

Метаболомное профилирование крови пациентов с хроническим нарушением сознания

А. А. Орлова¹, Е. А. Кондратьева^{2,3*}, Я. А. Дубровский⁴, Н. В. Дрягина²,
Е. В. Вербицкая⁵, С. А. Кондратьев², А. А. Костарева⁴, А. Н. Кондратьев²

¹ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России, Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14

² Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова филиал НМИЦ им. В. А. Алмазова Россия, 191014, г. Санкт-Петербург, ул. Маяковского, д. 12

³ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР), Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

⁵ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России, Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

Для цитирования: А. А. Орлова, Е. А. Кондратьева, Я. А. Дубровский, Н. В. Дрягина, Е. В. Вербицкая, С. А. Кондратьев, А. А. Костарева, А. Н. Кондратьев. Метаболомное профилирование крови пациентов с хроническим нарушением сознания. *Общая реаниматология*. 2022; 18 (2): 22–36. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2022-2-22-36> [На русск. и англ.]

Резюме

Основными вариантами хронического нарушения сознания (ХНС), развивающегося при неблагоприятном исходе комы, являются вегетативное состояние/синдром ареактивного бодрствования (ВС/САБ) и состояние минимального сознания (СМС).

Цель исследования — изучение основных различий метаболомных нарушений у пациентов в ВС/САБ и СМС, а также выявление изменений метаболома в зависимости от фазы сна или бодрствования.

Материалы и методы. Методами обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии провели целевой метаболомный анализ плазмы крови 10 пациентов в ВС/САБ (группа 1), 6 пациентов в СМС (группа 2). Этиология поражения головного мозга: группа 1 (ЧМТ — 2, гипоксия — 8), группа 2 (ЧМТ — 5, гипоксия — 1). У всех пациентов катетеризировали внутреннюю яремную вену, забор крови проводили в состоянии бодрствования в дневное время в течение 2 суток. Аликвоты пулированных образцов плазмы очищали от белковых компонентов, анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в двух режимах — обращенно-фазовом и гидрофильном. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме сканирования по полному ионному току: регистрация положительно-заряженных ионов в диапазоне m/z от 50 до 1300 а. е. м. Выравнивание и нормализацию данных производили с использованием программного обеспечения MS-DIAL ver. 4.70, различия выявляли методами дисперсионного, дискриминантного и кластерного анализа. Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с использованием программного обеспечения MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

Результаты. Выявили четыре основных метаболита (при $VIP > 0,5$), содержание которых в наибольшей степени модулировалось в зависимости от рассматриваемой группы: 4 (m/z 124,0867, $Rt=17,67$, $p<0,01$), 33 (m/z 782,5722, $Rt=17,69$, $p<0,01$), 6 (m/z 125,0904, $Rt=18,43$, $p<0,01$) и 1 (m/z 463,2304, $Rt=15,78$, $p<0,01$), при отсутствии значимых различий между дневными и ночными заборами образцов крови. Показали наличие значимых количественных различий трех метаболитов в группах: 14 (m/z 162,1126, $Rt=10,28$, $p<0,01$), 35 (m/z 780,5483, $Rt=7,65$, $p<0,01$) и 41 (m/z 806,5649, $Rt=7,58$, $p<0,01$), и четырех метаболитов при сравнении дневных и ночных заборов: 14 (m/z 162,1126, $Rt=10,28$, $p=0,0201$), 35 (m/z 780,5483, $Rt=7,65$, $p<0,01$), 41 (m/z 806,5649, $Rt=7,58$, $p<0,01$) и 48 (m/z 848,5354, $Rt=7,65$, $p<0,01$).

Заключение. Целевой метаболомный анализ подтвердил гипотезу о вероятных значимых количественных и качественных различиях состава метаболитов в зависимости от формы ХНС и циркадианного ритма. В ходе исследования установили набор метаболитов – потенциальных биомаркеров для дифференциальной диагностики ВС/САБ и СМС — 4, 33, 6, 1 (в эксперименте на обращенно-фазовой колонке) и 14, 35, 41, 48 (в эксперименте на гидрофильной колонке), исходя из их значительного вклада в проявление межгрупповых и внутригрупповых различий. Целью дальнейших исследований будет проведение идентификации и характеристики обозначенных метаболитов.

Ключевые слова: хроническое нарушение сознания; вегетативное состояние; синдром ареактивного бодрствования; состояние минимального сознания; метаболомика; метаболомный профиль; гематоэнцефалический барьер; циркадианный ритм; лимфатическая система; прогнозирование восстановления сознания; мультидисциплинарный подход

Адрес для корреспонденции:

Екатерина Анатольевна Кондратьева
E-mail: eak2003@mail.ru

Correspondence to:

Ekaterina A. Kondratieva
E-mail: eak2003@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-01066.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Metabolomic Profiling of the Blood of Patients with Chronic Consciousness Disorders

Anastasia A. Orlova¹, Ekaterina A. Kondrat'eva^{2,3*}, Yaroslav A. Dubrovskii⁴,
Natalia V. Dryagina², Elena V. Verbitskaya⁵, Sergey A. Kondratev²,
Anna A. Kostareva⁴, Anatoly N. Kondratev²

¹ St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Ministry of Health of Russia,
14 Professor Popova Str., 197376 St. Petersburg, Russia

² A. L. Polenov Russian Research Institute for Neurosurgery, V.A. Almazov National Research Center,
12 Mayakovsky Str., 191014 St. Petersburg, Russia

³ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

⁴ V. A. Almazov National Medical Research Center, Ministry of Health of Russia,
2 Akkuratova Str., 197341 St. Petersburg, Russia

⁵ Academician I. P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia,
6–8 Lev Tolstoy Str., 197022 St. Petersburg, Russia

Summary

The main variants of chronic consciousness disorder (CCD) developing in adverse coma outcome are vegetative state/unresponsive wakefulness syndrome (VS/UWS) and minimal consciousness state (MCS).

The aim of the study was to investigate the main differences in metabolomic abnormalities in patients with VS/UWS and MCS, as well as to identify changes in metabolomics depending on sleep or wakefulness phase.

Materials and Methods. Untargeted metabolome analysis of blood plasma of 10 patients in VS/UWS (group 1) and 6 patients in MCS (group 2) was performed using reversed-phase and hydrophilic chromatography methods. The underlying conditions of brain injury were TBI (2 in group 1 and 5 in group 2) and hypoxia (8 in group 1 and 1 in group 2). The internal jugular vein was catheterized in all patients, and blood was collected while awake during the daytime for 2 days. Aliquots of pooled plasma samples were purified from protein components and analyzed by high-performance liquid chromatography in two modes: reversed-phase and hydrophilic ones. Mass-spectrometric detection was performed in full ion current scanning mode: registration of positively charged ions in the m/z range from 50 to 1300 a.u. Data were adjusted and normalized using MS-DIAL software ver. 4.70 software; differences were identified using analysis of variance, discriminant and cluster analysis. The data were analyzed and visualized using MetaboAnalyst 5.0 software (<https://www.metaboanalyst.ca>).

Results. Four major metabolites (at $VIP > 0.5$), which content was most modulated depending on the study group, were identified including 4 (m/z 124.0867, $Rt=17.67$, $p<0.01$), 33 (m/z 782.5722, $Rt=17.69$, $p<0.01$), 6 (m/z 125.0904, $Rt=18.43$, $p<0.01$) and 1 (m/z 463.2304, $Rt=15.78$, $p<0.01$), with no significant differences between daytime and nighttime blood samples. Significant quantitative differences were shown for three metabolites in the groups, 14 (m/z 162.1126, $Rt=10.28$, $p<0.01$), 35 (m/z 780.5483, $Rt=7.65$, $p<0.01$), and 41 (m/z 806.5649, $Rt=7.58$, $p<0.01$), and four metabolites when comparing the daytime and nighttime samples: 14 (m/z 162.1126, $Rt=10.28$, $p=0.0201$), 35 (m/z 780.5483, $Rt=7.65$, $p<0.01$), 41 (m/z 806.5649, $Rt=7.58$, $p<0.01$), and 48 (m/z 848.5354, $Rt=7.65$, $p<0.01$).

Conclusion. Untargeted metabolomic analysis confirmed the hypothesis of likely significant quantitative and qualitative differences in metabolite composition depending on the type of CCD and circadian rhythm. The study established a set of metabolites that are potential biomarkers for differential diagnosis of VS/UWS and MCS including 4, 33, 6, 1 (in the experiment on the reversed-phase column) and 14, 35, 41, 48 (in the experiment on the hydrophilic column), based on their significant contribution to intergroup and intragroup differences. Further studies will be aimed to characterize the identified metabolites.

Keywords: *chronic consciousness disorder; vegetative state; unresponsive wakefulness syndrome; minimal consciousness state; metabolomics; metabolomic profile; blood-brain barrier; circadian rhythm; glymphatic system; prediction of consciousness recovery; multidisciplinary approach*

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research under Scientific Project No. 19-29-01066.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Full text of the article in Eng. read on www.reanimatology.com

Введение

К хроническим нарушениям сознания (ХНС) относят варианты неблагоприятного выхода из комы, при которых у пациента полностью отсутствуют или грубо нарушены признаки осознанной

деятельности [1]. Основными формами ХНС являются «вегетативное состояние» — или «синдром ареактивного бодрствования» (ВС/САБ), когда на фоне сохранного цикла сон-бодрствование нет признаков осознания себя и окружающего,

а также «состояние минимального сознания минус» (СМС «минус») — сохранена возможность минимального контакта в виде фиксации и слежения взором и «состояние минимального сознания плюс» (СМС «плюс») — пациент способен выполнить простое задание и ответить на вопрос «да-нет» вербально или кивком головы [2–4].

