХ-МС анализ						
Ацилкарнитины						
CAR(22:5)	4,311	3,169	$1,32 \times 10^{-6}$	$4,51 \times 10^{-4}$	1,000	0,981
CAR(20:4)	2,376	2,844	$5,45 \times 10^{-6}$	$6,44 \times 10^{-4}$	1,000	0,956
CAR(18:2)	1,619	2,655	$1,28 \times 10^{-5}$	$7,84 \times 10^{-4}$	1,000	0,941
CAR(22:6)	3,420	2,209	$1,06 \times 10^{-4}$	0,002	0,997	0,903
CAR(18:1)	1,649	2,134	$1,53 \times 10^{-4}$	0,003	0,995	0,881
CAR(9:0)	2,034	1,767	$9,37 \times 10^{-4}$	0,009	0,962	0,760
CAR(18:0)	1,519	1,698	0,001	0,012	0,948	0,727
CAR(16:0)	1,396	1,647	0,002	0,014	0,936	0,708
CAR(6:1)	-5,125	-1,406	0,006	0,035	0,844	0,573
CAR(16:1)	1,838	1,304	0,009	0,048	0,787	0,522
Лизофосфолипиды						
LPC(20:5)	3,639	2,293	$7,04 \times 10^{-5}$	0,002	0,998	0,917
LPC(16:0)	2,105	2,211	$1,05 \times 10^{-4}$	0,002	0,997	0,901
LPC(14:0)	2,431	2,077	$2,02 \times 10^{-4}$	0,003	0,992	0,866
LPC(16:1)	1,860	1,965	$3,50 \times 10^{-4}$	0,005	0,986	0,832
LPC(15:0)	2,565	1,864	$5,78 \times 10^{-4}$	0,007	0,976	0,794
LPC(18:2)	1,744	1,462	0,004	0,029	0,871	0,604
LPC(20:4)	1,844	1,456	0,004	0,029	0,868	0,601
LPS(O-18:0)	6,341	2,068	$2,11 \times 10^{-4}$	0,004	0,992	0,869
Другие метаболиты						
Пентадиеновая кислота	-6,971	-1,927	$4,24 \times 10^{-4}$	0,005	0,983	0,820
N,N,N-Триметиллизин	-1,115	-1,708	0,001	0,012	0,950	0,797
НПИС-ВЭЖХ-МС анализ						
Лизофосфолипиды						
LPS(O-18:0)	6,607	4,372	$1,26 \times 10^{-8}$	$1,62 \times 10^{-6}$	1,000	1,000
LPC(P-16:0)	3,977	3,438	$4,30 \times 10^{-7}$	$3,05 \times 10^{-5}$	1,000	0,999
LPC(17:0)	3,283	2,951	$3,38 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-4}$	1,000	0,990
LPC(20:4)	2,784	2,617	$1,53 \times 10^{-5}$	$3,70 \times 10^{-4}$	1,000	0,975
LPC(14:0)	3,374	2,550	$2,08 \times 10^{-5}$	$4,70 \times 10^{-4}$	0,988	0,970
LPC(P-18:0)	2,860	2,424	$3,77 \times 10^{-5}$	$6,28 \times 10^{-4}$	0,999	0,960
LPC(20:3)	2,789	2,357	$5,20 \times 10^{-5}$	$7,18 \times 10^{-4}$	0,999	0,957
LPC(22:6)	2,369	1,965	$3,50 \times 10^{-4}$	0,003	0,986	0,870
LPC(20:5)	3,071	1,876	$5,43 \times 10^{-4}$	0,005	0,977	0,840
LPC(18:0)	3,440	1,853	$6,10 \times 10^{-4}$	0,005	0,975	0,834
LPC(18:1)	2,518	1,791	$8,31 \times 10^{-4}$	0,006	0,966	0,814
LPC(18:3)	0,816	1,775	$9,01 \times 10^{-4}$	0,006	0,963	0,811
LPC(18:2)	1,723	1,664	0,002	0,009	0,940	0,766

Таблица 2. Оценка статистической мощности для кандидатов в биомаркеры (продолжение)

