

Сепсис-ассоциированные метаболиты и их биотрансформация кишечной микробиотой

Е. А. Черневская^{1*}, М. Л. Гецина¹, Р. А. Черпаков^{1,2},
Е. А. Сорокина¹, А. К. Шабанов^{1,2}, В. В. Мороз¹, Н. В. Белобородова¹

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы,
Россия, 129090, г. Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3, стр. 1

Для цитирования: Е. А. Черневская, М. Л. Гецина, Р. А. Черпаков, Е. А. Сорокина, А. К. Шабанов, В. В. Мороз, Н. В. Белобородова. Сепсис-ассоциированные метаболиты и их биотрансформация кишечной микробиотой. *Общая реаниматология*. 2023; 19 (6): 4–12. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2023-6-4-12> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Екатерина Александровна Черневская, chea05@inbox.ru;
echernevskaya@fnkcr.ru

Резюме

Высокое содержание сепсис-ассоциированных ароматических микробных метаболитов (АММ) служит прогностически неблагоприятным фактором, свидетельствует о прогрессировании полиорганной дисфункции и повышенном риске летального исхода у пациентов с сепсисом и септическим шоком. В данном исследовании проверили рабочую гипотезу, согласно которой причиной избытка сепсис-ассоциированных АММ в организме септического пациента является нарушение метаболизма (дисфункция) кишечной микробиоты.

Цель работы. Сравнить способность нормобиоты и патобиоты подвергать биотрансформации сепсис-ассоциированные метаболиты ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина на примере фенилмолочной кислоты (ФМК) и 4-гидроксифенилмолочной кислоты (4-ГФМК).

Материалы и методы. Образцы кишечного содержимого пациентов с септическим шоком ($n=10$, патобиота) и здоровых добровольцев ($n=9$, нормобиота) помещали в пробирки с универсальной тиогликолевой средой. В модельном эксперименте *in vitro* имитировали избыточное поступление сепсис-ассоциированных АММ в кишечник (например, из крови или очагов воспаления), добавляя ФМК или 4-ГФМК в клинически значимых концентрациях (по 25 мкМ) в пробирки с патобиотой и нормобиотой. После инкубации в термостате (37°C, 24 ч) сравнивали изменение концентраций АММ в образцах с патобиотой и нормобиотой. Для измерения концентрации метаболитов использовали ГХ-МС анализ.

Результаты. Спустя 24 ч после добавления 4-ГФМК или ФМК к нормобиоте регистрировали снижение концентрации этих метаболитов по сравнению с контролем. Добавление ФМК и 4-ГФМК к патобиоте, напротив, не приводило к снижению концентрации этих кислот спустя 24 ч. Концентрации ФМК ($p=0,002$) и 4-ГФМК ($p<0,001$) были статистически значимо выше в образцах патобиоты по сравнению с нормобиотой.

Заключение. Экспериментальным путем доказали, что при избыточной нагрузке сепсис-ассоциированными метаболитами (ФМК, 4-ГФМК) микробиота здоровых людей способна к их биотрансформации до конечных продуктов микробного метаболизма, в то время как у патобиоты септических пациентов эта функция утрачена. Тем самым подтверждается значимость дисфункции микробиоты в патогенезе сепсиса.

Ключевые слова: сепсис; патобиота; ароматические микробные метаболиты; фенилмолочная кислота; 4-гидроксифенилмолочная кислота; фенилпропионовая кислота; микробиота; биомаркеры

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Sepsis-Associated Metabolites and Their Biotransformation by Intestinal Microbiota

Ekaterina A. Chernevskaya^{1*}, Mariya L. Getsina¹, Rostislav A. Cherpakov^{1,2},
Ekaterina A. Sorokina¹, Aslan K. Shabanov^{1,2}, Victor V. Moroz¹, Natalia V. Beloborodova¹

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

² N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow City Health Department,
3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Bldg. 1, 129090 Moscow, Russia

Summary

High concentration of sepsis-associated aromatic microbial metabolites (AMM) stands as a prognostically unfavorable factor, indicating the progression of multiple organ dysfunction and an increased risk of death in patients with sepsis and septic shock. This study is based on a hypothesis that excess of sepsis-associated AMM in patients with sepsis is caused by metabolic alterations (dysfunction) in the intestinal microbiota.

The aim of this study was to compare the potential of normobiota and pathobiota to bio-transform sepsis-associated metabolites of aromatic amino acids tyrosine and phenylalanine, such as phenyllactic acid (PhLA) and 4-hydroxyphenyllactic acid (4-HPhLA).

Materials and methods. Samples of intestinal contents of patients with septic shock ($N=10$, pathobiota) and healthy volunteers ($N=9$, normobiota) were placed in test tubes with the omnipurpose thioglycol medium. The clinical model of excessive inflow of sepsis-associated AMM into the intestine (for example, from blood or sites of inflammation) was reproduced in the *in vitro* experiment by adding PhLA or 4-HPhLA in clinically significant concentrations (25 mM) into each test tube with pathobiota and normobiota. After incubation in a thermostat (37°, 24 hours), AMM concentrations were measured in the samples with pathobiota and normobiota using GC-MS analysis.

Results. Concentration of AMM decreased within 24 hours in the tubes with normobiota after PhLA or 4-HPhLA were added. In the tubes with pathobiota, no decrease in AMM concentrations was documented after loading with PhLA or 4-HPhLA. Concentrations of PhLA ($P=0.002$) and 4-HPhLA ($P<0.001$) were statistically significantly higher in pathobiota samples compared to normobiota.

Conclusion. The *in vitro* experiment demonstrates that after excessive load with sepsis-associated metabolites (PhLA, 4-HPhLA), the microbiota of healthy people is capable to bio-transform such metabolites to the end products of microbial metabolism, while pathobiota of septic patients exhibits altered biotransformational potential. This data demonstrate that microbiota dysfunction may contribute to the pathogenesis of sepsis.