В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в понимании механизмов нарушения сознания после тяжелого повреждения головного мозга, а мультидисциплинарный подход к данной проблеме назван способом устранения пробелов для продвижения к интегрированной трансляционной науке [5]. Наиболее изученными и устойчивыми функциональными состояниями мозга являются сон и бодрствование — циркадианные ритмы. Изучение структуры сна у пациентов с ХНС приобретает особую актуальность ввиду открытия глимфатической системы мозга, позволяющей в фазу медленного сна выводить из глии амилоидные белки и тау-олигомеры [6]. Нарушение функционирования данной системы является одним из механизмов развития нейродегенеративных процессов и нейровоспаления [7–9]. На наш взгляд, изучение процессов сна и бодрствования у пациентов с ХНС представляет значительный интерес с позиции исследования функционального состояния мозга, а также поддерживающих эти фазы вариантов регуляции гомеостаза. В этом отношении метаболомику можно рассматривать как один из подходов к раскрытию потенциальных низкомолекулярных биомаркеров функционального состояния мозга у пациентов с ХНС. Общий метаболомный профиль может служить прямым индикатором метаболических изменений в биологической системе [10]. Известно, что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в нормальных условиях непроницаем для многих метаболитов. Различные патологические состояния — нейродегенерация, нейровоспаление, черепно-мозговая травма (ЧМТ), гипоксия приводят к нарушению ГЭБ, работающего в обоих направлениях, следовательно, метаболомный профиль плазмы может отражать нарушения метаболизма в головном мозге [11, 12]. В настоящее время активно изучают изменения метаболомного профиля крови при инсульте [13], ЧМТ [14], сахарном диабете [15], онкологических процессах [16–18].

Анализ результатов метаболомных исследований, полученных при изучении фаз сна и бодрствования у пациентов с ХНС позволит выявить дополнительные прогностические маркеры возможности восстановления сознания и, возможно, в дальнейшем разработать патогенетические подходы к лечению данной категории пациентов. Таким образом, целью данного исследования было изучение основных разли-

чий метаболомных нарушений у пациентов в вегетативном состоянии/синдроме ареактивного бодрствования и состоянии минимального сознания и выявление изменений метаболома в зависимости от фазы сна или бодрствования.

Материал и методы

Исследование поддержано этическим комитетом ФГБУ НМИЦ им. В. А. Алмазова (протокол № 23082019), проведено в соответствии с этическим кодексом Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация). Пациентов госпитализировали в отделение анестезиологии и реанимации на период не менее 21 суток (в 2019–2020 гг.). В исследование включили 16 пациентов с ХНС. Для выявления признаков сознания проводили пятикратную оценку по шкале восстановления после комы — Coma Recovery Scale-Revised (шкала CRS-R) в течение первых 10 дней госпитализации. В зависимости от суммарного балла по шкале CRS-R пациентов разделили на две группы. В группу 1 отнесли больных с суммарным баллом от 0 до 5 по шкале CRS-R (уровень сознания соответствовал критериям BC/CAB), в группу 2 — с суммарным баллом по шкале CRS-R от 9 до 15) — уровень сознания соответствовал критериям СМС «минус» и «плюс». Характеристику пациентов по возрасту, продолжительности нарушения сознания и суммарному баллу по шкале CRS-R представили в табл. 1.

Этиология поражения головного мозга: группа 1 (ЧМТ — 2, гипоксия — 8), группа 2 (ЧМТ — 5, гипоксия — 1). В исследование не включали пациентов с острыми инфекционными процессами, дисфункцией печени и почек. Фармакологические препараты, которые получали пациенты на момент забора сыворотки крови, представили в табл. 2.

Этапы исследования представили на рис. 1.

Всем пациентам за сутки до обследования установили катетер в правую яремную вену, с направлением кончика катетера вверх (против кровотока) — для получения крови, «оттекающей» от головного мозга. Забор крови проводили в состоянии бодрствования в дневное время (в 1200), а также ночью (в 300) в течение 2 суток (выполняли 2 дневных и 2 ночных забора в течение 2 суток). Кровь забирали в вакутейнеры с ЭДТА в качестве антикоагулянта, помещали на лед и немедленно доставляли в лабораторию, где центрифугировали в течение 15 минут при 2700 об/мин, аликвотировали в эппендорфах и замораживали при –25°C. Гемолизированные образцы выбраковывали и не включали в дальнейшее исследование.

Пробоподготовка. Пулирование и очистка плазмы крови от белковых молекул. Для анализа использовали пулированные образцы плазмы крови — пулы образовывали в точках день–ночь для каждой группы, т.е. сформировали 2 пулированных образца в 1 группе (дневной образец содержал плазму 10 пациентов первого и второго дневного заборов; ночной образец содержал плазму 10 пациентов первого и второго ноч-

Таблица 1. Характеристика пациентов с хроническим нарушением сознания.

Основные показатели	Возраст, лет	Продолжительность нарушения сознания, мес	CRS-балл
Группа 1 (n=10)			
Среднее	38	5.4	4
Среднеквадратичное отклонение	12	7.8	1
Медиана	40	2.0	4
Минимум	21	1.0	1
Максимум	54	26.0	5
Процентиль 25	26	1.0	3
Процентиль 75	45	6.0	5
Группа 2 (n=6)			
Среднее	37	9.7	12
Среднеквадратичное отклонение	15	11.3	2
Медиана	31	4.0	11
Минимум	21	1.0	9
Максимум	61	26.0	15
Процентиль 25	29	1.0	10
Процентиль 75	51	22.0	13

Таблица 2. Перечень общих и отличных для каждой группы пациентов фармакологических препаратов.

Группа 1 (ВС/САБ)	Группа 2 (СМС)
	Ипидакрин
	Амлодипин
	Бисопролол
	Вальпроевая кислота
	Дифенин
	Этилметилгидроксипиридина сукцинат
	Амантадина сульфат
	Надропарин кальция
	Толперизона гидрохлорид
	Холина альфосцерат
	Цитихолин
	Омепразол
Спиронолактон	Лактулоза
Леветирацетам	Клонидин
Мемантин	Пророксан
Панкреатин	Пептидов мозга комплекс
Карбамазепин	
Флуконазол	
Янтарная кислота, инозин, никотинамид	
Апиксабан	
Левотироксин	

ного заборов) и 2 пулированных образца во 2 группе (дневной образец содержал плазму 6 пациентов первого и второго дневного заборов; ночной образец содержал плазму 6 пациентов первого и второго ночного заборов). После этого из каждого пулированного образца отбирали аликвоту 100 мкл и переносили в новый эппендорф. Затем к каждому образцу добавляли 400 мкл охлажденного ацетонитрила и перемешивали. Для удаления белковых компонентов образцы центрифугировали 10 минут (12000 об/мин, 4°C), 400 мкл супернатанта переносили в хроматографическую виалу для последующего анализа.

Хромато-масс-спектрометрический анализ.

Условия хроматографического разделения. Хроматографическое разделение компонентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили в двух режимах:

1. Обратенно-фазовая хроматография.

Колонка — Intensity Solo 2 C18 (Bruker) длина 100 мм, диаметр колонки 2,10 мм, диаметр частиц сорбента 1,8 мкм.

Подвижная фаза:

- компонент А — 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде;
- компонент В — ацетонитрил категории ВЭЖХ;

Режим хроматографического элюирования — градиентный

2. Гидрофильная хроматография (HILIC)

Хроматографическая колонка — Ascentis Express HILIC (Merck) длина 100 мм, диаметр колонки 2,10 мм, диаметр частиц сорбента 2,7 мкм.

Подвижная фаза:

- компонент А — 10 мМ NH₄COOH с добавлением муравьиной кислоты (0,1 %) в деионизированной воде;
- компонент В — ацетонитрил категории для ВЭЖХ;

Режим хроматографического элюирования — градиентный.

Условия работы масс-спектрометрического детектора. Масс-спектрометрический детектор — Bruker

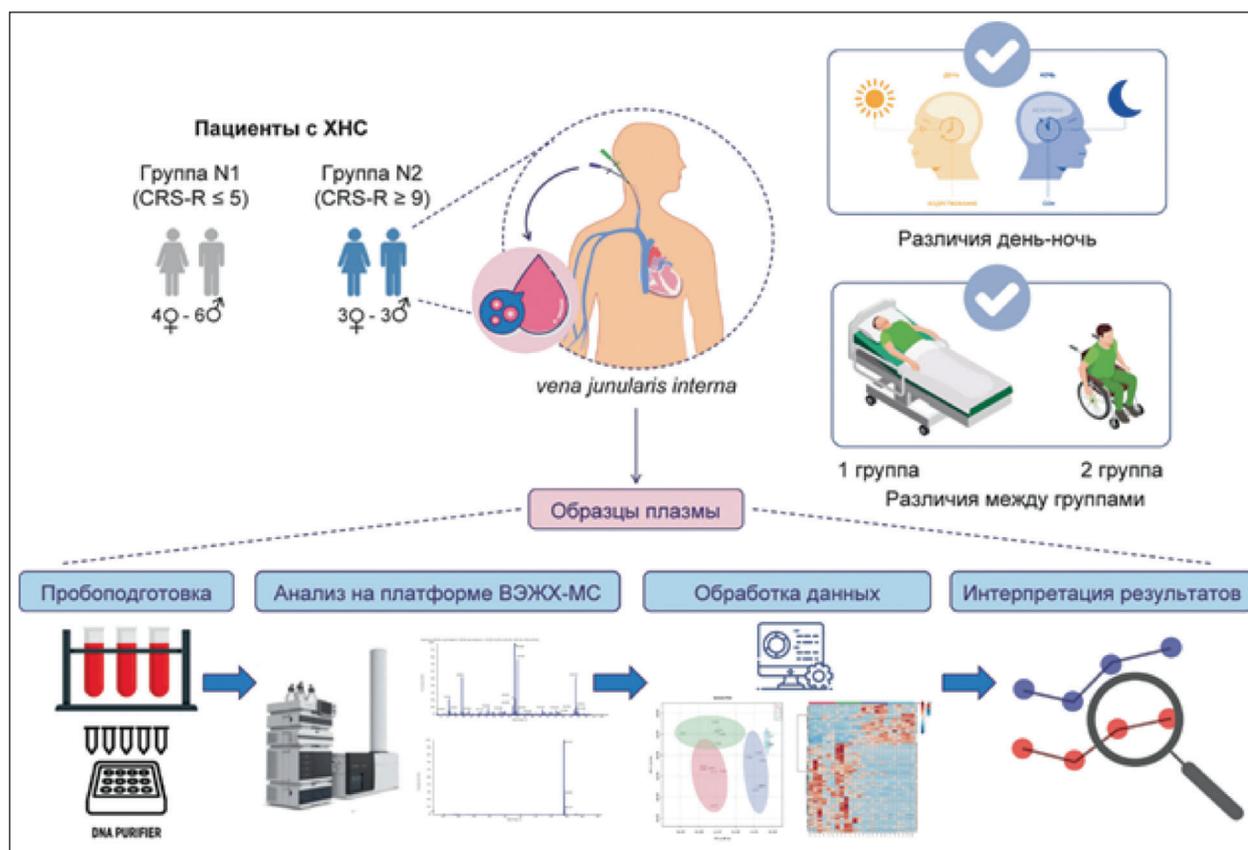


Рис. 1. Этапы нецелевого анализа крови у пациентов с хроническим нарушением сознания.