Метаболит	$\log_2(\text{FC})$	Cohen's d	p -value (t-test)	p_{adj} (FDR)	Мощность ($\alpha = 0,05$)	Мощность (α_{corr})
LPC(16:0)	2,312	1,633	0,002	0,010	0,932	0,757
LPG(12:0)	-5,201	-3,421	$4,61 \times 10^{-7}$	$3,09 \times 10^{-5}$	1,000	1,000
LPE(18:0)	3,423	2,775	$7,43 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-4}$	1,000	0,984
LPE(20:5)	1,859	1,595	0,002	0,011	0,921	0,744
LPE(16:0)	1,811	1,496	0,004	0,016	0,885	0,691
Фосфолипиды						
PC(O-38:6)	1,784	2,680	$1,15 \times 10^{-5}$	$3,18 \times 10^{-4}$	1,000	0,979
PC(O-36:5)	1,701	2,629	$1,44 \times 10^{-5}$	$3,70 \times 10^{-4}$	1,000	0,975
PC(38:5)	1,176	1,700	$1,31 \times 10^{-5}$	0,008	0,949	0,779
PC(38:6)	1,170	1,631	0,002	0,010	0,931	0,757
PC(38:3)	1,050	1,370	0,007	0,025	0,826	0,626
PG(33:1)	1,374	1,442	0,005	0,020	0,862	0,665
PA(42:1)	1,084	1,360	0,007	0,026	0,820	0,621
Сфинголипиды						
SM(d18:2/15:0)	5,612	2,558	$2,01 \times 10^{-5}$	$4,50 \times 10^{-4}$	1,000	0,986
SM(d18:1/16:0)	1,778	2,246	$8,84 \times 10^{-5}$	$1,07 \times 10^{-3}$	0,997	0,941
SM(d18:1/16:1)	1,224	1,747	$1,03 \times 10^{-3}$	0,007	0,958	0,798
Ацилкарнитины						
CAR(18:0)	2,321	2,472	$3,01 \times 10^{-5}$	$5,78 \times 10^{-4}$	0,999	0,963
CAR(16:0)	1,746	1,920	$4,37 \times 10^{-4}$	0,004	0,982	0,855
CAR(18:2)	1,602	1,805	$7,73 \times 10^{-4}$	0,006	0,968	0,818
CAR(18:1)	1,711	1,711	$1,24 \times 10^{-3}$	0,008	0,951	0,784
CAR(14:0)	1,791	1,675	$1,48 \times 10^{-3}$	0,036	0,943	0,836
CAR(14:1)	1,699	1,661	0,002	0,009	0,939	0,765
CAR(10:1;O2)	-3,823	-1,452	0,004	0,019	0,866	0,669
CAR(18:2;O2)	-2,256	-1,425	0,005	0,021	0,854	0,657
Другие метаболиты						
Arg-Gly	-8,182	-4,889	$2,23 \times 10^{-9}$	$1,11 \times 10^{-6}$	1,000	1,000
Asn-hydroxyPro	-4,861	-2,487	$2,80 \times 10^{-5}$	$5,78 \times 10^{-4}$	0,999	0,963
Asp-Leu	-6,782	-1,647	0,002	0,009	0,936	0,763
MG(17:0)	-7,421	-4,571	$6,37 \times 10^{-9}$	$1,36 \times 10^{-6}$	1,000	1,000
Докозагексаеновая кислота	3,172	1,733	$1,11 \times 10^{-3}$	0,007	0,956	0,795
Таурин	2,676	3,112	$1,68 \times 10^{-6}$	$9,28 \times 10^{-5}$	1,000	0,994
<i>n</i> -Аминобензойная кислота	5,866	2,015	$2,73 \times 10^{-4}$	0,003	0,989	0,883
Хинолин	-2,264	-1,785	$8,58 \times 10^{-4}$	0,006	0,965	0,813

Примечание: $\log_2(\text{FC})$ – логарифм по основанию 2 кратности изменения уровня метаболитов; Cohen's d – стандартизированный размер эффекта по Коуэну; p -value (t-test) – p -значение; p_{adj} (FDR) – p -значение, с поправкой Бенджамини-Хохберга; Мощность ($\alpha = 0,05$) – мощность теста при стандартном $\alpha = 0,05$; Мощность (α_{corr}) – мощность теста с поправкой Бенджамини-Хохберга (FDR); $\alpha_{\text{corr}} = \alpha \cdot i/m$, где i – ранг переменной, m – количество переменных (497 и 590 для ОФ- и HILIC-ВЭЖХ-МС анализа, соответственно); LPS – лизофосфатидилсерины; LPC – лизофосфатидилхолины; LPG – лизофосфатидилглицеролы; LPE – лизофосфатидилэтаноламины; PC – фосфатидилхолины; PG – фосфатидилглицеролы; PA – фосфатидные кислоты; SM – сфингомиелины; CAR – карнитины; MG – моноглицериды.