Keywords: sepsis; pathobiota; aromatic microbial metabolites; phenyllactic acid; 4-hydroxyphenyllactic acid; phenylpropionic acid; microbiota; biomarkers

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

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Сепсис остается актуальной проблемой XXI в., продолжается интенсивный поиск новых возможностей патогенетической терапии для снижения частоты его развития и летальности [1–4]. Особый интерес представляют современные исследования кишечной микробиоты при критических состояниях, изучение ее роли в развитии септического процесса [5–7]. У пациентов с сепсисом наблюдаются выраженные нарушения таксономического состава кишечной микробиоты, увеличение проницаемости кишечной стенки, изменение иммунореактивности, развитие антибиотикорезистентности микроорганизмов, в совокупности приводящие к метаболическим поломкам [8, 9]. Например, установлен факт значительного накопления в сыворотке крови метаболитов ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина у пациентов с сепсисом разного генеза: при тяжелых пневмониях, заболеваниях органов брюшной полости, послеоперационных осложнениях в кардиохирургии и др. [6, 10]. Доказано, что наиболее часто высокие уровни таких ароматических микробных метаболитов (АММ), как фенилмолочная кислота (ФМК), 4-гидроксифенилмолочная кислота (4-ГФМК) и 4-гидроксифенилуксусная кислота (4-ГФУК) в сыворотке крови, коррелируют с тяжестью состояния и летальностью, что послужило основанием для введения термина «сепсис-ассоциированные метаболиты» для интерпретации этих соединений [11]. В проведенных ранее исследованиях показано, что ряд ароматических метаболитов имеют преимущественно

микробное происхождение [12–14]. Биотрансформация ароматических аминокислот происходит в кишечнике, в норме сотни видов бактерий здоровой микробиоты питаются промежуточными продуктами метаболизма, в результате в здоровом организме в системный кровоток поступают небольшие количества конечных продуктов микробного метаболизма, в основном, фенилпропионовая кислота (ФПК) и фенилуксусная кислота (ФУК) [15]. При сепсисе микробный метаболизм ароматических аминокислот реализуется не только в желудочно-кишечном тракте, но и в гнойно-воспалительных очагах, поэтому промежуточные продукты метаболизма в избытке поступают в кровоток, что приводит к повышению уровня циркулирующих сепсис-ассоциированных метаболитов, а именно, ФМК, 4-ГФМК, 4-ГФУК.

При метаболическом мониторинге пациентов с сепсисом показано, что высокий уровень ФМК и 4-ГФМК даже после хирургической санации гнойно-воспалительных очагов нередко не снижается, а даже нарастает, что в таких случаях сопровождается прогрессированием полиорганной недостаточности и имеет неблагоприятный прогноз для пациента. Нами высказано предположение, что причиной может служить метаболическая дисфункция микробиоты. В условиях, когда у септического пациента пул нормальных анаэробных бактерий истощен, не происходит полноценная биотрансформация ароматических аминокислот и их промежуточных метаболитов до конечных продуктов, что

способствует накоплению в организме сепсис-ассоциированных микробных метаболитов.

Представления о том, что одной из важных функций здоровой микробиоты является утилизация потенциально токсичных продуктов путем их биodeградации до конечных продуктов метаболизма в условиях функционирования нормального микробного сообщества в кишечнике здорового человека (нормобиота), положили в основу данного эксперимента. Согласно рабочей гипотезе исследования, микробиота септического пациента не способна выполнять функцию очищения организма от избытка сепсис-ассоциированных метаболитов, которые поступают из крови и/или образуются в просвете кишечника, и не подвергаются биотрансформации. Проверку гипотезы реализовали в эксперименте на модели *in vitro* путем культивирования кишечной микробиоты, с экзогенным внесением сепсис-ассоциированных метаболитов, имитируя их избыточное поступление в кишечник из крови или из очагов воспаления, и с последующим измерением продуктов метаболизма.

Цель работы — сравнить способность нормобиоты и патобиоты подвергать биотрансформации сепсис-ассоциированные метаболиты ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина на примере ФМК и 4-ГФМК.

Материал и методы

Исследуемый биоматериал для модельного эксперимента:

- сыворотка крови здоровых доноров ($n=48$) и пациентов с сепсисом ($n=10$);
- кишечное содержимое здоровых добровольцев ($n=9$) и пациентов с септическим шоком ($n=10$).

Характеристика пациентов с сепсисом. В исследование включили 10 пациентов (9 мужчин и 1 женщину), поступивших в НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского в декабре 2022 г., согласно следующим критериям.

Критерии включения:

- возраст старше 18 и менее 80 лет;
- сепсис;
- септический шок.

Критерий исключения:

- терминальное состояние с ожидаемой продолжительностью жизни менее 24 ч.

Пациенты поступили с диагнозами сочетанная травма ($n=6$), закрытая ЧМТ ($n=1$), нетравматическое субарахноидально-паренхиматозное внутрижелудочковое кровоизлияние ($n=1$), острая абдоминальная патология ($n=2$). Возраст пациентов составил 43 (34–60) года. У включенных в исследование пациентов преобладал пульмональный сепсис 60%, на долю абдоминального и смешанного (церебрально/пульмонального) приходилось по 20%. Все пациенты получали ИВЛ, комплексную интенсивную терапию, включая

комбинации антибиотиков, инотропную поддержку и др. Для определения биомаркеров сепсиса у всех пациентов брали образцы сыворотки крови. Для проведения эксперимента *in vitro* у всех пациентов однократно брали образцы кишечного содержимого.

Характеристика здоровых доноров. Образцы сыворотки крови здоровых доноров ($n=48$) получили из НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко. Возраст доноров составил 39 (33–45) лет, из них — 35 мужчин и 13 женщин. У здоровых доноров отсутствовали клинические признаки острого воспаления и хронические заболевания печени и почек.

Определение биомаркеров воспаления и сепсиса в сыворотке крови. Количественное определение биомаркеров воспаления и сепсиса в сыворотке крови, таких как белок S100, ИЛ-6, NT-proBNP, прокальцитонин, проводили в сыворотке крови на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas e411 (Roche, Базель, Швейцария). Для работы использовали наборы реагентов фирмы Roche Diagnostics: Elecsys S100/NT-proBNP/IL-6/PCT.