Таблица 3. Соотношение компонентов подвижной фазы.

Время, минут	A,%	B,%
0	95	5
0,5	95	5
15,5	45	55
16,5	25	75
17,5	25	75
17,6	95	5
20	95	5

Примечание. Здесь и в табл. 4: Скорость потока элюента — 0,3 мл/мин; температура термостата колонки — 40°C; температура термостата отделения для проб — 10°C; объем ввода пробы — 2 мкл; время анализа — 20 мин.

Таблица 4. Соотношение компонентов подвижной фазы.

Время, минут	A,%	B,%
0	5	95
3	5	95
12	40	60
15	40	60
16	5	95
20	5	95

Q-TOF Maxis Impact с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением для управления и обработки данных «otof Control».

Режим работы: Поток газа-осушителя (азот) — 8 л/мин; давление газа на небулайзере — 2 бар; температура проводящего капилляра — 220°C; напряжение на капилляре — 4500 В; детектирование в режиме сканирования по полному ионному току: регистрация ионов в диапазоне m/z от 50 до 1300 а. е. м. (при положительной ионизации).

Обработка полученных данных. Данные полученные в ходе хромато-масс-спектрометрического анализа конвертировали в формат mzML и обрабатывали с использованием программного обеспечения для обзорной метаболомики MS-DIAL (http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/index.html). Выравнивание, нормализацию (данные были очищены от фонового шума и неродственных ионов) данных производили с использованием программного обеспечения MS-DIAL ver. 4.70. Концентрации исследуемых веществ по определению имеют log-

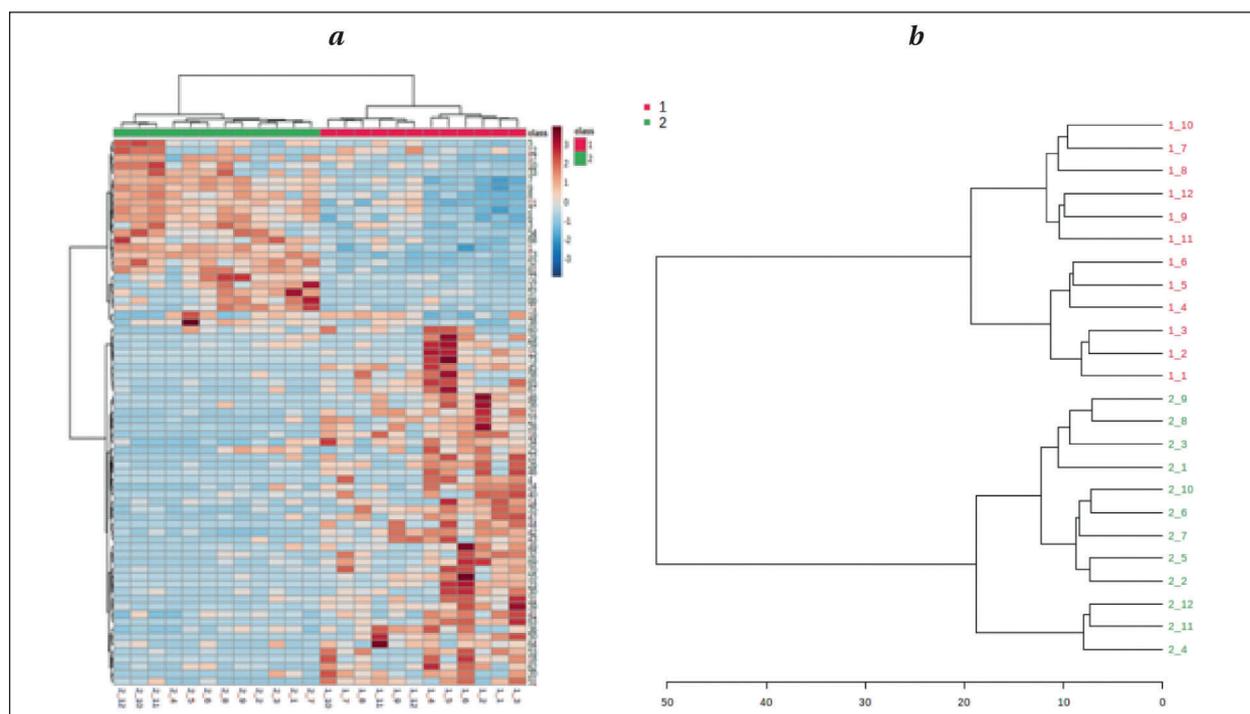


Рис. 2. Иерархический кластерный анализ образцов 1 и 2 групп с колонки C18.

Примечание. *a* — тепловая карта метаболитов; исследуемые образцы плазмы по группам расположены в столбцах: красные соответствуют 1 группе, зеленые — 2 группе, а выявленные переменные-компоненты — в строках. Цвета варьируют от темно-синего до темно-красного, обозначая изменение содержания переменных: от очень низкого (темно-синего) до высокого (темно-красного). *b* — дендрограмма; образцы формируют четкие кластеры 1 (красные) и 2 (зеленые) групп.

нормальное распределение, поэтому данные подвергали нормализации по медиане, логарифмической трансформации и автоматическому масштабированию (усредненному по центру и разделенному на стандартное отклонение каждой переменной). Статистическую обработку и визуализацию данных производили на общепринятой для метаболомного анализа платформе MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Сравнимые межгрупповые различия проверяли с использованием критерия Стьюдента, теста Манна-Уитни (для сравнения 1 и 2 группы) и теста ANOVA (для сравнения циркадных изменений метаболома) в соответствии с нормальным распределением логарифмически трансформированных переменных. Критический уровень значимости установили на уровне $\alpha=0,05$. Кроме того, выполнили неконтролируемый анализ главных компонент (PCA) и контролируемый анализ PLS-DA с масштабированным по Парето набором данных и преобразованием мощности с использованием первых двух скрытых переменных. На основе моделей PLS-DA создали графики вулканов, отображающие важность переменных в проекции (VIP) против скорректированных p -значений (p (*corr*), значения нагрузки, масштабированные как значения коэффициентов корреляции). Переменные с $VIP>0,5$, $q\leq 0,050$ и абсолютным $p(\text{corr})\geq 0,30$ считали значимыми. Для иллюстрации сложных ассоциаций между несколькими параметрами на основании нормали-

зованных данных провели кластерный анализ, при котором кластеризацию производили с использованием метода Варда, а мерой близости считали евклидово расстояние [19, 20].

Результаты и обсуждение

Первичная обработка данных. Проанализировали пулированные образцы крови пациентов с ХНС двух групп. Данные высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) для всех пулированных образцов получили на двух различных хроматографических колонках — гидрофильной (HILIC) и обращенно-фазовой (C18), для комплексной оценки метаболитов различной полярности. Спектры групп показали согласованный набор присутствующих сигналов метаболитов. Количество сырых спектральных сигналов, выявленных инструментально, составляло 6569 для анализа в режиме HILIC и 7952 — на колонке C18. Шумовые пики и артефактные пики отфильтровали, с получением 6134 и 4759 сигналов соответственно. На основании гипотезы о вероятных значимых количественных и качественных различиях состава метаболитов в зависимости от тяжести состояния человека, среди метаболитов с использованием анализа ANOVA выявили те, относительные содержания которых, вычисляемые по площадям

хроматографических пиков, подвержены статистически значимым изменениям в зависимости от принадлежности к определенной группе. Таким образом определили 63 метаболита для колонки HILIC и 73 метаболита для колонки C18 ($p < 0,05$) (табл. 5, 6).

Анализ данных обращенно-фазовой хроматографии. Нормализованные данные относительных содержаний хроматографических сигналов, полученных на колонке C18, импортировали в программное обеспечение MetaboAnalyst 5.0 и визуализировали с использованием методов кластерного анализа. Полученная иерархически сгруппированная тепловая карта метаболитов отражает сравнительную оценку средних содержаний метаболитов, а дендрограмма демонстрирует, с одной стороны, значимую корреляцию между всеми образцами одной группы, и четкую кластеризацию образцов, относящихся к группе 1 и 2, с другой (рис. 2).

Предварительные выводы подтвердили с использованием иных статистических методов. График оценки на основании неконтролируемой модели PCA (рис. 3, *a*) показал кластеры образцов группы 1 (BC/СМС) и группы 2 (СМС) в двух основных компонентах PC1 и PC2, на которые приходится 87 и 12% дисперсии данных, соответственно. Чтобы сделать это различие более очевидным, выполнили контролируемый анализ PLS-DA с масштабированием по Парето набором данных и преобразованием мощности с использованием первых двух скрытых переменных. На данной модели получили аналогичные с PCA кластеры для групп 1 и 2 (рис. 3 *b*), а также на обеих моделях показали относительно большую однородность образцов группы 2. В соответствии с графиками нагрузки PLS-DA (рис. 3, *c*) выявили четыре основных метаболита (при $VIP > 0,5$), содержание которых в наибольшей степени модулировалось в зависимости от группы пациентов, среди них сигналы 4 (m/z 124,0867, $R_t=17,67$, $p < 0,01$), 33 (m/z 782,5722, $R_t=17,69$, $p < 0,01$), 6 (m/z 125,0904, $R_t=18,43$, $p < 0,01$) и 1 (m/z 463,2304, $R_t=15,78$, $p < 0,01$). При этом содержание метаболита 4 было выше в первой группе, а метаболитов 33, 6 и 1 — во второй.

При проведении анализа различий состава метаболитов образцов дневного и ночного забора на колонке C18 статистически значимых различий не обнаружили. На основании иерархического кластерного анализа показали значимую корреляцию между всеми, как дневными, так и ночными, образцами одной группы (рис. 4, *a* и *b*), в анализе PLS-DA обособленные кластеры дневных и ночных заборов не образовались (рис. 5).

