

Исследование особенностей метаболома пациентов с COVID-19

Русских Я. В.¹, Сушенцева Н. Н.¹, Попов О. С.^{1,2}, Апалько С. В.^{1,2}, Анисенкова А. Ю.^{1,2}, Мосенко С. В.^{1,2}, Сарана А. М.^{2,3}, Щербак С. Г.^{1,2}

¹СПбГБУЗ "Городская больница № 40 Курортного района" Отдела здравоохранения Администрации Курортного района г. Санкт-Петербурга. Сестрорецк; ²ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет". Санкт-Петербург;

³Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга. Санкт-Петербург, Россия

Цель. Комплексный анализ особенностей метаболомного профиля пациентов с COVID-19 (COroNa Virus Disease 2019, новая коронавирусная инфекция) с использованием методов масс-спектрометрии и с учетом клинко-лабораторного анамнеза. Изучение связи между тяжестью симптомов COVID-19 и концентрацией первичных метаболитов, прежде всего аминокислот.

Материал и методы. В ретроспективное исследование включены образцы сыворотки крови в общей сложности 935 человек (445 мужчин и 490 женщин) из коллекции биобанка СПб ГБУЗ "Городская больница № 40" из числа заболевших COVID-19. Во всех образцах хромато-масс-спектрометрическим методом было проведено исследование метаболомного профиля. Для статистической обработки данных использовался язык программирования R.

Результаты. На основании проведенного анализа выявлено различие метаболомического профиля пациентов с COVID-19 в зависимости от тяжести заболевания — для 52 из 84 обнаруженных соединений наблюдались различия с достоверностью $p < 0,01$. Статистически значимые различия в концентрации зафиксированы для органических кислот, аминокислот и их производных.

Заключение. С использованием образцов из коллекции биобанка было проведено метаболомное исследование биоматериала пациентов, госпитализированных с диагнозом COVID-19. Согласно получен-

ным результатам, с тяжестью протекания COVID-19 ассоциированы кинуренин, фенилаланин и ацетилкарнитин. Выявлены различия метаболомного профиля у пациентов с цитокиновым штормом на момент взятия крови, определены метаболиты, подходящие под потенциальные биомаркеры развития цитокинового шторма.

Ключевые слова: биобанк, COVID-19, метаболомный профиль, хромато-масс-спектрометрический анализ, цитокиновый шторм.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 31/08-2023

Рецензия получена 08/09-2023

Принята к публикации 13/09-2023



Для цитирования: Русских Я. В., Сушенцева Н. Н., Попов О. С., Апалько С. В., Анисенкова А. Ю., Мосенко С. В., Сарана А. М., Щербак С. Г. Исследование особенностей метаболома пациентов с COVID-19. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023; 22(11):3711. doi:10.15829/1728-8800-2023-3711. EDN UOWPDT

Study of the metabolome features of patients with COVID-19

Russkikh Y. V.¹, Sushentseva N. N.¹, Popov O. S.^{1,2}, Apalko S. V.^{1,2}, Anisenkova A. Yu.^{1,2}, Mosenko S. V.^{1,2}, Sarana A. M.^{2,3}, Shcherbak S. G.^{1,2}

¹City Hospital № 40 of the Kurortny District. Sestroretsk; ²Saint-Petersburg State University. St. Petersburg; ³Health Committee of Saint-Petersburg. St. Petersburg, Russia

Aim. To analyze the metabolomic profile of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) using mass spectrometry methods and taking into account clinical and laboratory history. Studying the relationship between the severity of COVID-19 symptoms and the concentration of primary metabolites, primarily amino acids.

Material and methods. The retrospective study included serum samples from a total of 935 people (445 men and 490 women) with COVID-19 from the collection of the biobank of the City Hospital № 40. A metabolomic profile was studied in all samples using chromatography-mass spectrometry. The R language was used for statistical data processing.

Results. Based on the analysis, a difference in the metabolic profile of patients with COVID-19 was identified depending on the disease severity — for 52 of the 84 detected compounds, differences were observed with a significance of $p < 0,01$. Significant differences in concentration were recorded for organic acids, amino acids and their derivatives.

Conclusion. Using samples from the biobank collection, a metabolomic study of the biomaterial of patients hospitalized with a diagnosis of COVID-19 was carried out. According to the results obtained, kynurenine, phenylalanine and acetylcarnitine are associated with COVID-19 severity. Differences in the metabolomic profile were

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: navicula@yandex.ru

[Русских Я. В. — к.х.н., специалист, ORCID: 0000-0003-1762-3055, Сушенцева Н. Н. — начальник научно-исследовательской лаборатории трансляционной биомедицины научно-исследовательского отдела инновационных и конверсионных программ, ORCID: 0000-0002-5100-5229, Попов О. С. — специалист, магистрант, ORCID: 0000-0003-1778-0165, Апалько С. В. — к.б.н., начальник научно-исследовательского отдела инновационных и конверсионных программ, с.н.с. ORCID: 0000-0002-3853-4185, Анисенкова А. Ю. — врач-терапевт, кардиолог, доцент кафедры последипломного медицинского образования, ORCID: 0000-0001-5642-621X, Мосенко С. В. — врач-невролог, с.н.с., ORCID: 0000-0002-1357-4324, Сарана А. М. — доцент кафедры последипломного мед. образования, и.о. декана медицинского факультета, первый заместитель председателя Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, ORCID: 0000-0003-3198-8990, Щербак С. Г. — главный врач, профессор кафедры последипломного медицинского образования, зав. кафедрой, ORCID: 0000-0001-5047-2792].

identified in patients with cytokine storm at the time of blood collection. Potential biomarkers for cytokine storm were identified.

Keywords: biobank, COVID-19, metabolomic profile, gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytokine storm.

Relationships and Activities: none.

*Corresponding author:
navicula@yandex.ru

Received: 31/08-2023

Revision Received: 08/09-2023

Accepted: 13/09-2023

Russkikh Y. V. ORCID: 0000-0003-1762-3055, Sushentseva N. N.* ORCID: 0000-0002-5100-5229, Popov O. S. ORCID: 0000-0003-1778-0165, Apalko S. V. ORCID: 0000-0002-3853-4185, Anisenkova A. Yu. ORCID: 0000-0001-5642-621X, Mosenko S. V. ORCID: 0000-0002-1357-4324, Sarana A. M. ORCID: 0000-0003-3198-8990, Shcherbak S. G. ORCID: 0000-0001-5047-2792.

For citation: Russkikh Y. V., Sushentseva N. N., Popov O. S., Apalko S. V., Anisenkova A. Yu., Mosenko S. V., Sarana A. M., Shcherbak S. G. Study of the metabolome features of patients with COVID-19. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3711. doi:10.15829/1728-8800-2023-3711. EDN UOWPDT

ADMA — асимметричный диметиларгинин, АМФ — аденозинмонофосфат, ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией, КК — кинуреновая кислота, КТ — компьютерная томография, МС — масс-спектрометрия, СДМА — симметричный диметаларгинин, ТМФ — тимидинмонофосфат, ЦШ — цитокиновый шторм, AhR — арильный углеводородный рецептор, COVID-19 — COrona Vlrus Disease 2019 (новая коронавирусная инфекция), SAH — S-аденозилгомоцистеин, SAM — S-аденозилметионин, lfc — log fold change (логарифм кратности изменения).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Метаболомное профилирование крови пациентов широко используется с целью получения знаний о патогенезе заболевания и возможных терапевтических мишенях.
- Результаты метаболомных исследований пациентов с COVID-19 (COrona Vlrus Disease 2019), полученные различными исследователями, различаются, что может быть обусловлено популяционными факторами.