С целью оценки диагностической значимости выявленных преаннотированных метаболитов на основании массива данных, содержащих значимые кандидаты в потенциальные биомаркеры САЭ, нами были построены ROC-кривые и рассчитаны площади под кривыми (AUC). ROC-кривая (Receiver Operating Characteristic) позволяет дать оценку качеству классифицирующей модели по разделению двух экспериментальных групп для каждой используемой переменной. Для оценки качества модели также используется характеристика AUC (Area Under ROC): значения AUC в диапазоне от 0,9 до 1,0 говорят о высокой точности; от 0,8 до 0,9 — об очень хорошей точности; от 0,7 до 0,8 — о хорошей точности; от 0,6 до 0,7 — о средней точности; и менее 0,6 — о низкой диагностической точности переменной. На рисунке 6 приведены результаты многомерного анализа на основе ROC-кривой с использованием алгоритма Random Forest.

На основании проведённого анализа ROC-кривых удалось выявить метаболиты, имеющие высокую диагностическую значимость в рамках представленных на анализ образцов плазмы крови (Дополнительные материалы, рис. S2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным нами данным, в группе пациентов с САЭ статистически значимо уменьшались длинноцепочечные ацилкарнитины (CAR(6:1); CAR(16:0); CAR(16:1); CAR(18:1);

CAR(18:2); CAR(20:4)) в качестве промежуточных продуктов внутриклеточного метаболизма жирных кислот. Ацилкарнитин — важная биомолекула, которая участвует во многих метаболических процессах, включая метаболизм жирных кислот. Ацилкарнитин необходим для переноса длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, производящие энергию внутри клеток. Он служит промежуточным звеном в системе карнитинового челнока, обеспечивающим поступление ацильных групп жирных кислот из цитоплазмы в митохондриальный матрикс. Попав в митохондрии, ацильные группы подвергаются бета-окислению, способствуя в конечном итоге синтезу АТФ.

Ацилкарнитины играют важную роль в транспортировке жирных кислот в головной мозг, способствуют их расщеплению и использованию для производства энергии [10]. Важность ацилкарнитина для функционирования и развития мозга была продемонстрирована с помощью исследований, включая энергетический метаболизм, синтез нейротрансмиттеров и нейропротекцию [11]. Ацилкарнитин также участвует в поддержании миелина в составе миелиновой невралной оболочки, отражающей степень функциональной зрелости нейронов. Дисрегуляция метаболизма ацилкарнитина была связана с когнитивными дефицитами и нейродегенеративными заболеваниями [11].

Снижение уровня ацилкарнитинов, обнаруженное в группе пациентов с септической энцефалопатией и изменённом уровне сознания до делирия и комы, подтверждает важность метаболомного скрининга при остром церебральном повреждении для дальнейшего поиска способов коррекции неврологического и когнитивного дефицита у пациентов с сепсисом.

Прогресс в исследовании липидов [12] позволил рассматривать лизофосфатидилхолины в качестве центральных медиаторов липотоксичности посредством запуска апоптоза клеток, опосредованного стрессом; нарушения окислительного фосфорилирования митохондрий печени, что приводит к митохондриальной дисфункции [13]. В мозге фосфолипиды нейронных мембран являются резервуаром для вторичных мессенджеров, участвуют в апоптозе, модуляции активности транспортеров и мембраносвязанных ферментов [13]. Доказано, что при неврологических расстройствах, остром церебральном повреждении в виде ЧМТ происходят выраженные изменения в составе глицерофосфолипидов нейронных мембран. Фосфолипидный состав миелина аналогичен составу белого вещества и сильно отличается от серого вещества головного мозга [14]. Повреждение белого вещества головного мозга при сепсисе верифицируют в виде перивентрикулярного и полуовального массивного поражения по данным нейровизуализации — МРТ головного мозга [15], что клинически проявляется делирием. Из 10 обследованных пациентов с САЭ делирий развивался в ранние сроки постановки диагноза сепсис у 50% больных.