Состав микробиоты в образцах сыворотки крови оценивали с помощью тест-системы «Колонофлор». Качественный и количественный состав облигатных и условно-патогенных микроорганизмов микробиоты оценивали методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью тест-системы «Колонофлор-16 (биоценоз)» (АльфаЛаб, Россия). «Колонофлор 16 (биоценоз)» позволил выявить 23 показателя, включая 21 группу/видов микроорганизмов, общее бактериальное число.

Описание модели эксперимента *in vitro*. Образцы здоровой микробиоты кишечника или микробиоты пациентов с сепсисом помещали в питательную среду с добавлением одного из сепсис-ассоциированных метаболитов ФМК или 4-ГФМК. После 24 ч культивирования в термостате осуществляли оценку и сравнение качественно-количественного состава АММ.

Культивирование образцов кишечного содержимого осуществляли в тиогликолевой среде (ТГ среда) с добавлением ФМК или 4-ГФМК. Для создания *in vitro* условий роста факультативно-анаэробных и анаэробных бактерий использовали универсальную ТГ среду. Схему эксперимента для каждого образца кишечного содержимого показали на рис. 1. Изучение состава АММ проводили у здоровых добровольцев ($n=9$) и пациентов с сепсисом ($n=10$) до и после инкубации кишечного содержимого в ТГ среде с добавлением сепсис-ассоциированных микробных метаболитов в клинически значимых концентрациях (25 мкМ ФМК или 4-ГФМК) в течение 24 ч при 37°C. После инкубации пробирки с содержимым перемешивали, центрифугировали 1000 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость замораживали при –20°C. Измерение концентрации метаболитов в кишечном содержимом здоровых добровольцев и пациентов с сепсисом до и после инкубации в ТГ среде проводили методом ГХ-МС анализа.

ГХ-МС анализ метаболитов в кишечном содержимом и в сыворотке крови. Анализ метаболитов проводили на ГХ-МС оборудовании, включающем газовый хроматограф GC-2010 Plus и масс-спектрометр GCMS-QP2020 (Shimadzu, Япония). Исследуемый образец подвергали двукратной экстракции диэтиловым эфиром с последующим упариванием досуха и дериватизацией сухого остатка N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом, полученный раствор разбавляли н-гексаном, и 2 мкл конечного раствора вводили в инжектор газового хроматографа. Для количественного анализа данных использовали относительные сигналы, рассчитанные как отношение площади пиков ТМС производных целевых соединений, к площади пика суррогатного внутреннего стандарта. Для представления результатов использовали концентрации, вычисленные по градуировочным графикам. Относительное содержание кислот в % рассчитали с помощью формулы:

$$\text{Отн. сод., \%} = 100 \times \left(\frac{\text{отн. сигн. опр. к-ты}}{\sum \text{отн. сигн. всех опр. к-т}} \right)$$

Статистический анализ. Полученные данные обработали статистически с применением программы Microsoft Excel 2010 и IBM SPSS Statistics 27. Описательную статистику представили в виде медианы (*Me*) и интерквартильного размаха (ИР, 25–75%). Для сравнительной межгрупповой оценки связанных выборок использовали критерий *T* Вилкоксона. Для сравнительной межгрупповой оценки независимых выборок — критерий Манна–Уитни. Результаты статистического анализа считали значимыми при двустороннем $p < 0,05$, где p — вероятность ошибки первого рода при проверке нулевой гипотезы.

Результаты

Биомаркеры и метаболиты. Провели оценку тяжести состояния пациентов на момент включения в исследование по ряду шкал. Значения со-

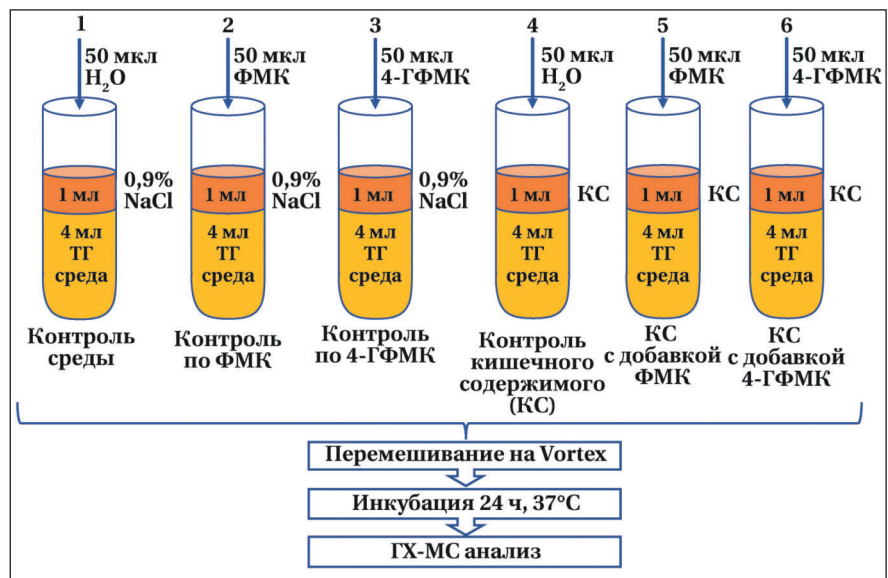


Рис. 1. Схема эксперимента.

Примечание. Ряд из 6-ти пробирок формировали для каждого образца кишечного содержимого (КС), всего было 19 рядов. В каждом ряду четыре контрольные пробирки 1) для учета фона ТГ среды без добавок; 2) и 3) для учета концентрации добавки сепсис-ассоциированных метаболитов ФМК или 4-ГФМК после инкубации без КС; 4) для учета фоновых значений метаболитов в КС без добавки; 5) и 6) две пробирки с КС и добавкой соответствующих сепсис-ассоциированных метаболитов ФМК или 4-ГФМК. После инкубации продукты метаболизма микробиоты в ТГ среде измеряли методом ГХ-МС анализа.

ставили по шкале APACHE II 30 (23–38), SOFA — 11 (9–15) баллов. Выявили многократное повышение маркеров воспаления и активности бактериального процесса, таких как ИЛ-6 и прокальцитонин, маркера сердечной недостаточности NT-proBNP и маркера повреждения головного мозга S100 (табл. 1), а также АММ (табл. 2).