Анализ данных гидрофильной хроматографии. Иерархически сгруппированная тепловая карта метаболитов с наибольшим отно-

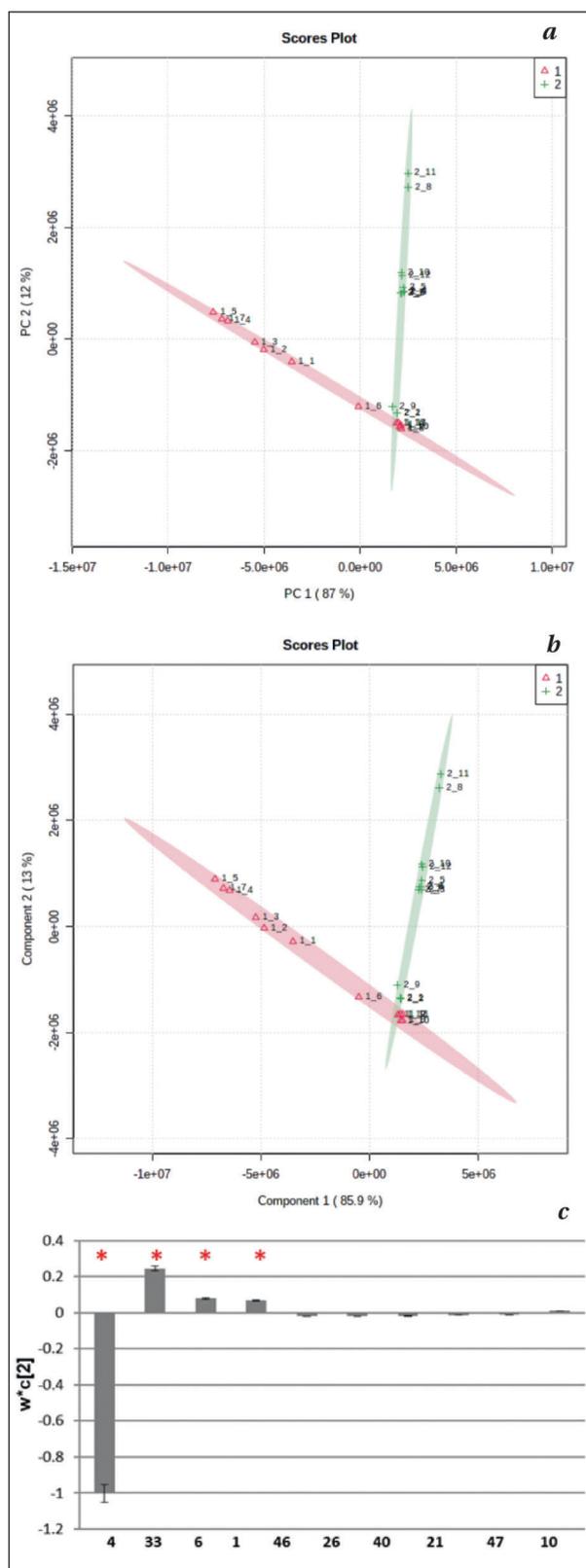


Рис. 3. Графики оценки PCA (А) и PLS-DA (Б) 1 и 2 группы с колонки C18.

Примечание. *a* и *b* — красным облаком представлен кластер 1 группы, зеленым — кластер 2 группы. 1_1-1_12 — исследуемые образцы плазмы пациентов 1 группы; 2_1-2_12 — исследуемые образцы плазмы пациентов 2 группы. *c* — график загрузки модели PLS-DA, наблюдаемый PC 2 ($w^*c[2]$): каждый столбец представляет собой предполагаемый маркерный метаболит со стандартными ошибками, отображаемыми на панели ошибок.

Таблица 5. Перечень целевых метаболитов для колонки ННЛС.

№ метаболита п/п	m/z	tR	Среднее нормализованное значение для групп		p
			1	2	
1	116,07095	2,488	0,723±0,626	-0,723±0,747	<0,0001*
2	121,96481	8,845	0,730±0,221	-0,730±0,938	0,0002*
3	129,06573	9,348	0,800±0,507	-0,800±0,662	<0,0001*
4	129,97771	10,045	-0,549±1,025	0,549±0,617	0,0018**
5	131,95901	8,258	-0,209±0,593	0,209±1,282	0,0284**
6	133,95724	8,564	-0,864±0,569	0,864±0,374	<0,0001*
7	136,04131	3,363	0,038±1,257	-0,038±0,712	0,3777**
8	143,99974	10,047	-0,607±1,100	0,607±0,275	0,0028*
9	144,98315	6,978	-0,766±0,891	0,766±0,129	<0,0001*
10	146,1156	10,44	-0,275±0,971	0,275±0,991	0,1842*
11	146,11641	10,411	-0,265±0,972	0,265±0,996	0,2005*
12	153,03342	9,78	-0,766±0,859	0,766±0,271	<0,0001**
13	156,04485	9,013	-0,908±0,463	0,908±0,278	<0,0001*
14	162,11261	10,278	0,206 ±0,778	-0,206±1,180	0,3228*
15	175,11806	10,621	-0,823±0,557	0,823±0,552	<0,0001*
16	185,02979	1,43	-0,012±0,954	0,012±1,086	0,955*
17	188,07005	7,322	-0,408±0,695	0,408±1,116	0,0427*
18	226,04523	7,582	-0,478±0,821	0,478±0,958	0,0155*
19	353,07663	3,476	-0,695±0,381	0,695±0,944	0,0003*
20	385,03558	7,325	0,075±0,898	-0,075±0,128	0,2657**
21	480,34351	8,566	-0,853±0,482	0,853±0,520	<0,0001*
22	496,62271	8,726	0,369±0,221	-0,369±1,321	0,0284**
23	533,32251	3,401	0,369±0,623	-0,369±1,186	0,0145**
24	566,89081	7,513	-0,860±0,584	0,860±0,370	<0,0001*
25	634,87213	7,513	-0,899±0,398	0,899±0,413	<0,0001*
26	701,49713	7,245	-0,898±0,468	0,898±0,333	<0,0001*
27	702,85931	7,513	-0,884±0,428	0,884±0,452	<0,0001*
28	736,86053	7,512	-0,879±0,431	0,879±0,469	<0,0001*
29	738,50195	6,442	0,473±0,087	-0,473±1,263	0,0029**
30	741,53412	8,296	-0,884±0,471	0,884±0,407	<0,0001*
31	759,04663	7,651	0,663±0,486	-0,663±0,946	0,0005*
32	759,17041	7,65	0,523±0,794	-0,523±0,929	0,0071*
33	769,55829	7,652	-0,773±0,694	0,773±0,553	<0,0001*
34	770,85394	7,513	-0,884±0,444	0,884±0,434	<0,0001*
35	780,54828	7,654	-0,873±0,515	0,873±0,403	<0,0001**
36	784,93988	7,592	0,642±0,373	-0,642±1,026	0,0012*
37	786,96295	7,596	0,236±1,240	-0,236±0,657	0,2593*
38	793,54767	8,297	-0,901±0,457	0,901±0,333	<0,0001*
39	796,54877	7,777	-0,812±0,611	0,812±0,527	<0,0001*
40	802,58978	1,545	-0,017±1,071	0,017±0,971	0,936*
41	806,56488	7,584	-0,823±0,593	0,823±0,510	<0,0001*
42	814,55292	7,813	-0,741±0,906	0,741±0,268	<0,0001**
43	815,54834	7,522	0,556±0,475	-0,556±1,091	0,0055*
44	818,52917	7,645	-0,655±1,040	0,655±0,271	<0,0001**
45	818,59137	7,579	0,101±0,874	-0,101±1,143	0,9774**
46	833,64746	8,141	0,255±1,098	-0,255±0,862	0,1005**
47	843,57544	7,474	-0,878±0,505	0,878±0,392	<0,0001*
48	848,5354	7,654	0,831±0,473	-0,831±0,602	<0,0001*
49	852,55658	5,647	0,456±0,413	-0,456±1,211	0,0100**
50	854,55298	7,578	0,257±0,569	-0,257±1,274	0,5899**
51	856,5672	7,58	-0,299±1,197	0,299±0,681	0,1473*
52	862,54602	7,497	-0,949±0,272	0,949±0,223	<0,0001*
53	867,07965	7,481	0,286±0,545	-0,286±1,271	0,5137**
54	868,52759	7,404	-0,827±0,555	0,827±0,537	<0,0001*
55	874,5517	7,581	0,644±0,383	-0,644±1,020	0,0011*
56	876,55682	5,555	-0,892±0,465	0,892±0,370	<0,0001**
57	876,57294	7,59	0,552±0,457	-0,552±1,103	0,0002**
58	878,56982	5,604	-0,112±1,418	0,112±0,228	0,1432**
59	880,58649	5,616	0,121±0,765	-0,121±1,214	0,8874**
60	896,56024	7,365	-0,868±0,454	0,868±0,489	<0,0001*
61	906,8288	7,513	-0,203±0,888	0,203±1,101	0,3307*
62	922,5542	7,445	-0,879±0,433	0,879±0,468	<0,0001*
63	974,80841	7,513	0,723±0,626	-0,723±0,747	<0,0001*

Примечание. Здесь и в табл. 2: p-уровень значимости установлен с использованием: * — t-критерия Стьюдента; ** — теста Манна-Уитни.

Таблица 6. Перечень целевых метаболитов для колонки С18.