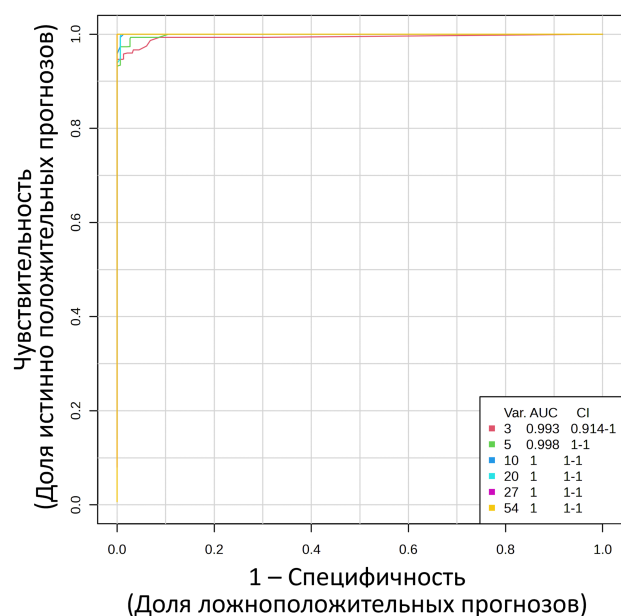


Рисунок 6. Усреднённые ROC-кривые всех моделей, основанные на результативности перестановочных тестов, и AUC для моделей, полученных с использованием различного количества переменных. Ось ординат — чувствительность (частота истинно положительных результатов); ось абсцисс — специфичность (частота ложноположительных результатов). Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

Изменения содержания лизофосфатидилхолинов приводят к повышению проницаемости клеточных мембран, а наряду с накоплением липидных перекисей и нарушением энергетического обмена данные метаболиты могут быть ответственны за нейродегенерацию, лежащую в основе долгосрочных когнитивных нарушений у пациентов с СЭ [14]. Глицерофосфолипиды нейрональных мембран также разрушаются при запуске нейровоспаления — универсального патофизиологического механизма в ответ на церебральное повреждение [14]. В нашем исследовании уровень лизофосфатидилхолинов (LysoPC(14:0); LysoPC(16:0); LysoPC(20:4n6), а также LysoPC(P-16:0); LysoPC(17:0); α -GPC; глицерофосфолипидов LysoPE(18:0) значимо уменьшался у пациентов с СЭ наряду со значительным снижением докозагексаеновой кислоты в плазме крови — незаменимой полиненасыщенной жирной кислоты класса Омега-3, входящей в состав липидов большинства тканей млекопитающих. Увеличение концентраций прекурсора карнитина и коэнзима окисления жирных кислот N6-триметил-L-лизина у пациентов с СЭ также согласуется с данными о нарушении процессов транспортировки длинноцепочечных жирных кислот через митохондриальную мембрану.

Следует остановиться на описании особенностей метаболизма таурина у пациентов с сепсисом и СЭ. Серосодержащая условно незаменимая аминокислота таурин (аминосультфоновая кислота) — ингибирующий нейротрансмиттер в ЦНС, один из основных антиоксидантов, противовоспалительный и антиапоптотический фактор, физиологический стабилизатор клеточных мембран [16]. Его уровень значимо снижался в проведенном исследовании у пациентов с СЭ.

Также в нашем исследовании отмечались нарушения процессов биосинтеза фолата — значимое снижение концентрации *n*-аминобензойной кислоты — промежуточного метаболита в синтезе фолиевой кислоты.

Особо следует подчеркнуть, что вышеуказанные изменения концентрации метаболитов были обнаружены в плазме крови, забранной в 1-е сутки от постановки диагноза сепсис у пациентов с СЭ, т.е. в ранние сроки развития заболевания.

Достижения в теории системной биологии и развитие технологий метаболомики привели к признанию значимости метаболомики для клинической работы в области медицины интенсивной терапии [17]. Многие предыдущие метаболомные исследования у пациентов с сепсисом показали, что профили метаболитов значительно изменяются у пациентов с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО) по сравнению со здоровыми пациентами из контрольной группы и что низкомолекулярные метаболиты могут использоваться для выявления инфекций и построения прогноза заболевания [4, 18]. Клинические исследования метаболомики при СЭ пока достаточно ограничены. На основании биоинформатического анализа в конечном итоге нами идентифицировано

64 метаболита как потенциальных биомаркеров сепсиса и тяжести заболевания.