Что добавляют результаты исследования?

- Одно из первых метаболомных исследований, проведенных с использованием биобанка, со значительной выборкой инфицированных COVID-19 пациентов из Санкт-Петербурга и Ленинградской области (РФ), выполненное методом хромато-масс-спектрометрии с учетом клинко-лабораторного анамнеза.
- COVID-19 оказывает наибольшее влияние на метаболизм аминокислот и соединений, входящих в цикл трикарбоновых кислот.

Key messages

What is already known about the subject?

- Metabolomic profiling of patient blood is widely used to study disease pathogenesis and possible therapeutic targets.
- The results of metabolomic studies of patients with COVID-19 obtained by different researchers vary, which may be due to population factors.

What might this study add?

- We performed one of the first metabolomic studies conducted using a biobank, with a significant sample of COVID-19 patients from St. Petersburg and the Leningrad Oblast, carried out using gas chromatography-mass spectrometry, taking into account clinical and laboratory history.
- COVID-19 has the greatest impact on the metabolism of amino acids and compounds included in the tricarboxylic acid cycle.

Введение

В последнее время появляется все больше исследований, посвященных анализу метаболома крови для диагностики и оценки тяжести заболеваний [1-4]. Метаболомное профилирование биологических жидкостей человека вызывает большой интерес с точки зрения возможностей получения дополнительных знаний о патогенезе заболеваний и возможных терапевтических мишенях.

Основным методом исследования метаболома является масс-спектрометрия (МС), которая позволяет с высокой надежностью, специфичностью и чувствительностью определять широкий круг разнообразных соединений, в т.ч. являющихся маркерами заболеваний, даже в очень низкой концентрации.

Биобанки предоставляют исследователям охарактеризованный биологический материал, что позволяет сформировать оптимальные когорты пациентов. Использование биобанков дает возможность проводить масштабные метаболомные исследования в сжатые сроки и быстро внедрять значимые результаты в клиническую практику.

Сочетание возможностей МС и биобанкирования в метаболомном анализе может использоваться для оценки прогноза развития новой коронавирусной инфекции, а выявленные метаболические профили — для уточнения связанных с заболеванием биологических путей.

Известно, что новая коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19 — COrona Vlrus Disease 2019) вызы-

Таблица 1

Половозрастная структура обследованных групп пациентов [M±SD]

Сравнение	Группа	n	n (муж.)	n (жен.)	Возраст	Возраст (муж.)	Возраст (жен.)
Степень тяжести течения заболевания (n=935)	I	25	16	9	51±16,2	50,9±16,6	51,3±16,3
	II	564	263	301	61,5±15,5	59,7±15,3	63,1±15,5
	III	346	166	180	69,1±14,2	67,1±14,3	70,9±13,8
Исход заболевания (n=935)	IV	141	73	68	74,8±12,4	73±12,1	76,7±12,5
	V	794	372	422	62,1±15,3	60±15,2	64±15,2
Наличие ЦШ (n=352)	VI	143	85	58	66,4±13,7	64,5±14,5	69,1±12
	VII	209	86	123	61,8±15,8	58,8±16,5	63,9±15,1

Примечание: I — группа пациентов с легким течением заболевания, II — группа пациентов со среднетяжелым течением заболевания, III — группа пациентов с тяжелым течением заболевания, IV — группа пациентов с летальным исходом заболевания, V — группа пациентов, успешно выписанных после госпитализации, VI — группа пациентов с наличием ЦШ на момент взятия биоматериала, VII — группа пациентов без ЦШ на момент взятия биоматериала. Сравнение — параметр, по которому сравниваются исследуемые группы, в скобках (n) дано общее количество пациентов из выборки, вошедших в группы. ЦШ — цитокиновый шторм, муж. — мужчины, жен. — женщины.

вает у некоторых инфицированных людей продолжительный и неконтролируемый цитокиновый ответ, известный как цитокиновый шторм (ЦШ). ЦШ при COVID-19 часто приводит к диффузному альвеолярному повреждению легких, проявляющемуся острым респираторным дистресс-синдромом с явлениями полиорганной недостаточности, а в ряде случаев тромбгеморрагическим (ДВС-подобным) синдромом, или синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, и может стать причиной летального исхода [1, 5].

Выявление факторов, позволяющих прогнозировать риск развития тяжелого течения заболевания и его осложнений, а также поиск биомаркеров, определяющих риски развития ЦШ при COVID-19, является важной задачей.

Спектр аминокислот отображает многие процессы, происходящие в организме, и может содержать сведения об особенностях протекания многих заболеваний. Аминокислоты необходимы для синтеза белков, гормонов и нейротрансмиттеров, они являются предшественниками многих жизненно важных молекул и играют ключевую роль в функционировании иммунных клеток, поэтому нарушение метаболизма аминокислот может вызывать неврологические симптомы и полиорганную недостаточность [6, 7]. Аминокислоты плазмы связывают все системы органов и играют важную физиологическую роль в качестве основных метаболитов и регуляторов метаболизма. Соответственно, метаболические изменения, возникающие при заболеваниях различных систем и органов, будут оказывать влияние на аминокислотные профили, а спектр аминокислот может служить прогностическим фактором или указывать на развитие ряда заболеваний [8].

К настоящему времени опубликовано немало работ, посвященных изучению метаболомного профиля пациентов с COVID-19. Большинство из них направлены на определение уникальной метаболитической сигнатуры COVID-19 или на прогнозирование

тяжести заболевания и/или смертности от него [1-3, 9]. Отмечено, что при многих заболеваниях изменение уровня определенных аминокислот может служить прогностическим фактором [4, 6]. Кроме того, в ряде клинических исследований было показано, что на исход заболевания может влиять добавка в рацион аминокислот, концентрация которых уменьшается при тяжелом течении COVID-19 [1, 2]. Таким образом, выявление аминокислотных профилей может быть полезным не только в качестве биомаркеров патологических состояний, но и для разработки стратегий лечения [3, 4].

Концентрации аминокислот в сыворотке крови достаточно сильно связаны с симптоматикой COVID-19 [1, 6, 9-12]. Однако данные об участии отдельных аминокислот в патологических процессах могут значительно расходиться. Так, в ряде исследований сообщалось, что уровень концентрации фенилаланина был положительно связан с тяжестью симптомов [6, 13, 14], тогда как в других работах отмечена обратная связь [15] или отсутствие такой связи [11, 16].

Целью настоящей работы было выявление особенностей метаболомного (прежде всего, аминокислотного) профиля пациентов, инфицированных COVID-19, с различной тяжестью течения и исходами заболевания.