№ метаболита п/п	m/z	tR	Среднее нормализованное значение для групп		p
			1	2	
1	15,78	463,2304	-0,755±0,768	0,755±0,506	<0,0001**
2	18,65	108,0811	-0,798±0,485	0,798±0,684	<0,0001*
3	18,77	118,0872	-0,708±0,912	0,708±0,406	<0,0001**
4	17,67	124,0867	-0,257±1,062	0,257±0,905	0,3777*
5	17,93	124,1716	-0,692±0,639	0,692±0,799	0,0001*
6	18,43	125,0904	-0,803±0,665	0,803±0,493	<0,0001*
7	18,78	128,9628	-0,753±0,757	0,753±0,529	<0,0001*
8	19,05	131,9308	-0,711±0,884	0,711±0,453	<0,0001**
9	18,71	131,9625	-0,812±0,518	0,812±0,620	<0,0001*
10	17,75	138,102	-0,671±0,725	0,671±0,764	0,0002*
11	18,71	147,0929	-0,731±0,888	0,731±0,369	0,0001*
12	18,82	182,9617	-0,357±0,820	0,357±1,068	0,1005**
13	18,77	90,5081	-0,883±0,422	0,883 ±0,460	<0,0001*
14	18,7	674,4291	-0,004±1,151	0,004±0,876	0,7728**
15	18,72	686,6918	0,404±1,271	-0,404±0,344	0,5443**
16	18,68	711,7711	0,675 ±0,727	-0,675±0,753	0,0007**
17	18,72	716,5522	-0,705±0,826	0,705±0,570	<0,0001*
18	17,75	723,4638	0,341±1,234	-0,341±0,561	0,4356**
19	18,54	727,4619	-0,622±0,764	0,622±0,814	0,0008*
20	18,66	727,7125	0,159 ±1,178	-0,159±0,806	0,3863**
21	18,66	738,4745	0,488 ±0,581	-0,488±1,111	0,0156*
22	18,72	741,2301	0,636±0,899	-0,636±0,632	0,0262**
23	18,65	748,7361	0,290±1,240	-0,290 ±0,608	0,3122**
24	17,73	755,4784	0,519±0,581	-0,519±1,080	0,0376**
25	17,78	757,9766	-0,250±1,040	0,250±0,935	0,2288*
26	17,72	763,49	0,286±1,041	-0,286± 0,911	0,1409**
27	18,63	772,2356	0,530±0,749	-0,530±0,957	0,0193**
28	17,56	772,4897	0,551±1,029	-0,551±0,608	0,0056**
29	18,71	772,493	-0,010 ±1,187	0,010±0,825	0,5066**
30	18,7	773,4938	0,043±1,031	-0,043±1,012	0,8852**
31	18,71	778,0045	0,345 ±1,088	-0,345±0,804	0,0734**
32	17,93	778,9939	0,210±1,166	-0,210±0,797	0,4095**
33	17,69	782,5722	-0,790±0,725	0,790±0,452	<0,0001**
34	18,7	782,7464	0,418±0,530	-0,418±1,195	0,1600**
35	17,9	792,5078	0,375±0,663	-0,375±1,160	0,0646*
36	18,71	793,3143	0,068±1,002	-0,068±1,037	0,7475*
37	18,67	800,6866	-0,755±0,662	0,755±0,639	<0,0001*
38	17,91	802,0062	-0,777±0,573	0,777±0,667	<0,0001*
39	17,66	805,7479	0,457±0,630	-0,457±1,113	0,0209**
40	17,8	808,5083	0,026±1,215	-0,026±0,784	0,8874**
41	18,64	813,5074	-0,108±0,921	0,108±1,103	0,6085*
42	17,95	816,5212	0,325±0,392	-0,325±1,306	0,1224*
43	17,65	821,1963	0,532±0,836	-0,532±0,880	0,0145**
44	17,93	821,8597	0,692±0,936	-0,692±0,410	0,0003*
45	17,7	829,8372	0,669±0,958	-0,669±0,442	0,0043**
46	17,79	831,8625	0,566±1,008	-0,566±0,613	0,0031*
47	18,67	831,863	0,470±0,869	-0,470±0,923	0,0145**
48	17,76	848,8497	0,589±1,037	-0,589±0,507	0,0028*
49	17,89	849,0341	0,293±0,961	-0,293±0,990	0,1550*
50	18,7	855,7933	0,257±1,180	-0,257±0,744	0,2151*
51	18,71	857,2792	0,379±0,753	-0,379±1,100	0,2144**
52	18,62	862,7601	-0,858±0,582	0,858±0,384	<0,0001*
53	18,58	863,1935	0,401±1,020	-0,401±0,837	0,1938**
54	18,66	867,7538	-0,747±0,616	0,747±0,703	0,0002**
55	18,63	877,3093	0,546±0,906	-0,546±0,787	0,0086**
56	17,87	886,5561	0,374±1,072	-0,374±0,798	0,1135**
57	18,63	887,5426	-0,826±0,445	0,826±0,637	<0,0001**
58	18,64	896,2261	-0,008±1,236	0,008±0,751	0,7125**
59	17,83	897,5506	-0,119±0,990	0,119±1,039	0,5726*
60	18,65	915,5733	-0,012±1,010	0,012±1,034	0,6297**
61	18,71	919,8516	-0,814±0,762	0,814±0,259	<0,0001*
62	18,57	926,2381	0,168 ±0,949	-0,168±1,062	0,6033**
63	18,69	928,9295	0,581±1,026	-0,581±0,548	0,0086**
64	17,96	935,5851	0,221±0,951	-0,221±1,039	0,5137**
65	17,64	935,9096	0,547±0,637	-0,547±1,016	0,0121**
66	18,64	948,9295	-0,853±0,402	0,853±0,583	<0,0001**
67	17,99	950,2549	0,634±0,228	-0,634±1,078	0,0018*
68	18,71	977,2341	-0,792 ±0,719	0,792±0,453	<0,0001*
69	18,65	982,1268	0,572±0,711	-0,572±0,934	0,0027*
70	18,63	1007,1024	0,398±1,014	-0,398 ±0,846	0,0605**
71	17,79	1033,6344	-0,835±0,665	0,835±0,356	<0,0001*
72	18,57	1036,2665	-0,736±0,804	0,736±0,513	<0,0001**
73	17,79	1056,1636	0,249±1,217	-0,249±0,690	0,2306*

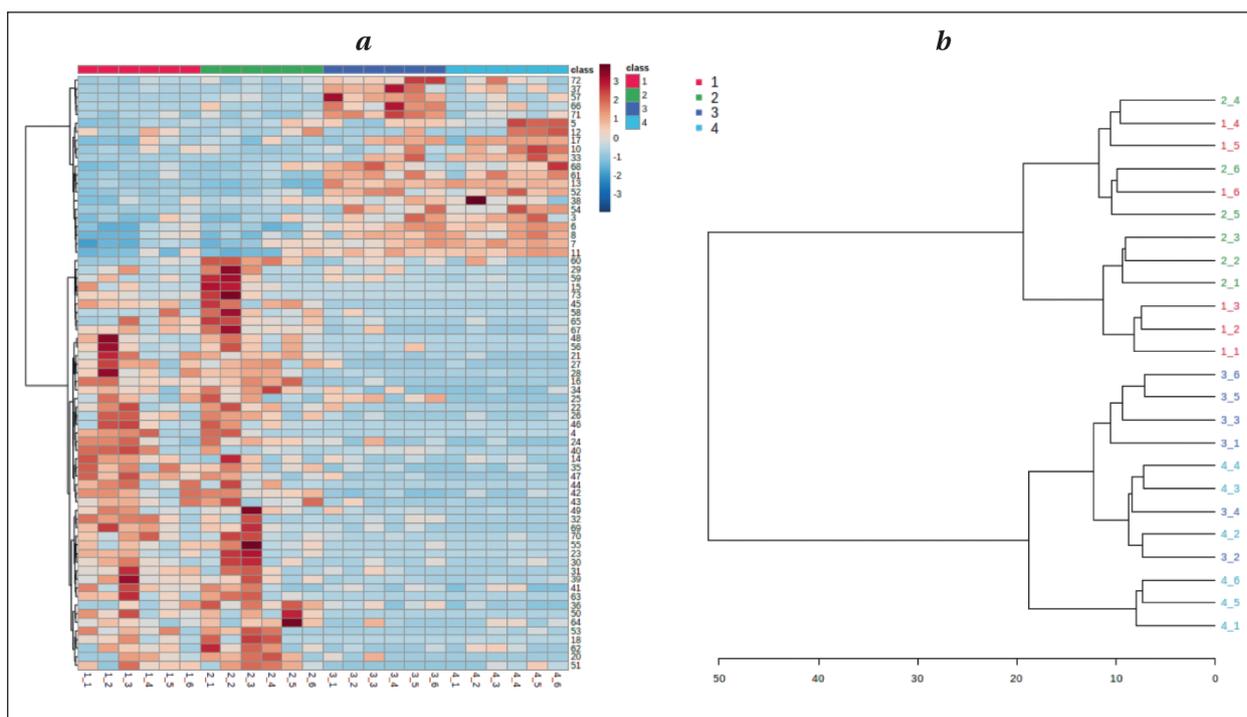


Рис. 4. Иерархический кластерный анализ образцов дневных и ночных заборов у исследуемых групп с колонки С18.

Примечание. *a* — тепловая карта метаболитов; исследуемые образцы плазмы по группам расположены в столбцах: красные соответствуют 1 группе дневному забору, зеленые — 1 группе ночному забору; синие — 2 группе дневному забору, голубые — 2 группе ночному забору. *a* — выявленные переменные-компоненты — в строках. Цвета варьируют от темно-синего до темно-красного, обозначая изменение содержания переменных: от очень низкого (темно-синий) до высокого (темно-красный). *b* — дендрограмма; 1 — группа 1 дневной забор; 2 — группа 1 ночной забор; 3 — группа 2 дневной забор; 4 — группа 2 ночной забор. Образцы формируют кластеры 1 и 2 группы, однако не показывают четкого распределения на дневные и ночные заборы.

сительным содержанием хроматографических сигналов, полученных на колонке HPLC, и дендрограмма демонстрируют результаты, схожие с полученными на колонке С18. Все образцы одной группы показали значимую корреляцию между собой при выделении 1 и 2 групп в отдельные кластеры (рис. 6, *a, b*). Однако при анализе данных образцов забора в разное время суток наблюдали их выделение в отдельные кластеры, что говорит о наличии статистически значимых различий в метаболических профилях дневных и ночных образцов (рис. 6, *c, d*).