Сумма концентраций трех сепсис-ассоциированных метаболитов, а именно: ФМК, 4-ГФМК и 4-ГФМК, у пациентов с сепсисом была повышена более чем в 6 раз по сравнению со здоровыми донорами. Микробные метаболиты, такие как фенилпропионовая кислота, 4-гидрокси-фенилпропионовая, гидроксибензойная кислоты, выше нижнего предела количественного определения не обнаружили. Лишь в одном случае концентрация в сыворотке крови 4-гидрокси-фенилпропионовой кислоты составила 15,8 мкМ.

Профиль ароматических микробных метаболитов кишечного содержимого (рис. 2) отличался у здоровых добровольцев ($n=9$) и пациентов с сепсисом ($n=10$).

Основными метаболитами у здоровых добровольцев были ФПК и ФУК, их содержа-

Таблица 1. Биомаркеры сыворотки крови у пациентов с сепсисом, *Me* (ИР) ($n=10$).

Биомаркеры	Референсные значения	Результаты измерений
ИЛ-6, пкг/л	<7	235 (126–3320)
Прокальцитонин, нг/мл	<0,25	24 (10–49)
NT-proBNP, пг/мл	<125	1404 (728–31368)
S100, пг/мл	<0,1	0,47 (0,26–1,42)
Отношение нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ)	<4	16 (7–47)

Таблица 2. Ароматические микробные метаболиты в сыворотке крови здоровых доноров и пациентов с сепсисом, Me (ИР).

Метаболиты, мкМ/л	Значение концентрации в сыворотке крови, мкМ		p
	Доноры, n=48	Пациенты с сепсисом, n=10	
ФПК	<0,5 (<0,5–0,5)	<0,5	—
ФМК	<0,5	2,0 (1,0–2,3)	—
4-ГФПК	<0,5	<0,5	—
4-ГФУК	<0,5	2,1 (1,7–7,0)	—
4-ГФМК	1,3 (1,0–1,6)	4,6 (2,5–12,3)	<0,001
*Σ (ФМК, 4-ГФУК, 4-ГФМК)	1,9 (1,4–2,2)	12,9 (5,2–27,8)	<0,001

Примечание. *Σ (ФМК, 4-ГФУК, 4-ГФМК) — сумма трех концентраций клинически значимых сепсис-ассоциированных кислот, мкМ.

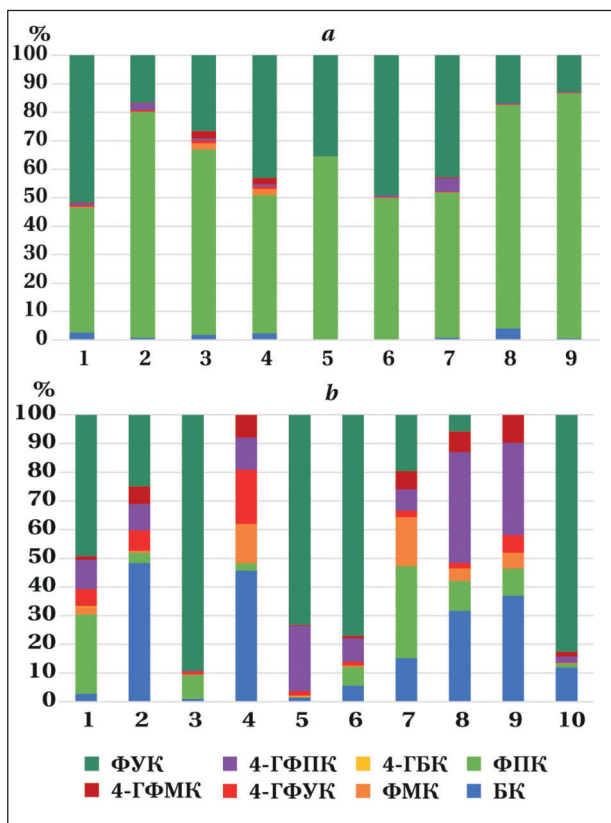


Рис. 2. Состав ароматических микробных метаболитов в кишечном содержимом по относительному содержанию кислот.

Примечание. а — у здоровых добровольцев (n=9); б — у пациентов с сепсисом (n=10).

ние в процентном отношении составляло 16–86% от общего количества определяемых метаболитов. Доля сепсис-ассоциированных ароматических метаболитов в норме не превышала 5%. Доля сепсис-ассоциированных фенольных метаболитов у пациентов с сепсисом была значительно выше по сравнению со здоровыми и составляла 40%.

Таксономический состав кишечного содержимого количественно оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. У пациентов с сепсисом выявили количественное увеличение так называемых «провоспалительных» микроорганизмов, таких как *Proteus vulgaris/mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*; наблю-

далось многократное превышение коэффициента анаэробного дисбаланса (отношение *Bacteroides fragilis* group/*Faecalibacterium prausnitzii*), который составил 3750 (400–13750) при референсных значениях менее 100. Количество лактобацилл и бифидобактерий было также снижено относительно референсных значений более чем у 60% пациентов.

Изменение концентраций ароматических микробных метаболитов (АММ) в кишечном содержимом здоровых добровольцев и пациентов с сепсисом после инкубации. Медианы концентраций ароматических микробных метаболитов после инкубации показали на рис. 3. Контрольные измерения концентрации ФМК и 4-ГФМК после инкубирования в ТГ среде проводили без добавления кишечного содержимого. При добавлении 25 мкМ 4-ГФМК (рис. 3, б) или ФМК (рис. 3, в) к нормобиоте наблюдали снижение данных метаболитов спустя 24 ч, по сравнению с контролем (пробирка 3 и 2, соответственно) и повышение ФПК (0,028, *m*-Вилкоксона). Добавление ФМК и 4-ГФМК к патобиоте (рис. 3, е, ф) не приводило к снижению содержания этих кислот спустя 24 ч, ФПК в значениях выше нижнего предела количественного определения не определяли, за исключением двух случаев, когда концентрации ФПК составили 8 и 15 мкМ. Концентрации ФМК ($p=0,002$) и 4-ГФМК ($p<0,001$) были значимо выше, а ФПК ($p=0,003$) — ниже в образцах патобиоты по сравнению с нормобиотой.