Материал и методы

Используемый материал. Для исследования аминокислотного профиля использовали замороженную сыворотку крови из коллекции биобанка Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения (СПб ГБУЗ) "Городская больница № 40". Документы в рамках научно-исследовательского проекта "Биобанкирование и биомедицинские исследования образцов тканей и жидкостей человека" были одобрены Экспертным советом по этике СПб ГБУЗ "Городская больница № 40" на заседании № 119 от 09 февраля 2017г. У всех участников исследования было получено письменное информированное добровольное согласие

Таблица 2

Список первичных метаболитов

Гликолитическая система	Органические кислоты	Метионина сульфоксид	Гуанозин-3',5'-циклический монофосфат
Молочная кислота	4-аминобутановая кислота	Симметричный диметиларгинин	Гуанозинмонофосфат
Пировиноградная кислота	Аденилосукцинат	Фенилаланин	Тимидин
Цикл трикарбоновых кислот	Аргинин-янтарная кислота	Пролин	Прочие соединения
2-кетоглутаровая кислота	Холевая кислота	Серин	2-аминобутановая кислота
Аконитовая кислота	Креатин	Орнитин	Ацетилкарнитин
Лимонная кислота	Никотиновая кислота	Треонин	Ацетилхолин
Фумаровая кислота	Офтальмовая кислота	Триптофан	Аллантоин
Изолимонная кислота	Оротовая кислота	Тирозин	Карнитин
Яблочная кислота	Пантотеновая кислота	Валин	Карнозин
Янтарная кислота	Таурохолевая кислота	Цикл метилирования и транссульфурации	Холин
Аминокислоты	Мочевая кислота	Цистатионин	Цитиколлин
4-гидроксипролин	Нуклеозиды и нуклеотиды	Цистеин	Креатинин
Аланин	Аденин	Гомоцистеин	Цистеамин
Аргинин	Цитозин	Метионин	ДОФА (диоксифенилаланин)
Аспарагин	Гуанин	5-глутамилцистеин	Дофамин
Аспарагиновая кислота	Тимин	Глутатион	Адреналин
Лизин	Урацил	Окисленный глутатион	Гистамин
Цитруллин	Ксантин	S-аденозилгомоцистеин (SAH)	Гипоксантин
Цистин	Аденозин	S-аденозилметионин (SAM)	Кинуренин
Диметилглицин	Цитидин	Коферменты	Никотинамид
Глутаминовая кислота	Гуанозин	ФАД (флавинадениндинуклеотид)	Норадреналин
Глутамин	Инозин	ФМН (флавиномононуклеотид)	Серотонин
Глицин	Тимидин	НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид)	Внутренние стандарты (ISTD)
Гистидин	Уридин		2-(N-морфолино)этансульфо- новая кислота
Гомоцистин	Аденозин 3',5'-циклический монофосфат		L-метионин сульфон
Изолейцин	Аденозинмонофосфат		
Лейцин	Цитидин-3',5'-циклический монофосфат		
Асимметричный диметиларгинин	Цитидинмонофосфат		

на помещение их биоматериала в биобанк с последующим использованием в научных целях.

Пациенты и группы. В ретроспективное исследование были включены образцы сыворотки 935 пациентов (445 мужчин и 490 женщин) с диагнозом U07.1 — "Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован" (таблица 1). Диагноз COVID-19 был поставлен на основании клинической картины и по результатам ПЦР (полимеразной цепной реакции)-тестирования.

Для отбора пациентов в исследование использовали следующие критерии включения:

1. Пациент госпитализирован в отделение реанимации и интенсивной терапии с основным диагнозом "Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован" (U07.1)
2. Подписанное информированное согласие на взятие крови и биобанкирование материала.
3. Отсутствие в анамнезе вируса иммунодефицита человека, гепатитов В и С, сифилиса.
4. Материал от пациента поступил на ранних сроках после госпитализации, до начала терапии (антицитокиновой терапии, гемосорбции, переливания плазмы реконвалесцентов и др.).

Пациенты были разделены на группы в соответствии со степенью тяжести заболевания согласно актуальной версии "Временных методических рекомендаций. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)": (I) "легкое течение" — группа пациентов с легким протеканием COVID-19 без изменений при компьютерной томографии (КТ), характерных для вирусного поражения (16 мужчин и 9 женщин); (II) — "среднетяжелое течение" — группа пациентов с повышенной температурой тела ($>38^{\circ}\text{C}$), относительно низким уровнем насыщения крови кислородом и изменениями при КТ, типичными для вирусного поражения (263 мужчин и 301 женщина), (III) — "тяжелое течение" — группа пациентов с тяжелым течением COVID-19, при котором наблюдаются снижение уровня сознания, нестабильная гемодинамика и изменения при КТ вплоть до критической степени поражения и острого респираторного дистресс-синдрома (166 мужчин и 180 женщин).

Также были выделена группа IV — пациенты с летальным исходом заболевания (всего 73 мужчины и 68 женщин), а в качестве группы сравнения использовали группу пациентов, успешно выписанных после лечения — V.

Наличие ЦШ (в любой день на протяжении всей госпитализации) определялось согласно следующим условиям: уровень ферритина >485 мкг/л, С-реактивного белка >50 мг/л, D-димера $>2,5$ мкг/мл, интерлейкина-6 >25 пг/мл, активность лактатдегидрогеназы >550 ед/л. При совпадении ≥ 3 условий пациента определяли в группу VI, при невыпадении всех условий пациента определяли в группу VII.

Для групп VI и VII использовали дополнительный критерий исключения: отсутствие как минимум двух параметров (лабораторных биомаркеров), используемых для определения ЦШ, измеренных в день взятия биоматериала. После исключения общее количество пациентов в сравнении (VI и VII группы) сократилось с 935 до 352.

Метод исследования профиля метаболитов. Подготовку образцов сыворотки крови проводили в дубликатах (параллельные измерения). В качестве внутренних стандартов использовали 4-морфолинэтансульфоновую кислоту и метионин сульфат (фирмы Sigma-Aldrich). Образцы замораживали при комнатной температуре, далее к 50 мкл сыворотки крови добавляли 100 мкл раствора смеси внутренних стандартов в ацетонитриле. Полученный экстракт разбавляли водой (очищенной с использованием системы Milli-Q), центрифугировали и анализировали с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Приготовленные стандартные растворы и экстракты хранили при температуре -20°C .

Контролем качества служили экстракты образцов усредненной сыворотки крови с добавкой внутренних стандартов, приготовленные по той же процедуре, что и экспериментальные образцы. Усредненную сыворотку готовили из предварительно отобранных и тщательно смешанных образцов сыворотки крови нескольких доноров, полученную смесь аликвотировали и замораживали до проведения исследования. В качестве "холостой" пробы использовали 5% раствор этилендиаминтетраацетата натрия и аликвоты растворителей в соответствующих объемах, пропущенные через все стадии пробоподготовки.