Графики оценки PCA и PLS-DA показали четкую кластеризацию 1 и 2 группы в двух главных компонентах PC1 и PC2, на которые приходится 99 и 0,5% дисперсии образцов в случае анализа PCA (рис. 7, *a*) и 99% и 0,3% — в анализе PLS-DA (рис. 7, *b*). В соответствии с графиками нагрузки PLS-DA (рис. 7, *c*) выявили три основных метаболита (при $VIP > 0,5$), наиболее значимых для кластеризации групп в модели PLS-DA: 14 (m/z 162,1126, $R_t=10,28$, $p < 0,01$), 35 (m/z 780,5483, $R_t=7,65$, $p < 0,01$) и 41 (m/z 806,5649, $R_t=7,58$, $p < 0,01$), содержание которых было выше в группе 1. В случае же сравнения дневных и ночных заборов была выражена кластеризация образцов как межгрупповая, так и внутригрупповая, в зави-

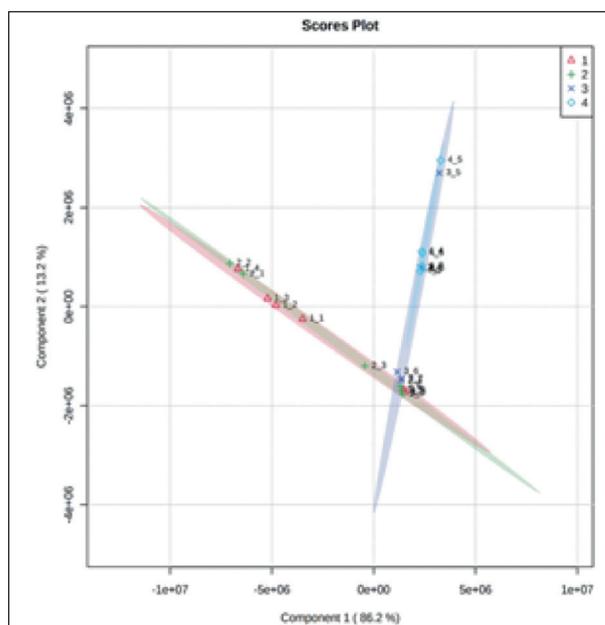


Рис. 5. PLS-DA анализ различий между образцами 1 и 2 группы дневного и ночного забора с колонки С18.

Примечание. Красное облако — группа 1 дневной забор; зеленое облако — группа 1 ночной забор; синее облако — группа 2 дневной забор; голубое облако — группа 2 ночной забор. Красное и зеленое, голубое и синее облака попарно накладываются друг на друга, что говорит о наличии межгрупповых и отсутствии внутригрупповых различий в зависимости от времени забора.

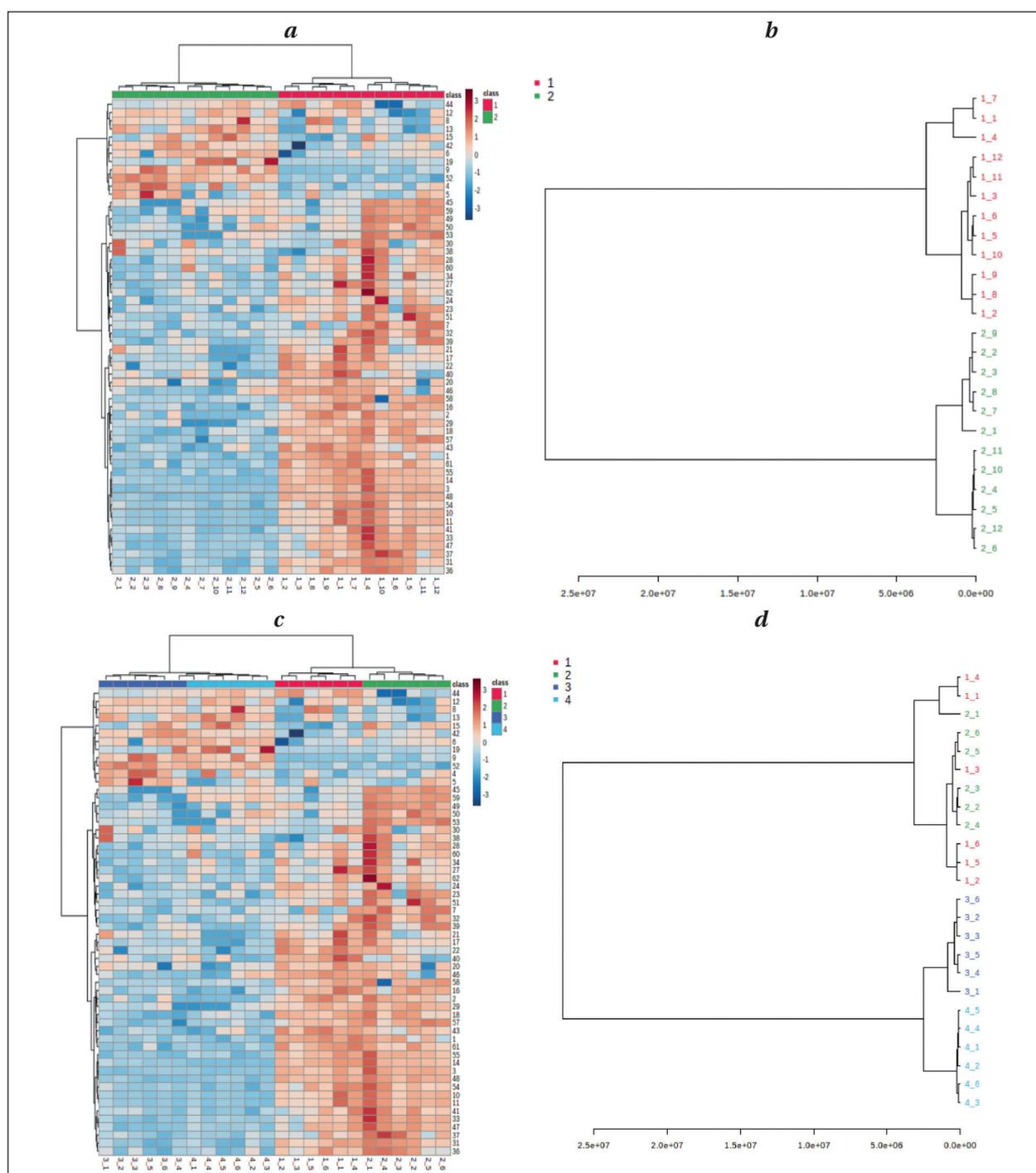


Рис. 6. Иерархический кластерный анализ образцов с колонки NPLC.

Примечание. *a* — тепловая карта метаболитов; сравнения 1 и 2 группы: исследуемые образцы плазмы по группам расположены в столбцах: красные соответствуют 1 группе, зеленые — 2 группе, а выявленные переменные-компоненты — в строках. Цвета варьируют от темно-синего до темно-красного, обозначая изменение содержания переменных: от очень низкого (холодного) до высокого (горячего). *b* — дендрограмма; образцы формируют четкие кластеры 1 (красные) и 2 (зеленые) групп. *c* — тепловая карта метаболитов; сравнения дневных и ночных заборов группы: красные соответствуют 1 группе дневному забору, зеленые — 1 группе ночному забору; синие — 2 группе дневному забору, голубые — 2 группе ночному забору. а выявленные переменные-компоненты — в строках. Цвета варьируют от темно-синего до темно-красного, обозначая изменение содержания переменных: от очень низкого (темно-синего) до высокого (темно-красного). *d* — дендрограмма; 1 — группа 1 дневной забор; 2 — группа 1 ночной забор; 3 — группа 2 дневной забор; 4 — группа 2 ночной забор. Образцы формируют кластеры 1 и 2 группы, дневных и ночных заборов.

симости от времени забора образцов, с незначительным перекрытием по второй компоненте (рис. 7, *d*). В модели PLS-DA получены результаты, аналогичные таковым в модели PCA (рис. 7, *e*). На

основании графиков нагрузки PLS-DA (рис. 7, *f*) выявили метаболиты (при VIP > 0,5), играющие ключевую роль в проявлении внутригрупповых различий, среди них: 14 (*m/z* 162,1126, *Rt*=10,28,

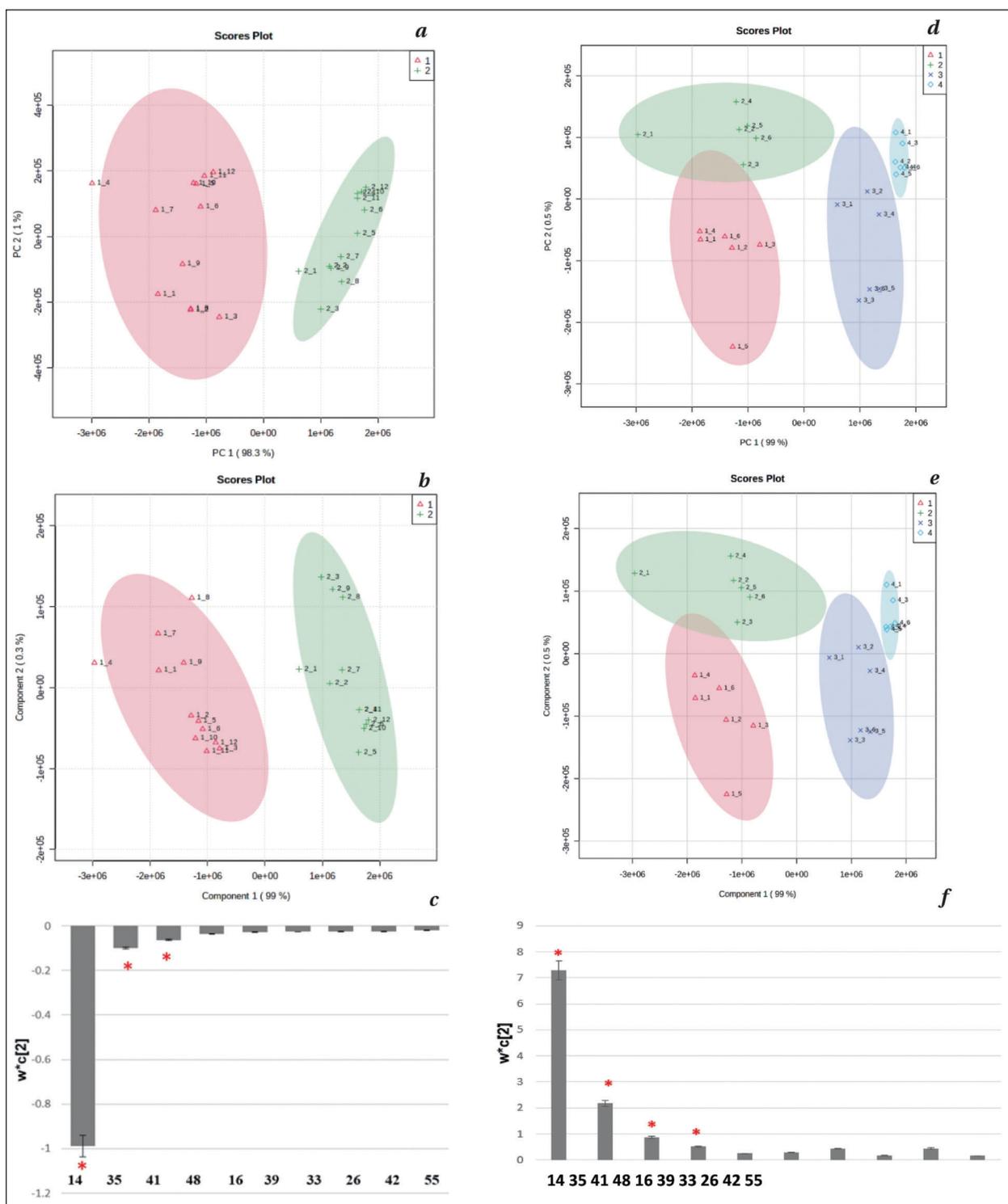


Рис. 7. Графики оценки PCA (a) и PLS-DA (b) 1 и 2 группы (HILIC).