Обсуждение

В эксперименте *in vitro* наблюдали снижение концентрации сепсис-ассоциированных ароматических микробных метаболитов под влиянием «здоровой» микробиоты кишечника и их накопление в среде с патобиотой пациентов с сепсисом, что свидетельствует в пользу гипотезы о важной роли микробиоты кишечника в биотрансформации микробных метаболитов, поддержании гомеостаза в норме, а также утрате этой функции при сепсисе.

Наряду с многократным превышением референсных значений маркеров воспаления и бактериальной инфекции (ИЛ-6, прокальцитонин), сердечной недостаточности (NT-proBNP)

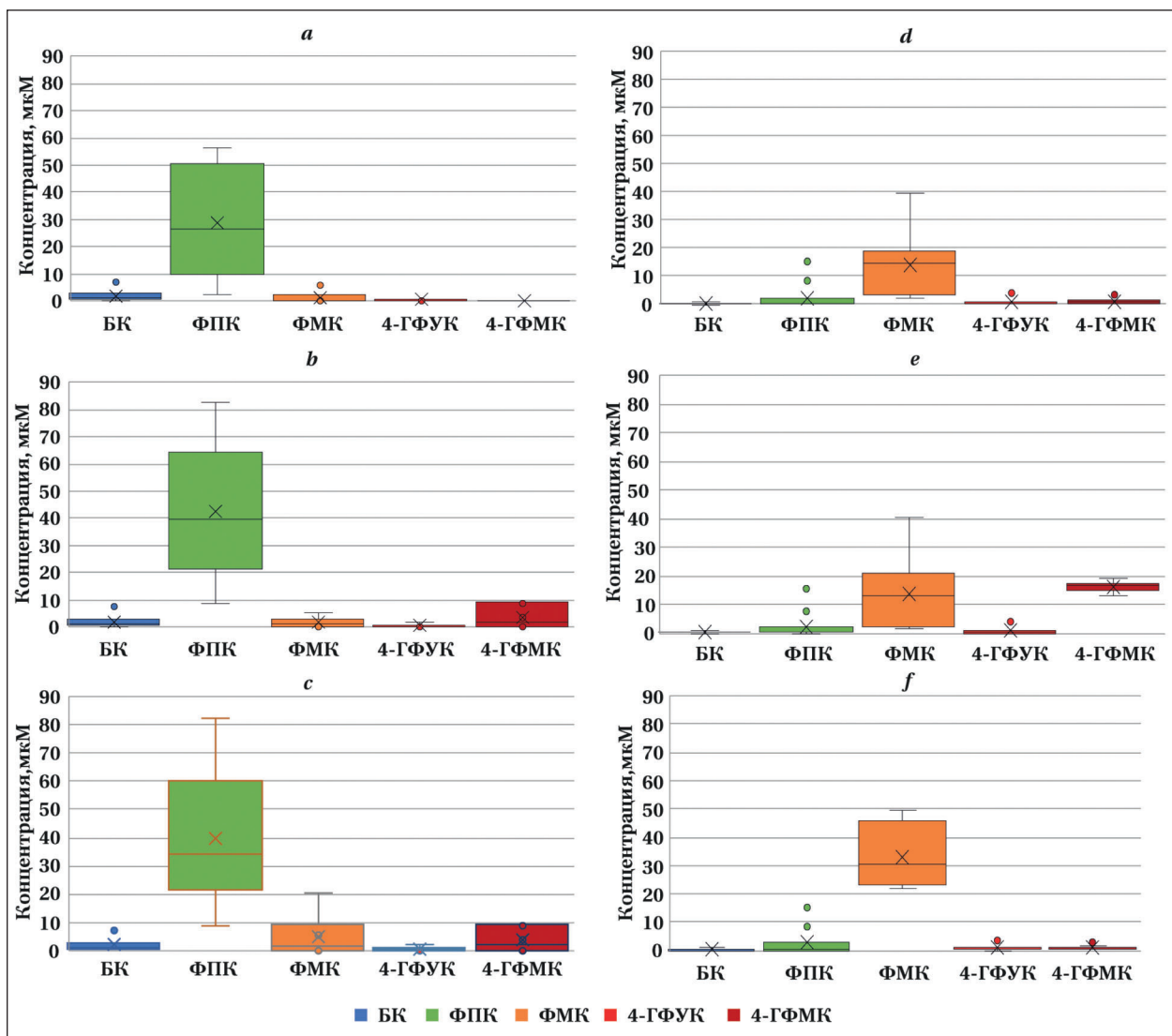


Рис. 3. Концентрация ароматических микробных метаболитов.

Примечание. Медиана (ИР, 25–75%) в «ТГ среде + нормобиота» и «ТГ среде + патобиота» после инкубации 24 ч; *a* и *d*: нормобиота и патобиота после инкубации без добавок сепсис-ассоциированных кислот; *b* и *f*: нормобиота и патобиота с добавкой 25 мкМ 4-ГФМК; *c* и *e*: нормобиота и патобиота с добавкой 25 мкМ ФМК.

и повреждения нервной системы (белок S100), отражающих тяжесть состояния пациентов и риск развития осложнений [16, 17], выявили практически семикратное превышение суммы концентраций трех сепсис-ассоциированных метаболитов в сыворотке крови, а именно ФМК, 4-ГФУК и 4-ГФМК. Ранее показано, что ФМК и 4-ГФМК являются метаболитами как аэробных, так и анаэробных бактерий, в том числе, наиболее частых возбудителей — грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и др.) и грамположительных (например, *Staphylococcus aureus*) [13]. Экспериментальные и клинические исследования подтверждают биологическую активность данных метаболитов, в частности угнетение функции митохондрий, нейтрофилов и тромбоцитов, ингибирующий эффект на активность $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATF}$ -азы [11, 18,

19]. ФМК подавляла клеточную пролиферацию в культуре тканей печени поджелудочной железы и почек крыс и пролиферацию бактериальных культур [20]. Повышенный уровень 4-ГФУК ассоциировался с изменением бактериального метаболизма [21, 22], нарушением пути синтеза катехоламинов и развитием гемодинамических нарушений при сепсисе [10]. Концентрация другого метаболита, фенилпропионовой кислоты, одного из конечных продуктов микробного метаболизма, была значительно снижена или вовсе не обнаруживалась в крови пациентов с сепсисом по сравнению со здоровыми людьми. Данное наблюдение согласуется с тем, что в эксперименте только бактерии *Clostridium sporogenes* были способны к продукции ФПК [11, 23]. Также описана положительная корреляция одного из предшественников фенилпропионовой кислоты, 4-ГФПК, с

грамположительными бактериями (включая семейства *Christensenellaceae*, *Oscillospiraceae* и род *Ruminococcus*), которые относятся к представителям здорового микробиома [6]. Профиль ароматических микробных метаболитов в кишечнике не был идентичен профилю в сыворотке крови, но сохранялась тенденция: сепсис-ассоциированные метаболиты в норме не превышали 5%, в то время как их доля у пациентов с септическим шоком многократно увеличивалась и достигала 40%.