Исследование профиля метаболитов проводили с использованием жидкостного хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполом LCMS-8050 (фирмы Shimadzu) с хроматографической системой Nexera X2. ВЭЖХ-МС/МС — анализ выполняли с применением коммерчески доступного метода "LC/MS/MS Method Package for Primary Metabolites" для анализа первичных метаболитов с использованием аналитической колонки Discovery HS F5-3 ($150 \times 2,1$ мм, 3 мкм) (Supelco, Merck) в режиме мониторинга множественных реакций. Метод позволяет проводить одновременный анализ 98 первичных метаболитов (таблица 2), включающих аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды, нуклеозиды и коферменты. Масс-спектрометрические и хроматографические условия и параметры задавали согласно инструкции для метода "LC/MS/MS Method Package for Primary Metabolites". Сбор и обработку данных проводили с применением программного обеспечения LabSolutions по методу внутреннего стандарта.

Статистическая обработка данных. Для проверки гипотезы о нормальном распределении данных использовался тест Шапиро-Уилка. Для выявления межгруппового различия в уровнях концентрации исследуемых соединений использовался однофакторный дисперсионный анализ по критерию Краскела-Уоллиса, в качестве *post-hoc* анализа применялся критерий Манна-Уитни. В качестве меры, ото-

бражающей разность диапазона значений между выборками, использовался логарифм кратности изменения (log fold change, lfc), описательная статистика представлена медианой (Me) и интерквартильным размахом [Q25-Q75]. Для оценки связи между индексом коморбидности и концентрацией исследуемых соединений использовался коэффициент корреляции Спирмена. Различия между выборками считали значимым при $p < 0,05$ и $lfc > 1$. Обработка и статистический анализ данных выполнены с использованием языка программирования R версии 4.3.1.

Исследование выполнено в рамках проекта Санкт-Петербургского государственного университета ID 94029859 и при взаимодействии с базой Ресурсного центра Биобанк (Core facility center "Biobank").

Результаты

Каждый образец анализировали на наличие первичных метаболитов основных химических классов клинически значимых низкомолекулярных соединений. Для дальнейшего анализа использовали только те метаболиты, которые показали ненулевые значения как минимум в нескольких повторях. Таким образом, из 98 метаболитов, которые могут быть детектированы используемым методом, были отобраны 84 соединения.

Результаты проведенного анализа первичных метаболитов выявили различия метаболомного профиля в зависимости от тяжести заболевания для 52 из 84 детектированных соединений (со значимостью $p < 0,01$). Наибольшее различие в сравнении групп по тяжести течения COVID-19 показали следующие метаболиты: кинуренин ($p < 0,0001$; $lfc = 1,62$), фенилаланин ($p < 0,0001$; $lfc = 1,13$) и ацетилкарнитин ($p < 0,0001$; $lfc = 1,28$).

Различия между группами с высоким уровнем статистической значимости обнаружены и для концентрации следующих соединений: цитруллин, орнитин, цистин, диметилглицин, асимметричный диметиларгинин (АДМА), аланин, цистатион, карнозин, 5-глутамилцистеин, аргинин (таблица 3).

Кроме того, при прогрессировании тяжести COVID-19 последовательно изменялись уровни содержания тирозина, гистидина, пролина, треонина, симметричного диметиларгинина (СДМА), креатинина, аденозина, тимидинмонофосфата (ТМФ), цитозина, S-аденозилгомоцистеина (SAH), никотинамида.

Отличия в метаболомическом профиле пациентов I группы с COVID-19 от II группы наблюдались для более чем 30 исследованных соединений (таблица 3). Для II группы пациентов были выявлены повышенные уровни кинуренина, фенилаланина, ацетилкарнитина, диметилглицина, пролина, цитозина, тирозина, аденозина, SAH, ТМФ, а несколько меньше для изолейцина, аллантаина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, 4-гидроксипролина, цистатиона, лизина, глицина, 5-глутамилцистеина, глутатиона, валина, серина, аденозинмонофосфата (АМФ), 2-кетоглутаровой, яблочной и оротовой кислот, креатина, лимонной,

Таблица 3

Концентрации метаболитов в крови пациентов разных групп,
разделенных по тяжести течения заболевания [Ме (Q25-Q75)]