Примечание. Красным облаком представлен кластер 1 группы, зеленым — кластер 2 группы. 1_1-1_12 — исследуемые образцы плазмы пациентов 1 группы; 2_1-2_12 — исследуемые образцы плазмы пациентов 2 группы. c — график загрузки модели PLS-DA, наблюдаемый PC 2 ($w^*c[2]$): каждый столбец представляет собой предполагаемый маркерный метаболит со стандартными ошибками, отображаемыми на панели ошибок. Графики оценки PCA (d) и PLS-DA (e) различий между образцами 1 и 2 группы дневного и ночного забора с колонки C18: красное облако — группа 1 дневной забор; зеленое облако — группа 1 ночной забор; синее облако — группа 2 дневной забор; голубое облако — группа 2 ночной забор. Формируется 4 отдельных облака, что говорит о наличии значимых различий как между группами, так и между заборами в разное время суток. f — график загрузки модели PLS-DA, наблюдаемый PC 2 ($w^*c[2]$): каждый столбец представляет собой предполагаемый маркерный метаболит со стандартными ошибками, отображаемыми на панели ошибок.

$p=0,0201$), 35 (m/z 780,5483, $Rt=7,65$, $p<0,01$), 41 (m/z 806,5649, $Rt=7,58$, $p<0,01$) и 48 (m/z 848,5354, $Rt=7,65$, $p<0,01$) — содержание которых было выше в образцах пациентов группы 2.

Обсуждение

В результате проведения нецелевого метаболического анализа пулированных образцов плазмы крови пациентов в ВС/САБ (группа 1) и в СМС (группа 2) установили ряд неидентифицированных соединений, количества которых в наибольшей степени подвергаются изменениям в зависимости от формы ХНС (ВС/САБ или СМС). Насколько нам известно, в данном исследовании впервые проводили сравнение «дневного» и «ночного» метаболома плазмы крови пациентов с ХНС. Полученные результаты показали наличие существенных различий между исследуемыми образцами, что дает основание предположить возможность выявления маркерных соединений для прогностических и диагностических целей в последующих работах. Однако также стало очевидно, что нецелевой метаболомный анализ является недостаточно информативным.

Первое исследование по изучению метаболома у пациентов с ХНС проведено Jie Yu и соавт. в 2021 г. [21]. Авторы использовали нецелевой и целевой метаболомный анализ плазмы у пациентов в ВС/САБ и СМС с целью выявления основных метаболомных нарушений у пациентов этих двух групп. Полученные данные показали, что метаболомный профиль пациентов с ХНС существенно отличается не только от профиля здоровых добровольцев, но и между пациентами в ВС/САБ и СМС, особенно значимые различия обнаружены при липидном анализе. Авторы выявили определенные липиды, уровень которых был значительно повышен у пациентов в ВС/САБ и СМС. Например, уровни фосфатидилхолина и арахидоновой кислоты имели статистически достоверную разницу между пациентами в ВС/САБ и СМС, что, по мнению авторов, могло служить маркером для дифференциальной диагностики этих вариантов нарушения сознания. Также у пациентов с ХНС по сравнению с контрольной группой здоровых добровольцев наблюдали существенные различия в метаболизме пурина. У пациентов в ВС/САБ и СМС было выявлено снижение уровня аденозина, аденозиндифосфата и аденозинмонофосфата, которые являются результатом распада аденозинтрифосфата. Результаты других исследований метаболома у пациентов в остром и подостром периодах ЧМТ также показали, что именно изучение липидомики является наиболее перспективным [22, 23].

В недавно опубликованной работе T. Dawiska и соавт., при изучении метаболомного профиля пациентов с диагнозом «смерть мозга» и в состоянии комы, выявлено, что пролин, ортофосфорная кислота, β -гидроксимасляная

кислота, галактоза, креатинин, валин, линолевая кислота, арахидоновая кислота, жирные кислоты со средней длиной цепи могут быть не только маркерами острого травматического поражения мозга, но и предикторами неблагоприятного исхода — смерти пациента [24, 25]. Исследований по изучению метаболома у пациентов с последствием гипоксического поражения головного мозга не много [26, 27]. По-видимому, потенциальными метаболомными маркерами при гипоксическом повреждении будут соединения, выявленные при ишемическом инсульте: лактат, пируват, гликолевая кислота, формиаты, глутамин, метанол, ацетат, цистеин, фолиевая кислота, тирозин, триптофан, валин, карнитин и др. [25, 28–31].

Таким образом, метаболомика является активно развивающимся направлением современной трансляционной медицины [32–37]. Метаболомные изменения могут быть незначительными и заключаться в нарушении количественных соотношений между различными химическими соединениями, однако возможно выявление совершенно новых химических соединений («биомаркеров болезни») и/или исчезновение определенных молекул, в норме присутствующих в гомеостазе [38–40]. Мы полагаем, что изучение метаболомных изменений у пациентов с ХНС является перспективным направлением и позволит создавать прогностические и дифференциальные модели для этой сложной категории пациентов. Следующим этапом нашей работы будет установление структуры выявленных соединений, изучение их прогностического значения и изменения в зависимости от циркадианного ритма.

Проведенное исследование имело несколько ограничений. Первое, пациенты получали различные фармакологические препараты, поэтому мы не могли исключить влияние некоторых из них на полученный метаболомный профиль. Второе, больным проводили различные варианты нутритивной поддержки с применением специализированных питательных смесей. Третьим ограничением исследования можно назвать небольшое число пациентов и различная этиология повреждения мозга (ЧМТ и гипоксия), а также отсутствие контрольной группы здоровых добровольцев (ввиду невозможности забора крови из яремной вены).

Заключение

Таким образом, нецелевой метаболомный анализ подтвердил гипотезу о вероятных значимых количественных и качественных различиях состава метаболитов в зависимости от формы ХНС и фазы циркадианного ритма. В ходе исследования установлен набор метаболитов —

потенциальных биомаркеров для дифференциальной диагностики состояний ВС/САБ и СМС — 4, 33, 6, 1 (в эксперименте на обращенно-фазовой колонке) и 14, 35, 41, 48 (в эксперименте на гидрофильной колонке), исходя из их

значительного вклада в проявление межгрупповых и внутригрупповых различий. Поэтому цель дальнейших исследований — проведение идентификации и характеристики обозначенных метаболитов.