Два исследования выявили метаболиты, позволяющие отслеживать реакцию на лечение у пациентов с сепсисом [19, 20]. Первая работа была направлена на мониторинг изменений в метаболоме у пациентов с септическим шоком, которые получали терапию L-карнитином, которая позволила бы сократить использование вазопрессоров [19]. Хороший ответ был обнаружен у пациентов с низким кетозным состоянием (уровень гидроксibuтирата составлял 153 мкМ), где было обнаружено увеличение метионина, лизина, фенилаланина и тирозина после приёма L-карнитина. Кроме того, у пациентов с хорошим ответом также был отмечен низкий уровень карнитина и ацетилкарнитина [19]. Во втором исследовании наблюдали пациентов с септическим шоком, у которых показатель полиорганной недостаточности (SOFA) был ниже 8 или снизился более чем на 5 в течение 48 ч после начала лечения [20]. Нецелевое метаболомное исследование, сравнивающее степень изменений метаболитов у ответивших и не ответивших на лечение с течением времени (от исходного уровня до 48 ч), показало, что уровни миристиновой и олеиновой кислот были более снижены при хорошем ответе на лечение [20]. При целенаправленной метаболомике изменения нескольких метаболитов показали разные результаты. При сравнении степени изменения метаболитов с течением времени уровень кинуренина был повышен у ответивших, но ниже, чем у не ответивших на лечение. Интересно, что некоторые фосфолипиды обладали прогностической способностью определять ответ на лечение. Действительно, большинство SM, SM(OH) и PC были увеличены у ответивших, тогда как у не ответивших они были снижены [20]. Эти результаты позволяют предположить, что некоторые метаболиты могут быть потенциальными маркерами для мониторинга ответа на лечение у пациентов с сепсисом. В соответствии с различными исходами заболевания мы обнаружили, что концентрации серосодержащих аминокислот в группе умерших были значительно ниже, чем в группе выживших.

Настоящая исследовательская работа носит пилотный характер и была направлена на апробацию методологии нецелевого метаболомного анализа плазмы крови пациентов с СЭ, отработку протоколов пробоподготовки и анализа данных, а также на формирование гипотез относительно потенциальных биомаркеров. Ограниченное число пациентов обеих экспериментальных групп, обусловленное клиническим контекстом сепсис-ассоциированной энцефалопатии, предполагает возможность выявления преимущественно выраженных метаболических различий. Однако метаболиты, значимо изменяющиеся между группами контроля и СЭ, характеризуются высокими значениями размера эффекта и высокой статистической мощностью, что делает их надёжными кандидатами для последующих исследований.

Даже при относительно небольшой выборке, для метаболомов с наибольшим эффектом (Cohen's $d > 2,0$) мощность исследования превышала значение 0,9 после FDR-коррекции, что указывает на достаточную чувствительность для выявления биологически значимых изменений. Полученные результаты следует рассматривать как предварительные и отражающие совокупность метаболических изменений, связанных как с заболеванием, так и с проводимой терапией. Для их подтверждения и уточнения вклада патологического процесса необходимо провести исследование на расширенной и независимой когорте пациентов, что запланировано нами в дальнейшем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метаболомные исследования перспективны для диагностики и лечения пациентов в критическом состоянии. Полученные результаты демонстрируют возможность применения методологии ВЭЖХ-МС-ВР для анализа метаболомных изменений при сепсис-ассоциированной энцефалопатии и позволяют выделить ряд потенциально значимых метаболитов, требующих валидации в более масштабных исследованиях. Некоторые потенциальные молекулы-метаболиты, которые мы обнаружили в нашем исследовании, и их пути могут стать ценными подсказками и базой для углублённых исследований в области интенсивной терапии в будущем. Мы планируем расширить метаболомные исследования биологических жидкостей у пациентов с САЭ для оценки специфичности биомаркеров повреждения центральной нервной системы и внедрение новых диагностических технологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания “Изучение механизмов развития и разработка подходов к терапии сепсис-ассоциированной энцефалопатии на основе омических технологий” № 122041900090-4 в Национальном медицинском исследовательском центре имени В.А. Алмазова (НМИЦ имени В.А. Алмазова).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НМИЦ имени В.А. Алмазова (выписка № 0204-22 из протокола заседания № 04-22 от 18.04.2022 г.). Все пациенты дали письменное информированное согласие до начала участия в исследовании.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