Метаболит	I (легкое)	II (средне-тяжелое)	III (тяжелое)	"Значимость"	I, II	I, III	II, III
L-цистин	0,191 (0,132-0,667)	1,77 (0,207-5,44)	2,76 (0,395-6,07)	<0,001	0,001	<0,001	0,001
L-аспарагин	1,63 (0,778-1,95)	2,6 (1,74-3,94)	2,8 (1,76-4,11)	<0,001	<0,001	<0,001	0,249
L-аспарагиновая кислота	1,45 (0,692-1,78)	2,32 (1,51-3,31)	2,17 (1,53-3,38)	<0,001	<0,001	<0,001	0,445
L-аланин	34,4 (25,3-38,7)	21,4 (12-32,6)	16,3 (10,4-27,5)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-циста-тионин	0,042 (0,015-0,08)	0,147 (0,085-0,298)	0,201 (0,11-0,439)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L-яблочная кислота	0,009 (0,002-0,016)	0,016 (0,007-0,025)	0,022 (0,013-0,038)	<0,001	0,029	<0,001	<0,001
L-цистеин	0,145 (0,059-0,329)	0,09 (0,02-0,255)	0,042 (0,019-0,153)	<0,001	0,111	0,001	<0,001
Цитруллин	4,12 (3,18-5,76)	2,76 (0,88-4,54)	2,02 (0,85-3,35)	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
L-пролин	10,1 (8,41-16,9)	26,9 (11,9-44,9)	31,8 (14,6-51,8)	<0,001	<0,001	<0,001	0,033
Орнитин	7,87 (6,29-10,6)	5,89 (3,12-9,3)	4,47 (2,79-6,85)	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
ТМФ	0,001 (0-0,002)	0,004 (0-0,074)	0,029 (0,001-0,358)	<0,001	0,002	<0,001	<0,001
Серин	9,43 (2,76-11,6)	15 (9,7-21,4)	15 (9,04-19,9)	<0,001	<0,001	<0,001	0,392
Фумаровая кислота	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0,007)	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
5-глутамил-цистеин	0 (0-0)	0 (0-0,014)	0,009 (0-0,018)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Креатинин	26,9 (23,9-32,3)	38,7 (29,5-53,1)	44,8 (30,8-60,5)	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
Норадреналин	2,99 (1,58-3,39)	1,54 (0,106-2,48)	1,19 (0,086-2,33)	<0,001	<0,001	<0,001	0,022
Карнозин	0,07 (0,03-0,11)	0,026 (0,006-0,07)	0,017 (0,004-0,055)	<0,001	0,003	<0,001	0,001
SAM	1,3e-10 (0-0,004)	0 (0-0,003)	0 (0-0)	<0,001	0,022	<0,001	0,001
Асимметричный диметиларгинин	0,504 (0,419-0,659)	0,233 (0,007-0,52)	0,041 (0,004-0,4)	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
Симметричный диметиларгинин	0,132 (1,28e-10-0,588)	0,039 (0,008-0,134)	0,018 (0-0,098)	<0,001	0,085	0,004	<0,001
SAH	0,014 (0,004-0,021)	0,014 (0-0,028)	0,022 (0,009-0,037)	<0,001	0,568	0,008	<0,001
L-кинуруенин	1,21 (0,813-1,98)	1,6 (1,13-2,19)	1,96 (1,29-2,86)	<0,001	0,012	<0,001	<0,001
L-фенил-аланин	107 (59,2-148)	144 (82,8-219)	173 (106-243)	<0,001	0,021	<0,001	<0,001
L- ацетил-карнитин	45,5 (36,4-57,9)	68,2 (43-103)	86 (52,6-135)	<0,001	0,002	<0,001	<0,001
Гистамин	0 (0-0,011)	0,0154 (0-0,029)	0,022 (0,006-0,048)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Аллантоин	0,01 (0,006-0,0147)	0,015 (0,007-0,023)	0,017 (0,01-0,032)	0,001	0,047	0,002	<0,001
Диметилглицин	1,32 (0,898-1,83)	1,83 (1,25-2,66)	2,1 (1,3-3,64)	0,001	0,005	<0,001	0,002
Глицин	2,4 (0,838-4,04)	3,78 (2,5-5,65)	3,3 (2,19-4,86)	0,001	0,005	0,046	<0,001
L-карнитин	20,4 (17,5-24,2)	26,4 (20,8-33,4)	27,5 (21,2-34,8)	0,001	<0,001	<0,001	0,182
Цитиколин	0,002 (0-0,005)	0,01 (0,002-0,023)	0,009 (0,002-0,022)	0,0012	<0,001	<0,001	0,404
L-треонин	7,48 (5,87-10,4)	8,05 (5,92-11,2)	7,07 (4,81-10,1)	0,0012	0,249	0,803	<0,001
Пировиноградная кислота	0 (0-0,043)	0,027 (0-0,052)	0,021 (0-0,036)	0,001	0,035	0,211	<0,001
Лимонная кислота	0 (0-0,064)	0,067 (0,02-0,153)	0,069 (0,016-0,191)	0,001	<0,001	<0,001	0,46
Аденозин	0,132 (0,063-0,186)	0,166 (0,065-0,435)	0,245 (0,087-0,46)	0,001	0,112	0,005	0,001
Серотонин	0,046 (0,029-0,096)	0,08 (0,032-0,19)	0,047 (0,026-0,141)	0,001	0,057	0,652	<0,001
L-глутамин	42,8 (34,8-87,3)	109 (53,5-160)	111 (57,4-162)	0,001	<0,001	<0,001	0,429
АМФ	2,07e-09 (1e-09-0,001)	0,006 (1,95e-09-0,019)	0,012 (0,001-0,022)	0,001	0,018	0,002	0,009
Цитидин	0,001 (0-0,003)	0 (0-4,21e-4)	0 (0-0,002)	0,001	<0,001	0,001	0,492
Тимидин	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,001	0,423	0,609	<0,001
Цистеамин	0 (0-0)	0 (0-1,02e-11)	0 (0-0,001)	0,001	0,005	0,001	0,03
Никотинамид	0,112 (0,037-0,261)	0,132 (0,055-0,233)	0,169 (0,076-0,298)	0,002	0,595	0,11	0,001
DL-гомоцистин	0,004 (0-0,016)	0,003 (0-0,0144)	0,002 (0-0,007)	0,002	0,506	0,709	<0,001
Урацил	0,06 (0,037-0,067)	0,0382 (0,017-0,071)	0,0326 (0,012-0,06)	0,002	0,052	0,003	0,01
Офталмовая кислота	0 (0-0)	0 (0-0,002)	0 (0-0,002)	0,003	0,003	0,001	0,159

Таблица 3. Продолжение

Метаболит	I (легкое)	II (средне-тяжелое)	III (тяжелое)	"Значимость"	I, II	I, III	II, III
Дофамин	0,01 (0,004-0,0184)	0,0084 (1,75e-08-0,0158)	0,011 (0,004-0,018)	0,004	0,522	0,639	0,001
Изолимонная кислота	0 (0-0,04)	0,0142 (0,003-0,032)	0,01 (0-0,028)	0,004	0,017	0,085	0,011
L-ДОФА	0,01 (0-0,016)	0,008 (0-0,016)	0,011 (0,002-0,018)	0,004	0,997	0,286	0,001
L-тирозин	36,9 (20,9-47,4)	46,6 (27,8-82)	53,6 (31-81,5)	0,006	0,021	0,002	0,072
L-лизин	75,4 (56-125)	141 (64,3-219)	153 (69,7-226)	0,006	0,006	0,002	0,213
L-гистидин	29,1 (23,1-34,1)	20,8 (12,7-33,2)	19,6 (11,6-31,9)	0,006	0,008	0,003	0,136
Холевая кислота	0,002 (0,001-0,003)	0,002 (7,23e-4-0,004)	0,001 (4,33e-4-0,003)	0,008	0,967	0,299	0,002
L-валин	73,8 (60,1-82)	87,7 (66,9-118)	89,9 (68,1-116)	0,01	0,004	0,002	0,653
2-кето-глутаровая кислота	0,194 (5,71e-08-0,6)	0,303 (0,131-0,592)	0,42 (0,137-0,836)	0,01	0,386	0,169	0,004

Примечание: "Значимость" — p-значение по критерию Краскела-Уоллиса. В столбцах с названием групп, перечисленных через запятую — p-значение posthoc тест (критерий Манна-Уитни) для обозначенных групп. I — группа пациентов с легким течением заболевания, II — группа пациентов со среднетяжелым течением заболевания, III — группа пациентов с тяжелым течением заболевания. В таблице представлены только те метаболиты, разница в концентрации которых была статистически значима ($p \leq 0,01$). SAN — S-аденозилгомоцистеин, SAM — S-аденозилметионин, АМФ — аденозинмонофосфат, L-ДОФА — L-диоксифенилаланин, ТМФ — тимидинмонофосфат.

Таблица 4

Концентрации метаболитов в крови пациентов разных групп, разделенных по наличию ЦШ [Me (Q25-Q75)]

Метаболит	VII (пациенты без ЦШ)	VI (пациенты с ЦШ)	p-значение
L-треонин	8,46 (6,27-11,5)	6,72 (4,67-9,26)	<0,001
L-кинуренин	1,5 (1,03-2,06)	2,12 (1,47-2,94)	<0,001
Глицин	4 (2,54-5,87)	3 (2,06-4,65)	<0,001
L-фенилаланин	141 (79,4-204)	180 (113-270)	<0,001
L-ацетилкарнитин	71,4 (38,9-101)	88,1 (54,7-135)	<0,001
SAN	0,014 (0-0,026)	0,021 (0,009-0,04)	0,001
4-гидроксипролин	2,56 (1,62-3,54)	1,83 (1,24-3,13)	0,001
Цитруллин	2,82 (0,859-4,21)	1,77 (0,795-2,9)	0,001
Цитозин	0,01 (0,001-0,023)	0,018 (0,005-0,033)	0,002
L-цистатинин	0,138 (0,083-0,265)	0,181 (0,112-0,423)	0,004

Примечание: VI — группа пациентов с наличием ЦШ на момент взятия биоматериала, VII — группа пациентов без ЦШ на момент взятия биоматериала. "Значимость" — p-значение по критерию Манна-Уитни. В таблице представлены только те метаболиты, разница в концентрации которых была статистически значима ($p \leq 0,01$). ЦШ — цитокиновый шторм, SAN — S-аденозилгомоцистеин.