Литература

1. Пирадов М.А., Супонова Н.А., Вознюк И.А., Кондратьев А.Н., Шёголев А.В., Белкин А.А., Зайцев О.С., Пряников И.В., Петрова М.В., Иванова Н.Е., Гнедовская Е.В., Рябинкина Ю.В., Сергеев Д.В., Язева Е.Г., Легостаева Л.А., Фуфаева Е.В., Петриков С.С. Российская рабочая группа по проблемам хронических нарушений сознания. Хронические нарушения сознания: терминология и диагностические критерии. Результаты первого заседания Российской рабочей группы по проблемам хронических нарушений сознания. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2020; 14 (1): 5–16. DOI: 10.25692/ACEN.2020.1.1.
2. Giacino J.T. The vegetative and minimally conscious states: consensus-based criteria for establishing diagnosis and prognosis. *NeuroRehabilitation*. 2004; 19 (4): 293–298. PMID: 15671583.
3. Giacino J.T., Katz D.I., Schiff N.D., Whyte J., Ashman E.J., Ashwal S., Barbano R., Hammond F.M., Laureys S., Ling G.S.F., Nakase-Richardson R., Seel R.T., Yablou S., Getchius T.S.D., Gronseth G.S., Armstrong M.J. Practice guideline update recommendations summary: Disorders of consciousness: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology; the American Congress of Rehabilitation Medicine; and the National Institute on Disability, Independent Living, and Rehabilitation Research. *Neurology*. 2018; 91 (10): 450–460. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005926. PMID: 30089618; PMCID: PMC6139814.
4. Kondziella D., Bender A., Diserens K., van Erp W., Estraneo A., Formisano R., Laureys S., Naccache L., Ozturk S., Rohaut B., Sitt J.D., Stender J., Tiainen M., Rossetti A.O., Gosseries O., Chatelle C. EAN panel on coma, disorders of consciousness. european academy of neurology guideline on the diagnosis of coma and other disorders of consciousness. *Eur J Neurol*. 2020 May; 27 (5): 741–756. DOI: 10.1111/ene.14151. PMID: 32090418.
5. Luppi A.L., Cain J., Spindler L.R.B., Górska U.J., Toker D., Hudson A.E., Brown E.N., Diring M.N., Stevens R.D., Massimini M., Monti M.M., Stamatakis E.A., Boly M. & Curing Coma Campaign and Its Contributing Collaborators. Mechanisms underlying disorders of consciousness: bridging gaps to move toward an integrated translational science. *Neurocrit Care*. 2021; 35 (Suppl 1): 37–54. DOI: 10.1007/s12028-021-01281-6. PMID: 34236622; PMCID: PMC8266690.
6. Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A., Benveniste H., Vates G.E., Deane R., Goldman S.A., Nagelhus E.A., Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine*. 2012; 4 (147): 147ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003748.
7. Кондратьев А.Н., Ценципер Л.М. Лимфатическая система мозга: строение и практическая значимость. *Анестезиология и реаниматология*. 2019; 6: 72–80. DOI: 10.17116/anaesthesiology.201906172.
8. Lundgaard I., Lu M.L., Yang E., Peng W., Mestre H., Hitomi E., Deane R., Nedergaard M. Glymphatic clearance controls state-dependent changes in brain lactate concentration. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017; 37 (6): 2112–2124. DOI: 10.1177/0271678X16661202. PMID: 27481936 PMCID: PMC5464705.
9. Lundgaard I., Li B., Xie L., Kang H., Sanggaard S., Haswell J.D.R., Sun W., Goldman S., Blekot S., Nielsen M., Takano T., Deane R., Nedergaard M. Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nature Communications*. 2015; 6: 7807. DOI: 10.1038/ncomms7807.
10. Hayton S., Maker G.L., Mullaney L., Trengove R.D. Experimental design and reporting standards for metabolomics studies of mammalian cell lines. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74 (24): 4421–4441. DOI: 10.1007/s00018-017-2582-1. PMID: 28669031.
11. Fukuda A.M., Badaut J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 279. DOI: 10.1186/1742-2094-9-279 PMCID: PMC3552817. PMID: 23270503.
12. Gonzalez-Riano, C., Saiz, J., Barbas, C., Bergareche A., Huerta J.M., Ardanz E., Konjevod M., Mondragon E., Erro M.E., Chirilaque M.D., Abilleira E., Goñi-Irigoyen F., Amiano P. Prognostic biomarkers of Parkinson's disease in the Spanish EPIC cohort: a multiplexed metabolomics approach. *npj Parkinsons Dis*. 2021; 7 (1): 73 (2021). DOI: 10.1038/s41531-021-00216-4. PMID: 34400650. PMCID: PMC8368017.
13. Qureshi M.I., Vorkas P.A., Coupland A.P., Jenkins I.H., Holmes E., Davies A.H. Lessons from metabolomics on the neurobiology of stroke. *Neuroscientist*. 2017; 23 (4): 374–382. DOI: 10.1177/1073858416673327. PMID: 28345376.
14. Zheng F., Zhou Y.T., Li P.F., Hu E., Li T., Tang T., Luo J.K., Zhang W., Ding C.S., Wang Y. Metabolomics analysis of hippocampus and cortex in a rat model of traumatic brain injury in the subacute phase. *Front Neurosci*. 2020; 14: 876. DOI: 10.3389/fnins.2020.00876. PMID: 33013291. PMCID: PMC7499474.
15. Szpigel A., Hainault I., Carlier A., Venteclef N., Batto A.F., Hajdich E., Bernard C., Ktorza A., Gautier J.F., Ferré P., Bourron O., Foufelle F. Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2018; 61 (2): 399–412. DOI: 10.1007/s00125-017-4462-5. PMID: 28988346.
16. Eberlin L.S., Gabay M., Fan A.C., Gouw A.M., Tibshirani R.J., Felsher D.W., Zare R.N. Alteration of the lipid profile in lymphomas induced by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111 (29): 10450–10455. DOI: 10.1073/pnas.1409778111. PMCID: PMC4115527. PMID: 24994904.
17. Chen M., Zhang J., Sampieri K., Clohessy J.G., Mendez L., Gonzalez-Billalabeta E., Liu X.S., Lee Y.R., Fung J., Katon J.M., Menon A.V., Webster K.A., Ng C., Palumbieri M.D., Diolombi M.S., Breitkopf S.B., Teruya-Feldstein J., Signoretti S., Bronson R.T., Asara J.M., Castillo-Martin M., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P. An aberrant SREBP-dependent lipogenic program promotes metastatic prostate cancer. *Nat Genet*. 2018; 50 (2): 206–218. DOI: 10.1038/s41588-017-0027-2. PMID: 29335545. PMCID: PMC6714980.
18. Xiong N., Gao X., Zhao H., Cai F., Zhang F.C., Yuan Y., Liu W., He F., Zacharias L.G., Lin H., Vu H.S., Xing C., Yao D.X., Chen F., Luo B., Sun W., DeBerardinis R.J., Xu H., Ge W.P. Using arterial-venous analysis to characterize cancer metabolic consumption in patients. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 3169. DOI: 10.1038/s41467-020-16810-8. PMID: 32576825. PMCID: PMC7311411.
19. Chong J., Wishart D.S., Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2019; 68 (1): e86. DOI: 10.1002/cpbi.86. PMID: 31756036.
20. Xia J., Wishart D.S. Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using metaboanalyst. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2011; 34 (1): 14.10.1–14.10.48. DOI: 10.1002/0471250953.bi1410s34.
21. Yu J., Meng F., He F., Chen F., Bao W., Yu Y., Zhou J., Gao J., Li J., Yao Y., Ge W.P., Luo B. Metabolic abnormalities in patients with chronic disorders of consciousness. *Aging and disease*. 2021; 12 (2): 386–403. DOI: 10.14336/AD.2020.0812.
22. Proitsi P., Kim M., Whitley L., Simmons A., Sattler M., Velayudhan L., Lupton M.K., Soininen H., Kloszewska L., Mecocci P., Tzolaki M., Velas B., Lovestone S., Powell J.F., Dobson R.J.B., Legido-Quigley C. Association of blood lipids with Alzheimer's disease: a comprehensive lipidomics analysis. *Alzheimers Dement*. 2017; 13 (2): 140–151. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.08.003. PMID: 27693183.
23. Chitturi J., Li Y., Santhakumar V., Kannurpatti S.S. Early behavioral and metabolomic change after mild to moderate traumatic brain injury in the developing brain. *Neurochem Int*. 2018; 120: 75–86. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.08.003. PMID: 30098378. PMCID: PMC6257993.
24. Zheng F., Xia Z.A., Zeng Y.F., Luo J.K., Sun P., Cui H.J., Wang Y., Tang T., Zhou Y.T. Plasma metabolomics profiles in rats with acute traumatic brain injury. *PLoS One*. 2017; 12 (8), e0182025. DOI: 10.1371/journal.pone.0182025. PMID: 28771528. PMCID: PMC5542452.
25. Dawiskiba, T., Wojtowicz, W., Qasem, B., Tukaszewski M., Mielko K.A., Dawiskiba A., Banasik M., Skóra J.P., Jancaak D., Młynarz P. Brain-dead and coma patients exhibit different serum metabolic profiles: preliminary investigation of a novel diagnostic approach in neurocritical care. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 15519. DOI: 10.1038/s41598-021-94625-3. PMID: 34330941. PMCID: PMC8324823.
26. Tsai I.L., Kuo T.C., Ho T.J., Harn Y.C., Wang S.Y., Fu W.M., Kuo C.H., Tseng Y.J. Metabolomic dynamic analysis of hypoxia in MDA-MB-231 and the comparison with inferred metabolites from transcriptomics data. *Cancers (Basel)*. 2013; 5 (2): 491–510. DOI: 10.3390/cancers5020491. PMCID: PMC3730319. PMID: 24216987.
27. Solberg R., Kuligowski J., Pankratov L., Escobar J., Quintás G., Lliso I., Sánchez-Illana A., Saugstad O.D., Vento M. Changes of the plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res*. 2016; 80 (2): 284–292. DOI: 10.1038/pr.2016.66. PMID: 27055187.
28. Baranovicova E., Grendar M., Kalenska D., Tomascova A., Cierny D., Lehotsky J. NMR metabolomic study of blood plasma in ischemic and ischemically preconditioned rats: an increased level of ketone bodies and decreased content of glycolytic products 24 h after global cerebral ischemia. *J. Physiol. Biochem*. 2018; 74 (3): 417–429. DOI: 10.1007/s13105-018-0632-2. PMID: 29752707.
29. Liu P., Li R., Antonov A.A., Wang L., Li W., Hua Y., Guo H., Wang L., Liu P., Chen L., Tian Y., Xu F., Zhang Z., Zhu Y., Huang Y. Discovery of metabolite biomarkers for acute ischemic stroke progression. *J. Proteome Res*. 2017; 16 (2): 773–779. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00779. PMID: 28092160.
30. Wang D., Kong J., Wu J., Wang X., Lai M. GC-MS-based metabolomics identifies an amino acid signature of acute ischemic stroke. *Neurosci Lett*. 2017; 642: 7–13. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.01.039. PMID: 28111353.
31. Wang Y., Wang Y.G., Ma T.F., Li M., Gu S.L. Dynamic metabolites profile of cerebral ischemia/reperfusion revealed by (1)H NMR-based

- metabolomics contributes to potential biomarkers. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014; 7 (7): 4067–4075. PMID: 25120785. PMCID: PMC4129020.
32. Fiehn O. Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002; 48 (1–2): 155–171. DOI: 10.1023/A:1013713905833. PMID: 11860207.
33. Wishart, D.S., Feunang Y.D., Marcu A., Guo A.C., Liang K., Vázquez-Fresno R., Sajed T., Johnson D., Li C., Karu N., Sayeeda Z., Lo E., Assempour N., Berjanskii M., Singhal S., Arndt D., Liang Y., Badran H., Grant J., Serra-Cayuela A., Liu Y., Mandal R., Neveu V., Pon A., Knox C., Wilson M., Manach C., Scalbert A. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46 (D1)D608–D617. DOI: 10.1093/nar/gkx1089. PMID: 29140435. PMCID: PMC5753273.
34. Дрягина Н.В., Кондратьева Е.А., Дубровский Я.А., Кондратьев А.Н. Метаболом головного мозга. *Российский неврологический журнал.* 2020; 25 (1): 4–12. DOI 10.30629/2658-7947-2020-25-1-4-12.
35. Лохов П.Г., Лисица А.В., Арчаков А.И. Метаболомный анализ крови: назначение, реализация, интерпретация данных. *Биомедицинская химия.* 2017; 63 (3): 232–240. DOI: 10.18097/РВМС20176303232. PubMed: 28781256.
36. Черневская Е.А., Белобородова Н.В. Микробиота кишечника при критических состояниях (обзор). *Общая реаниматология.* 2018; 14 (5): 96–119. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-5-96-119.
37. Nicholson J.K., Lindon J.C. & Holmes E. «Metabonomics»: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999; 29 (11): 1181–1189. DOI: 10.1080/004982599238047. PMID: 10598751.
38. Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J.M., Darzi A.W., Takats Z., Lindon J.C. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature.* 2012; 491 (7424): 384–392. DOI: 10.1038/nature11708. PMID: 23151581.
39. Fiehn O. Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002; 48 (1–2): 155–171. DOI: 10.1023/A:1013713905833. PMID: 11860207.
40. Trifonova O.P., Maslov D.L., Balashova E.E., Likhov P.G. Mass spectrometry-based metabolomics diagnostics — myth or reality? *Expert Review of Proteomics.* 2021; 18: 7–12. DOI: 10.1080/14789450.2021.1893695.

Поступила 13.11.2021
Принята 13.12.2021