- Hu J., Xie S., Xia W., Huang F., Xu B., Zuo Z., Liao Y., Qian Z., Zhang L. (2024) Meta-analysis of evaluating neuron specific enolase as a serum biomarker for sepsis-associated encephalopathy. *Int. Immunopharmacol.*, **131**, 111857. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.111857
- Havelund J., Heegaard N., Færgeman N., Gramsbergen J. (2017) Biomarker research in Parkinson's disease using metabolite profiling. *Metabolites*, **7**(3), 42. DOI: 10.3390/metabo7030042
- Trongtrakul K., Thonusin C., Pothirat C., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. (2021) Past experiences for future applications of metabolomics in critically ill patients with sepsis and septic shocks. *Metabolites*, **12**(1), 1. DOI: 10.3390/metabo12010001
- Hussain H., Vutipongsatorn K., Jiménez B., Antcliffe D.B. (2022) Patient stratification in sepsis: using metabolomics to detect clinical phenotypes, sub-phenotypes and therapeutic response. *Metabolites*, **12**(5), 376. DOI: 10.3390/metabo12050376
- Liu J., Zhou G., Wang X., Liu D. (2022) Metabolic reprogramming consequences of sepsis: adaptations and contradictions. *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**(8), 456. DOI: 10.1007/s00018-022-04490-0
- Дрягина Н.В., Кондратьева Е.А., Дубровский Я.А., Кондратьев А.Н. (2020) Метаболом головного мозга. *Российский неврологический журнал*, **25**(1), 4–12. [Dryagina N.V., Kondratyeva E.A., Dubrovskii Ya.A., Kondratyev A.N. (2020) Metabolome of the brain. *Russian Neurological Journal*, **25**(1), 4–12.] DOI: 10.30629/2658-7947-2020-25-1-4-12
- Khan S., Ince-Dunn G., Suomalainen A., Elo L.L. (2020) Integrative omics approaches provide biological and clinical insights: examples from mitochondrial diseases. *J. Clin. Invest.*, **130**(1), 20–28. DOI: 10.1172/JCI129202
- Smirnov K.S., Maier T.V., Walker A., Heinzmann S.S., Forcisi S., Martinez I., Walter J., Schmitt-Kopplin P. (2016) Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *Int. J. Med. Microbiol.*, **306**(5), 266–279. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.03.006
- Xi B., Gu H., Baniyadi H., Raftery D. (2014) Statistical analysis and modeling of mass spectrometry-based metabolomics data. In: *Mass Spectrometry in Metabolomics* (Raftery D., ed.), Springer New York (Methods in Molecular Biology), New York, NY, pp. 333–353. DOI: 10.1007/978-1-4939-1258-2_22
- McCann M.R., George de la Rosa M.V., Rosania G.R., Stringer K.A. (2021) L-Carnitine and acylcarnitines: mitochondrial biomarkers for precision medicine. *Metabolites*, **11**(1), 51. DOI: 10.3390/metabo11010051
- Qu Q., Zeng F., Liu X., Wang Q.J., Deng F. (2016) Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis.*, **7**(5), e2226. DOI: 10.1038/cddis.2016.132
- Musso G., Saba F., Cassader M., Gambino R. (2023) Lipidomics in pathogenesis, progression and treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH): recent advances. *Prog. Lipid Res.*, **91**, 101238. DOI: 10.1016/j.plipres.2023.101238
- Farooqui A.A., Horrocks L.A., Farooqui T. (2000) Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem. Phys. Lipids*, **106**(1), 1–29. DOI: 10.1016/S0009-3084(00)00128-6