В основу данного исследования легло предположение, что нарушение состава микробиоты при сепсисе приводит к дисфункции микробиоты, а именно потере способности утилизировать избыток ароматических метаболитов. Действительно, культивирование клинически значимых концентраций 4-ГФМК или ФМК с нормобиотой сопровождалось снижением уровня этих метаболитов и повышением уровня ФПК по сравнению с исходным контролем, в то время как патобиота не обладала способностью к биотрансформации сепсис-ассоциированных метаболитов. Ранее *in vitro* достаточно подробно изучена биохимия катаболизма ароматических кислот кишечной палочкой [24, 25]. Зафиксировано, что *Escherichia coli* на питательных средах, где единственным источником углерода являются ароматические кислоты, в аэробных условиях сохраняет способность к росту благодаря ферментативному расщеплению фенольных кислот до простых соединений. Максимальная продукция ФМК и 4-ГФМК *in vitro* обнаружена у энтеробактерий и *Staphylococcus aureus*. Например, в суточной питательной среде при культивировании клебсиеллы происходило 60-кратное накопление 4-ГФМК и 100-кратное накопление ФМК по сравнению с контролем [12]. По-видимому, биотрансформация таких метаболитов как ФМК и 4-ГФМК, реализуется микробиотой здорового человека в условиях существующего биоразнообразия микроорганизмов, когда избыток метаболитов, образующихся в результате жизнедеятельности одних видов бактерий может метаболизироваться другими видами бактерий по принципу «конвейера», в результате образуя конечные продукты микробного метаболизма, например, такие как ФПК [11, 26].

Неспособность к дальнейшему метаболизму является следствием изменения состава и форм микроорганизмов в неблагоприятных условиях и массивной антибиотикотерапии. Количественная оценка таксономического состава кишечного содержимого пациентов методом ПЦР выявила анаэробный дисбаланс, увеличение «провоспалительных» и снижение «противовоспалительных» микроорганизмов,

что также отражено во многих работах, характеризующих состав микробиоты кишечника пациентов при сепсисе [6, 27, 28]. Известно, что состав микробиоты меняется в течение нескольких часов от развития критического состояния [29, 30]. Происходит превращение микробиома в патобиом с преобладанием крайне однообразных сообществ полирезистентных микроорганизмов [31–34]. Вклад в развитие метаболической дисфункции может вносить и распространение таких форм бактерий, как персистеры, временно неспособных к метаболической активности, что затрудняет их выявление традиционными микробиологическими методами [35, 36]. В условиях дефицита питательных веществ возможен практически полный переход всей популяции в состояние персистенции [37, 38], однако данный феномен не рассматривали.

В эксперименте показали, что избыток сепсис-ассоциированных кислот в кишечном содержимом здорового человека частично элиминируются нормобиотой, что приводит к снижению содержания (биотрансформации) этих кислот. Полученные результаты согласуются с концепцией МПР (потенциала метаболического взаимодействия), основанной на геномных метаболических реконструкциях, где показано, что микробные сообщества содержат метаболически взаимозависимые группы. Сотрудничающие группы могут эффективно использовать ограниченные ресурсы посредством обмена метаболитами, обеспечивая преимущество в выживании и позволяя сосуществовать в различных нишах по сравнению с ограниченными микробными сообществами [39]. Масштабное использование антибиотиков нарушает существующие метаболические связи и приводит к дисфункции микробного сообщества как единого органа. Сохранение биоразнообразия микробиоты является важной задачей, поскольку именно многообразие видов обеспечивает непрерывный процесс биотрансформации до конечных «полезных и безопасных» для макроорганизма микробных метаболитов.

Заключение

Накопление в крови сепсис-ассоциированных метаболитов происходит не только из-за их избыточного поступления из мест размножения бактерий (гноино-воспалительных очагов инфекции), но в значительной степени из-за неспособности микробиоты кишечника к метаболической биотрансформации этих соединений. Сравнение метаболомных профилей нормобиоты и патобиоты в эксперименте *in vitro* показало, что при нагрузке сепсис-ассо-

цированными метаболитами ФМК и 4-ГФМК микробиота здорового человека подвергает их биотрансформации до конечных продуктов микробного метаболизма, а патобиота септического пациента не способна выполнять эту функцию. Таким образом, наряду с другими признаками декомпенсации витальных функций, таких как дыхание, кровообращение, функционирование центральной нервной си-

стемы и др., при сепсисе имеет место нарушение метаболизма микробиоты, что вносит свой вклад в прогрессирование септического процесса и повышает риск летального исхода. Целенаправленное воздействие на микробиоту кишечника с целью устранения метаболической дисфункции может стать перспективным направлением в предупреждении сепсиса и лечении пациентов.