2-аминобутановой и никотиновой кислот, гипоксантина, гомоцистина, холина, уридина, креатинина, карнитина, никотинамида, офтальмовой кислоты, карнозина, гуанозина, аденина, адреналина, гистамина.

В то же время уровни треонина, орнитина, цитруллина, цистеина, АДМА и СДМА, гистидина, аргинина, аланина, изолимонной и пировиноградной кислот, АМФ, глицина, норадреналина, S-аденозилметионина (SAM), холевой кислоты у пациентов II группы были ниже, чем у пациентов I группы.

Метаболический профиль пациентов III группы характеризовался дальнейшим изменением уровней тех же соединений, которые отличали I группу от II. Дополнительно были отмечены различия в уровнях изолимонной кислоты, АМФ и урацила.

При этом метаболомные профили I и III групп различались уровнями 4-гидроксипролина, аллантоина, СДМА, уридина, аденозина и SAN.

Уровни ацетилхолина, лейцина, глутамина и глутаминовой кислоты, метионин сульфоксида, гидроксипролина, гомоцистина, 2-аминобутановой кислоты, глутатиона, карнозина, триптофана, инозина, холина, пантотеновой кислоты, цитидина, аденина, адреналина, дофамина, серотонина в метаболомных профилях пациентов различных групп различались незначительно.

Для пациентов с ЦШ наблюдались повышенные уровни кинурина, треонина, фенилаланина, глицина, 4-гидроксипролина, цитруллина, SAN, цитозина, цистатина, ацетилкарнитина по сравнению с пациентами без ЦШ (таблица 4).

Различие в метаболомных профилях между выжившими и умершими пациентами отмечалось для 37 соединений из 82 (таблица 5). Различия с высоким уровнем значимости были зафиксированы для цистина ($p < 0,0005$; $lfc = 1,36$), цистеина ($p < 0,0001$; $lfc = 1,81$) и диметилглицина ($p < 0,0001$; $lfc = 1,29$).

Таблица 5

Концентрации метаболитов в крови пациентов разных групп, разделенных по исходу заболевания [Ме (Q25-Q75)]

Метаболит	V (выжившие)	IV (умершие)	p
L-треонин	7,88 (5,71-11,1)	6,9 (4,32-8,93)	<0,001
L-цистатионин	0,15 (0,085-0,303)	0,251 (0,126-0,769)	<0,001
L-яблочная кислота	0,017 (0,008-0,026)	0,023 (0,013-0,045)	<0,001
Изолимонная кислота	0,014 (0,002-0,032)	0,005 (0-0,022)	<0,001
Пировиноградная кислота	0,026 (0-0,049)	0,016 (0-0,031)	<0,001
L-молочная кислота	12,3 (8,71-17,1)	15,6 (11,3-22,9)	<0,001
Мочевая кислота	3,91 (2,7-5,66)	5,17 (3,46-7,85)	<0,001
Креатин	13 (7,94-21,9)	17,1 (9,61-40,3)	<0,001
Креатинин	38,9 (29,2-53,1)	49,3 (32,7-70,5)	<0,001
Пантотеновая кислота	0,089 (0,063-0,118)	0,106 (0,077-0,156)	<0,001
Дофамин	0,009 (0,001-0,016)	0,0135 (0,006-0,019)	<0,001
SAH	0,015 (0-0,028)	0,032 (0,018-0,055)	<0,001
L-кинуруенин	1,63 (1,14-2,26)	2,4 (1,5-3,5)	<0,0001
L-фенилаланин	145 (83,9-218)	202 (143-258)	<0,0001
L-ацетилкарнитин	68,1 (43-104)	110 (68,1-175)	<0,001
L-ДОФА	0,008 (0-0,016)	0,013 (0,006-0,019)	<0,001
2-кетоглутаровая кислота	0,307 (0,129-0,598)	0,581 (0,149-1,09)	0,001
Тимидинмонофосфат	0,006 (0-0,104)	0,025 (0,002-0,348)	0,001
DL-гомоцистин	0,003 (0-0,014)	0,001 (0-0,004)	0,001
Цитруллин	2,63 (0,89-4,29)	1,97 (0,78-3,04)	0,001
Гидроксилизин	0 (0-0,136)	0 (0-0,009)	0,001
Гистамин	0,0162 (0-0,031)	0,025 (0-0,056)	0,001
L-цистин	1,88 (0,208-5,49)	2,83 (1,37-6,11)	0,001
АМФ	0,006 (1,58e-09-0,012)	0,014 (0,001-0,024)	0,001
Фумаровая кислота	0 (0-2,11e-08)	0 (0-0,009)	0,001
L-цистеин	0,075 (0,021-0,241)	0,034 (0,019-0,123)	0,001
Цитозин	0,013 (0,003-0,028)	0,021 (0,004-0,046)	0,001
Гипоксантин	0,786 (0,387-1,29)	1,07 (0,504-1,72)	0,001
L-карнитин	26 (20,4-32,9)	28,6 (23,1-39,7)	0,001
Холевая кислота	0,002 (6,61e-4-0,004)	9,92e-4(0,0002-0,003)	0,001
Тимидин	0 (0-0)	0 (0-0)	0,001
L-изолейцин	43 (27,2-74,4)	56,4 (34,6-82,6)	0,003
Серотонин	0,07 (0,03-0,181)	0,039 (0,025-0,123)	0,003
5-глутамилцистеин	0 (0-0,015)	0,01 (0-0,017)	0,003
Никотинамид	0,136 (0,058-0,251)	0,184 (0,089-0,286)	0,003
L-лейцин	67,3 (41,7-110)	87,7 (55,5-123)	0,009
Диметилглицин	1,83 (1,25-2,72)	2,28 (1,34-4,1)	0,0099

Примечание: IV — группа пациентов с летальным исходом заболевания, V — группа пациентов, успешно выписанных после госпитализации. "Значимость" — p-значение по критерию Манна-Уитни. В таблице представлены только те метаболиты, разница в концентрации которых была статистически значима ($p \leq 0,01$). АМФ — аденозинмонофосфат, L-ДОФА — L-диоксифенилаланин, SAH — S-аденозилгомоцистеин.

В метаболоме умерших пациентов наблюдались существенно более низкие уровни треонина, цистеина, гомоцистина, гидроксилизина, гипоксантина, изолимонной, пировиноградной и холевой кислот, серотонина. В то же время уровни кинуруенина, фенилаланина, цитруллина, цитозина, диметилглицина, гистамина, 5-глутамилцистеина, цистина, карнитина, креатинина, креатина, цистатиона, лейцина и изолейцина, АМФ, ТМФ, SAH, ацетилкарнитина, 2-кетоглутаровой, яблочной, пантотеновой, молоч-

ной, мочевой и фумаровой кислот, никотинамида, дофамина были выше, чем у выживших пациентов.