14. *Farooqui A.A., Horrocks L.A., Farooqui T.* (2007) Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J. Neurochem.*, **101**(3), 577–599. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04371.x
15. *Trofimova N.V., Andropova T.N., Talybov R.S., Sebelev K.I., Potemkina E.G., Ryzhkov A.V.* (2024) Neuroradiology of sepsis-associated encephalopathy. In: *Sepsis-Associated Encephalopathy: Clinical, Metabolomic, Neurophysiological and Neuroimaging Parallels* (Savvina I.A., Beloborodova N.V., Trofimova T.N., eds.), Nova Science Publishers, New York, pp. 109–138. DOI: 10.52305/QQGR0434
16. *Коденцова В.М., Пусник Л.В., Ладодо О.Б.* (2022) Функциональный ингредиент таурин: адекватные и клинически эффективные дозы. *Медицинский совет*, **16**(14), 88–95. [Kodentsova V.M., Risnik D.V., Ladodo O.B. (2022) Functional ingredient taurine: adequate and clinically effective doses. *Meditinskiy Sovet*, **16**(14), 88–95.] DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-14-88-95
17. *Serkova N.J., Standiford T.J., Stringer K.A.* (2011) The emerging field of quantitative blood metabolomics for biomarker discovery in critical illnesses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **184**(6), 647–655. DOI: 10.1164/rccm.201103-0474CI
18. *Su L., Huang Y., Zhu Y., Xia L., Wang R., Xiao K., Wang H., Yan P., Wen B., Cao L., Meng N., Luan H., Liu C., Li X., Xie L.* (2014) Discrimination of sepsis stage metabolic profiles with an LC/MS-MS-based metabolomics approach. *BMJ Open Respir. Res.*, **1**(1), e000056. DOI: 10.1136/bmjresp-2014-000056
19. *Puskarich M.A., Finkel M.A., Karnovsky A., Jones A.E., Trexel J., Harris B.N., Stringer K.A.* (2015) Pharmacometabolomics of L-carnitine treatment response phenotypes in patients with septic shock. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, **12**(1), 46–56. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201409-415OC
20. *Cambiaghi A., Pinto B.B., Brunelli L., Falcetta F., Aletti F., Bendjelid K., Pastorelli R., Ferrario M.* (2017) Characterization of a metabolomic profile associated with responsiveness to therapy in the acute phase of septic shock. *Sci. Rep.*, **7**, 9748. DOI: 10.1038/s41598-017-09619-x

Поступила в редакцию: 05.07.2025.
После доработки: 20.10.2025.
Принята к печати: 13.11.2025.

METABOLOMIC PROFILING OF PATIENTS WITH SEPSIS-ASSOCIATED ENCEPHALOPATHY

E.D. Kessenikh¹, K.M. Bykova¹, E.A. Murashko^{1}, Ya.A. Dubrovskii¹, V.V. Dorofeykov^{1,2}, I.A. Savvina^{1,3}*

¹Almazov National Medical Research Centre,
2 Akkuratova str., Saint Petersburg, 197341 Russia; *e-mail: kate.murashko@xmail.ru

²Lesgaft National State University of Physical Education, Sport and Health,
35 Dekabristov str., St. Petersburg, 190121 Russia

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
41 Kirochnaya str., Saint-Petersburg, 191015 Russia

Sepsis-associated encephalopathy (SAE) is a condition characterized by acute brain dysfunction developed in the absence of a primary infection in the central nervous system. The aim of this study was to perform a pilot, untargeted metabolomic profiling of the blood plasma of SAE patients to identify metabolic changes potentially associated with the pathological condition and to generate hypotheses for further studies of its pathogenesis, as well as to the search for promising biomarkers, and the assessment of the severity of the patient's condition. Metabolomic profiling was performed using HPLC-HR-MS, followed by statistical analysis of the obtained data. This blinded, randomized, controlled clinical trial revealed significant differences in the metabolic profiles of the study and control groups. Functional analysis showed the metabolic pathways most affected by pathological processes in SAE patients. These included metabolism of acylcarnitines, lysophosphatidylcholines, and taurine, folate biosynthesis, and the drug metabolism involving the cytochrome P450 pathway. In SAE patients with impaired consciousness, including delirium and coma, decreased levels of long-chain acylcarnitines and lysophosphatidylcholines were observed. The metabolomic profiles of SAE patients differed significantly between the groups of deceased and surviving patients: concentrations of sulfur-containing amino acids were significantly lower in the group of deceased than in the group of survivors. Our study identified 64 candidate biomarkers that could potentially be used to predict sepsis outcomes. However, further study is needed using an expanded and independent cohort of patients.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: metabolomics; metabolites; sepsis-associated encephalopathy; sepsis

Funding. This study was supported by the State-funded research project “Investigation of the mechanisms of the development of sepsis-associated encephalopathy and study of approaches to its treatment based on omics technologies” (no. 122041900090-4).

Received: 05.07.2025; revised: 20.10.2025; accepted: 13.11.2025.