Литература

1. Evans L., Rhodes A., Alhazzani W., Antonelli M., Coopersmith C.M., French C., Machado F.R., et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 2021; 47 (11): 1181–1247. DOI: 10.1007/s00134-021-06506-y. PMID: 34599691.
2. Zhang Y.-Y., Ning B.-T. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6 (1): 407. DOI: 10.1038/s41392-021-00816-9. PMID: 34824200.
3. Быкова К.М., Саввина И.А., Бодарева Н.В., Забродская Ю.М. Патофизиологические аспекты и комплексная диагностика сепсис-ассоциированной энцефалопатии. Перспективы этиопатогенетической терапии. *Анестезиология и реаниматология.* 2022; (4): 92–98. [Bykova K.M., Savvina I.A., Bodareva N.V., Zabrodskaia Yu.M. Pathophysiological aspects and complex diagnosis of sepsis-associated encephalopathy. Prospects for etiopathogenetic therapy. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology/ Anesteziologiya i Reanimatologiya.* 2022; (4): 92–98. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/anaesthesiology202204192.
4. Ковзель В.А., Давыдова Л.А., Карзин А.В., Царенко С.В., Батурова В.Ю., Полупан А.А., Гутников А.И. Методы экстракорпоральной гемокоррекции при сепсисе (обзор). *Общая реаниматология.* 2023; 19 (2): 68–82. [Kovzel V.A., Davydova L.A., Karzin A.V., Tsarenko S.V., Baturova V.Yu., Polupan A.A., Gutnikov A.I. Methods of extracorporeal hemocorrection in sepsis (Review). *General Reanimatology/ Obshchaya Reanimatologiya.* 2023; 19 (2): 68–82. (In Russ.)]. DOI: 10.15360/1813-9779-2023-2-2282.
5. Adelman M.W., Woodworth M.H., Langelier C., Busch L.M., Kempker J.A., Kraft C.S., Martin G.S. The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 278. DOI: 10.1186/s13054-020-02989-1. PMID: 32487252.
6. Chernevskaya E., Beloborodova N., Klimenko N., Pautova A., Shilkin D., Gusarov V., Tyakht A. Serum and fecal profiles of aromatic microbial metabolites reflect gut microbiota disruption in critically ill patients: a prospective observational pilot study. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 312. DOI: 10.1186/s13054-020-03031-0. PMID: 32513224.
7. Xiao K., Sun Y., Song J., Li L., Mao W., Jiang C. Gut microbiota involved in myocardial dysfunction induced by sepsis. *Microb Pathog.* 2023; 175: 105984. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.105984. PMID: 36638851.
8. Wasyluk W., Zwolak A. Metabolic alterations in sepsis. *J Clin Med.* 2021; 10 (11): 2412. DOI: 10.3390/jcm10112412. PMID: 34072402.
9. Sun S., Wang D., Dong D., Xu L., Xie M., Wang Y., Ni T., et al. Altered intestinal microbiome and metabolome correspond to the clinical outcome of sepsis. *Crit Care.* 2023; 27 (1): 127. DOI: 10.1186/s13054-023-04412-x. PMID: 36978107.
10. Beloborodova N.V., Sarshor Yu.N., Bedova A.Yu., Chernevskaya E.A., Pautova A.K. Involvement of aromatic metabolites in the pathogenesis of septic shock. *Shock.* 2018; 50 (3): 273–279. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001064. PMID: 29189605.
11. Beloborodova N.V. Serum aromatic microbial metabolites as biological markers in intensive care. In: Rajendram, R., Preedy, V.R., Patel, V.B. (eds.). *Biomarkers in trauma, injury and critical care.* Biomarkers in disease: methods, discoveries and applications. Springer, Cham. 2023; 13: 245–268. DOI: 10.1007/978-3-031-07395-3_64.
12. Белобородова Н.В., Байрамов И.Т., Оленин А.Ю., Федотчева Н.И. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека. *Биомедицинская химия.* 2011; 57 (1): 95–105. [Beloborodova N.V., Bairatov I.T., Olenin A.Iu., Fedotcheva N.I. Exometabolites of some anaerobic microorganisms of the human microflora. *Biomed Khim.* 2011; 57 (1): 95–105. (In Russ.)]. DOI: 10.18097/pbmc20115701095. PMID: 21516781.
13. Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38 (6): 763–772. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.020. PMID: 15721987.
14. Russell W.R., Duncan S.H., Scobbie L., Duncan G., Cantlay L., Calder A.G., Anderson S.E., et al. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57 (3): 523–535. DOI: 10.1002/mnfr.201200594. PMID: 23349065.
15. Muñoz-González I., Jiménez-Girón A., Martín-Álvarez P.J., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V. Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *J Agric Food Chem.* 2013; 61 (39): 9470–9. DOI: 10.1021/jf4025135. PMID: 24010549.
16. Saito Y., Sato T., Nomoto K., Tsuji H. Identification of phenol- and p-cresol-producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. *FEMS Microbiol Ecol.* 2018; 94 (9): fty125. DOI: 10.1093/femsec/fty125. PMID: 29982420.
17. Gutiérrez-Díaz I., Fernández-Navarro T., Salazar N., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V., López P., Suárez A., et al. Could fecal phenylacetic and phenylpropionic acids be used as indicators of health status? *J Agric Food Chem.* 2018; 66 (40): 10438–10446. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b. PMID: 30227707.
18. Жиркова Е.А., Спиридонова Т.Г., Сачков А.В., Елисеенкова Е.А., Брыгин П.А., Никулина В.П., Кашолкина Е.А., с соавт. Биомаркеры воспаления при острой дыхательной недостаточности у пациентов с интубационной травмой. *Анестезиология и реаниматология.* 2022; (5): 23–29. [Zhirkova E.A., Spiridonova T.G., Sachkov A.V., Eliseenkova E.A., Brygin P.A., Nikulina V.P., Kasholkina E.A., et al. Biomarkers of inflammation in acute respiratory insufficiency in patients with intubation injury. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology/ Anesteziologiya i Reanimatologiya.* 2022; (5): 23–29. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/anaesthesiology202303145.
19. Козлов И.А., Соколов Д.А. Оценка биомаркера напряжения миокарда NT-проBNP в реальной клинической практике. *Общая реаниматология.* 2023; 19 (1): 4–12. [Kozlov I.A., Sokolov D.A. Assessment of the myocardial stress biomarker NT-proBNP in real clinical practice. *General Reanimatology/ Obshchaya Reanimatologiya.* 2023; 19 (1): 4–12. (In Russ.)]. DOI: 10.15360/1813-9779-2023-1-2272.
20. Dwivedy A.K., Shah S.N. Effects of phenylalanine and its deaminated metabolites on Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptosomes from rat brain. *Neurochem Res.* 1982; 7 (6): 717–25. DOI: 10.1007/BF00965524. PMID: 6289150.