При этом по уровню аллантиона, гистидина, пролина, аспарагина и аспарагиновой кислоты, орнитина, аргинина, карнитина, валина, серина, триптофана, метионина, глицина, цитидина, инозина, аденина, оротовой и 4-аминобутановой кислот, холина, уридина, никотиновой и офтальмовой кислот, адреналина, урацила эти группы пациентов практически не различались между собой.

Индекс коморбидности Чарлсона у пациентов с COVID-19 был значимо связан только с 4-мя метаболитами: серином ($p < 0,0001$; $\rho = 0,28$), цитидином ($p < 0,0001$; $\rho = 0,28$), цитидинмонофосфатом ($p < 0,0001$; $\rho = 0,26$) и SAH ($p < 0,0001$; $\rho = 0,31$).

Обсуждение

Согласно полученным результатам, наиболее ассоциированными с тяжестью протекания COVID-19 являются кинуренин, фенилаланин и ацетилкарнитин. Это согласуется с данными о повышении уровня кинуренина и фенилаланина для пациентов с COVID-19 [3, 10, 17, 18] и их отрицательной корреляции с тяжестью инфекции [6, 12]. Увеличение уровня кинуренина при COVID-19 связывают с усилением деградации триптофана из-за сверхактивации иммунного ответа через повышение уровня интерферона-гамма (усиление воспалительного ответа) и сильную активацию Т-клеток [1, 17]; отмечена взаимосвязь метаболитов кинуренинового пути с промежуточными продуктами цикла трикарбоновых кислот, воспалительной реакцией и гибелью клеток [4]. В ряде работ наблюдали взаимосвязь уровней фенилаланина и треонина плазмы с маркерами воспаления интерлейкин-6/фактор некроза опухоли, что указывает на существенную роль биосинтеза фенилаланина в иммунном ответе организма на вирус COVID-19 [6, 13]. Однако в нашем исследовании изменение уровней триптофана и треонина у пациентов с COVID-19 разных групп было незначительным.

Ацетилкарнитины играют существенную роль в энергетическом обмене и переносе жирных кислот в митохондриях. Дисбаланс ацетилкарнитинов при COVID-19 отмечен в ряде работ [3, 13, 17]. Респираторные вирусы типа вируса гриппа усугубляют накопление ацетилкарнитина; увеличение содержания ацетилкарнитинов в плазме пациентов с COVID-19 может быть обусловлено тем же механизмом [13].

Четкая корреляция с тяжестью COVID-19 зафиксирована также для цитруллина, орнитина, цистина, диметилглицина, АДМА, аланина, цистатиона, карнозина, 5-глутамилцистеина, аргинина.

Кроме того, при прогрессировании тяжести COVID-19 последовательно изменялись уровни содержания тирозина, аденозина, гистидина, креатинина, ТМФ, пролина, треонина, цитозина, СДМА, SAH, никотирамида, что согласуется с данными о корреляции путей биосинтеза тирозина с тяжестью протекания COVID-19 [19], а также о взаимосвязи между тяжелым течением COVID-19 и уровнями таких аминокислот, как фенилаланин, пролин, валин, глутамат, глутамин, триптофан, гистидин, аланин, лейцин, изолейцин, цистеин [20, 21].

Нарушение синтеза и метаболизма аминокислот аргинина, треонина, орнитина, цитруллина и аланина у пациентов с COVID-19, особенно в условиях гипоксии, отмечено во многих работах [11, 13, 18, 20, 21].

Снижение в сыворотке пациентов с COVID-19 уровней глутамата, цитруллина, орнитина, глутамина, мочевины и фумарата, а также АДМА и СДМА связывали с нарушениями функции печени [16].

Метаболический профиль пациентов с COVID-19 в тяжелом состоянии (III группа) характеризовался значительно большими изменениями по сравнению с I и II группами (таблица 3) и затрагивал все исследованные классы метаболитов, что свидетельствует о системных метаболических нарушениях, возникающих в результате развития COVID-19 и влияющих на функционирование различных органов и систем организма.

В метаболомном профиле пациентов с ЦШ отмечены повышенные уровни кинуренина, треонина, фенилаланина, глицина, 4-гидроксипролина, цитруллина, SAH, цитозина, цистатиона, ацетилкарнитина по сравнению с пациентами без ЦШ, что еще раз подчеркивает взаимосвязь этих соединений (особенно, кинуренина, фенилаланина и треонина) с тяжестью COVID-19 (таблица 4).

Аминокислота цитруллин вырабатывается практически исключительно энтероцитами и используется в качестве биомаркера массы и функции энтероцитов тонкой кишки. COVID-19 может инфицировать клетки кишечника человека, а также реплицироваться в линиях эпителиальных клеток кишечника и органоидных моделях толстой кишки человека, участвуя, таким образом, в распространении COVID-19 с повышенной вируемией [22]. Исследование различий в уровнях аминокислот в плазме между острой стадией и стадиями выздоровления у людей с внебольничной пневмонией показало, что уровни аргинина и цитруллина в плазме снижаются [21], что согласуется с полученными нами данными.

Повышенные уровни цитозина в плазме у пациентов с COVID-19 могут быть связаны с ускользанием вируса от врожденного иммунитета [23], а метаболиты на основе цитозина являются координаторами клеточного метаболизма при COVID-19, и имеют большое значение для врожденного противовирусного иммунитета и эволюции вируса.

Метаболомные профили выживших и умерших пациентов различались прежде всего уровнями кинуренина, фенилаланина, треонина, цитруллина, креатина и креатинина, цистатиона, цистина, карнитина, гидроксипролина, цистеина, диметилглицина, АМФ, ТМФ, цитозина, лейцина, изолейцина, гистамина, гомоцистина, 5-глутамилцистеина, 2-кетоглутаровой, яблочной, и изолимонной, пировиноградной, молочной, мочевой, фумаровой и пантотеновой кислот, SAH, ацетилкарнитина, холевой кислоты, серотонина, дофамина, никотирамида, гипоксантина (таблица 5). Наблюдаемое значительное увеличение содержания креатина и креатинина в метаболомных профилях умерших пациентов по сравнению с выжившими свидетельствует о развитии почечной дисфункции [17].

Максимальные различия в метаболических профилях между выжившими и умершими пациентами зафиксированы для цистина, цистеина и диметилглицина. Снижение уровня диметилглицина у пациентов с неблагоприятным течением COVID-19 отмечено также Silvagno F, et al. [24].

Падение уровней глутатиона наблюдали [24, 25] при заболеваниях, повышающих риск COVID-19, а возникающий дефицит глутатиона связывали с тяжестью протекания и смертью у пациентов с COVID-19. В нашем исследовании корреляции уровней глутатиона с развитием ЦШ или летальными исходами не наблюдалось, но установлена корреляция с цистином и цистеином — продуктами катаболизма глутатиона. Увеличение уровней цистина и цистеина в плазме пациентов с COVID-19 при усилении тяжести инфекции (от средней к тяжелой форме протекания инфекции) было зафиксировано также в работе [26]. L-цистин образуется во внеклеточном пространстве из восстановленного глутатиона, функционирует как общий маркер инфекции и может служить индикатором выработки глутатиона и активности его цикла в условиях окислительного стресса [24, 26].