21. Zhu L., Shao Y.D., Wang J.Y., Lin D.L., Gu C.L., Li Y.H., Gu J.G., et al. Effect of beta-phenyl lactic acid on platelet aggregation, thrombosis, and plasma cAMP content. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1988; 9 (3): 249–251. PMID: 2850712.
22. Вахитова Т.Я., Чалисова Н.И., Ситкин С.И., Салль Т.С., Шалаева О.Н., Демьянова Е.В., Моругина А.С., с соавт. Низкомолекулярные компоненты метаболома крови регулируют пролиферативную активность в клеточных и бактериальных культурах. *Доклады академии наук*. 2017; 472 (4): 491–493. [Vakhitova T.Ya., Chalisova N.I., Sitkin S.I., Sall T.S., Shalaeva O.N., Demyanova E.V., Morugina A.S., et al. Low molecular weight components of the blood metabolome regulate proliferative activity in cell and bacterial cultures. *Reports of the Academy of Sciences*. 2017; 472 (4): 491–493. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0012496617010069. PMID: 28429257.
23. Martiin M., Gibello A., Fernaindez J., Ferrer E., Garrido-Pertierra A. Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol*. 1991; 137 (3): 621–628. DOI: 10.1099/00221287-137-3-621. PMID: 1851804.
24. Calder P.C. n-3 fatty acids, inflammation, and immunity — relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids*. 2004; 39 (12): 1147–1161. DOI: 10.1007/s11745-004-1342-z. PMID: 15736910.
25. Dodd D., Spitzer M.H., Van Treuren W., Merrill B.D., Hryckowian A.J., Higginbottom S.K., Le A., et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature*. 2017; 551 (7682): 648–652. DOI: 10.1038/nature24661. PMID: 29168502.
26. Díaz E., Ferrández A., Prieto M.A., García J.L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001; 65 (4): 523–569. DOI: 10.1128/MMBR.65.4.523-569.2001. PMID: 11729263.
27. Clarkson S.M., Giannone R.J., Kridelbaugh D.M., Elkins J.G., Guss A.M., Michener J.K. Construction and optimization of a heterologous pathway for protocatechuate catabolism in *Escherichia coli* enables bioconversion of model aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol*. 2017; 83 (18): e01313–17. DOI: 10.1128/AEM.01313-17. PMID: 28733280.
28. Smith E.A., Macfarlane G.T. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol*. 1996; 81 (3): 288–302. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x. PMID: 8810056.
29. Liu Y., Guo Y., Hu S., Wang Y., Zhang L., Yu L., Geng F. Analysis of the dynamic changes in gut microbiota in patients with different severity in sepsis. *BMC Infect Dis*. 2023; 23 (1): 614. DOI: 10.1186/s12879-023-08608-y. PMID: 37723420
30. Zhou Y., Luo Y., Wang X., Luan F., Peng Y., Li Y., Ma X., et al. Early gut microbiological changes and metabolomic changes in patients with sepsis: a preliminary study. *Int Microbiol*. 2023; 26 (4): 1131–1142. DOI: 10.1007/s10123-023-00363-z. PMID: 37145385.
31. Evans T., Ali U., Anderton R., Raby E., Manning L., Litton E. Lower gut dysbiosis and mortality in acute critical illness: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2023; 11 (1): 6. DOI: 10.1186/s40635-022-00486-z. PMID: 36732439.
32. Chanderraj R., Baker J.M., Kay S.G., Brown C.A., Hinkle K.J., Fergle D.J., McDonald R.A., et al. In critically ill patients, anti-anaerobic antibiotics increase risk of adverse clinical outcomes. *Eur Respir J*. 2023; 61 (2): 2200910. DOI: 10.1183/13993003.00910-2022. PMID: 36229047.
33. Zanza C., Romenskaya T., Thangathurai D., Ojetti V., Saviano A., Abenavoli L., Robba C., et al. Microbiome in critical care: an unconventional and unknown ally. *Curr Med Chem*. 2022; 29 (18): 3179–3188. DOI: 10.2174/0929867328666210915115056. PMID: 34525908.
34. Zaborin A., Smith D., Garfield K., Quensen J., Shakhsheer B., Kade M., Tirrell M., et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio* 2014; 5 (5): e01361-14. DOI: 10.1128/mBio.01361-14. PMID: 25249279.
35. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. *Альманах клинической медицины*. 2018; 46 (5): 396–425. [Sitkin S.I., Vakhitov T.Ya., Demyanova E.V. The microbiome, colon dysbiosis, and inflammatory bowel disease: that moment when function is more important than taxonomy. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018; 46 (5): 396–425. (In Russ.)]. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425.
36. Zhang Z., Cheng L., Ning D. Gut microbiota and sepsis: bidirectional Mendelian study and mediation analysis. *Front Immunol*. 2023; 14: 1234924. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1234924. PMID: 37662942.
37. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004; 305 (5690): 1622–1625. DOI: 10.1126/science.1099390. PMID: 15308767.
38. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Молекулярные механизмы персистенции бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97 (3): 271–279. [Andryukov B.G., Lyapun I.N. Molecular mechanisms of persistence of bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology/ Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol*. 2020; 97 (3): 271–279. (In Russ.)]. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-10.
39. Orman M.A., Brynildsen M.P. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun*. 2015; 6: 7983. DOI: 10.1038/ncomms8983. PMID: 26246187.
40. Маркелова Н.Н., Тутельян А.В., Писарев В.М., Гапонов А.М. Некоторые закономерности формирования персистирующих форм клинических изолятов грамотрицательных бактерий. *Антибиотики и Химиотерапия*. 2018; 63 (7–8): 41–46. [Markelova N.N., Tutelyan A.V., Pisarev V.M., Gaponov A.M. Some regularities of persistent forms of clinical isolates of gram-negative bacteria formation. *Antibiotics and Chemotherapy/Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2018; 63 (7–8): 41–46. (In Russ.)].
41. Zelezniak A., Andrejev S., Ponomarova O., Mende D.R., Bork P., Patil K.R. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112 (20): 6449–54. DOI: 10.1073/pnas.1421834112. PMID: 25941371.

Поступила 27.07.2023
Принята 31.10.2023