О дисбалансе цистина и цистеина в зависимости от тяжести заболевания COVID-19, иммунной активности и наличия сопутствующих заболеваний также сообщалось Pérez-Franco JC [27]. Отмечается, что уровни цистина имеют решающее значение для борьбы с активными формами кислорода при COVID-19, а также при некоторых злокачественных новообразованиях. Корреляция уровня цистина с уровнями аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы у пациентов с тяжелой формой COVID-19 может указывать на потенциальное участие печени в метаболизме цистеина и цистина при COVID-19, что может быть вероятным, поскольку этот орган является основным местом синтеза глутатиона и часто поражается при тяжелой форме COVID-19 [27].

Цистеин/цистин, цистеинилглицин/цистинилглицин и глутатион/глутатиондисульфид являются основными окислительно-восстановительными парами тиол/дисульфидного равновесия во внеклеточной жидкости, являясь биологическим индикатором возрастного снижения системного окислительно-восстановительного потенциала и его метаболического и функционального влияния на ткани, включая легкие [28]. COVID-19 нарушает цистин-цистеиновый цикл клетки и механизмы окислительно-восстановительного гомеостаза внеклеточных тиолов и способствует созданию прооксидантной среды в инфицированной ткани для процесса репликации вируса. Действительно, предпочтительное включение клеточного цистеина в вирусные белки, а не в глутатион клеточных белков наблюдается как общий механизм и при других типах вирусных инфекций [28].

Повышение уровня SAM в метаболомных профилях пациентов с высоким значением индекса

коморбидности можно рассматривать как маркер риска поражения легких у больных COVID-19 и, возможно, как фактор, связанный с развитием воспалительного процесса, т.к. SAM и SAH являются индикаторами глобального трансметилирования и могут играть важную роль в качестве маркеров тяжести COVID-19 [29].

В литературе отмечается возможная специфичная для пола связь с тяжестью протекания и клиническими исходами при COVID-19 [30]. Отмечается, что мужчины имеют более высокий риск тяжелой формы заболевания COVID-19. Считается, что основным фактором, ответственным за это, является кинуреновая кислота (KK) — эндогенный лиганд арильного углеводородного рецептора (AhR). KK положительно связана с иммунными маркерами, особенно у мужчин, и отрицательно связана с количеством Т-клеток. При этом у женщин с COVID-19 наблюдали более сильную активацию Т-клеток, чем у мужчин. Стоит отметить, что активированный AhR является главным регулятором иммунных реакций и воспаления. Изменения в пути AhR опосредуют дифференциальный иммунный ответ у мужчин, особенно потому, что этот путь ингибируется тестостероном, уровень которого снижается у пожилых лиц мужского пола. Это согласуется с повышенной уязвимостью здоровых пожилых мужчин к активации AhR эндогенными соединениями. Сахарный диабет 2 типа и ожирение повышают активность лиганда AhR, а также увеличивают риск заражения COVID-19. При наличии обоих этих факторов возрастает риск цитокинового шторма в результате COVID-19 у пожилых мужчин. Таким образом, различия в иммунном ответе между полами связывают с метаболизмом кинуренина и KK. В нашем исследовании на основании моделей логистической регрессии среди соединений, на концентрацию которых оказывал влияние пол пациента, были выделены креатин ($p<0,001$), креатинин ($p<0,001$), кинуренин ($p<0,001$), аланин ($p=0,025$), глицин ($p=0,049$) и серин ($p=0,045$).

Заключение

Согласно полученным результатам, наиболее ассоциированными с тяжестью протекания COVID-19 являются кинуренин, фенилаланин, цитруллин, треонин, креатин и креатинин. Максимальное различие в метаболомных профилях между выжившими и умершими пациентами отмечалось для цистина, цистеина и диметилглицина. Влияние коморбидности сказывалось на уровнях серина, цитидина, цитидинмонофосфата и SAH, а пол пациентов оказывал влияние на уровни аланина, глицина и серина.

Резюмируя полученные результаты, следует отметить, что COVID-19 оказывает наибольшее влияние на метаболические пути, связанные с метаболизмом аминокислот и соединений, входящих в цикл трикарбоновых кислот (лимонная, изолимонная и оротовая кислоты). Возникающее вследствие это-

го нарушение клеточного метаболизма аминокислот приводит к нарушению множества физиологических процессов и может быть одним из критических механизмов, лежащих в основе патогенеза COVID-19.

Насколько известно, это первое метаболомное исследование, проведенное с использованием биобанка со значительной выборкой пациентов из Санкт-Петербурга и Ленинградской области (РФ). Настоящее исследование стало возможным бла-

годаря наличию биобанка в структуре СПб ГБУЗ "Городская больница № 40", что позволило своевременно получить и сохранить нужные образцы и объемы крови пациентов, а в затем сформировать оптимальные для исследования когорты пациентов.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

- Chen X, Gu M, Li T, et al. Metabolite reanalysis revealed potential biomarkers for COVID-19: a potential link with immune response. *Future Microbiol.* 2021;16:577-88. doi:10.2217/fmb-2021-0047.
- Mierzchala-Pasierb M, Lipinska-Gediga M, Fleszar MG, et al. Altered profiles of serum amino acids in patients with sepsis and septic shock — Preliminary findings. *Arch Biochem Biophys.* 2020;30:691:108508. doi:10.1016/j.abb.2020.108508.
- Costanzo M, Caterino M, Fedele R, et al. COVIDomics: The Proteomic and Metabolomic Signatures of COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022;22(23):2414. doi:10.3390/ijms23052414.
- Beloborodova NV, Olenin AY, Pautova AK. Metabolomic findings in sepsis as a damage of host-microbial metabolism integration. *J Crit Care.* 2018;43:246-55. doi:10.1016/j.jcrr.2017.09.014.
- Wan S, Xiang Y, Fang W, et al. Clinical features and treatment of COVID-19 patients in northeast Chongqing. *J Med Virol.* 2020;92(7):797-806. doi:10.1002/jmv.25783.
- Atila A, Alay H, Yaman ME, et al. The serum amino acid profile in COVID-19. *Amino Acids.* 2021;53(10):1569-88. doi:10.1007/s00726-021-03081-w.
- Whittaker A, Anson M, Harky A. Neurological Manifestations of COVID-19: A systematic review and current update. *Acta Neurol Scand.* 2020;142(1):14-22. doi:10.1111/ane.13266.
- Synakiewicz A, Stanislawski-Sachadyn A, Sawicka-Zukowska M, et al. Plasma free amino acid profiling as metabolomic diagnostic and prognostic biomarker in pediatric cancer patients: a follow-up study. *Amino Acids.* 2021;53(1):133-8. doi:10.1007/s00726-020-02910-8.
- Philips AM, Khan N. Amino acid sensing pathway: a major check point in the pathogenesis of obesity and COVID-19. *Obes Rev.* 2021;22(4):e13221. doi:10.1111/obr.13221.
- Rees CA, Rostad CA, Mantus G, et al. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021;118(25):e2101708118. doi:10.1073/pnas.2101708118.
- Paez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernandez VA, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2021;11(1):6350. doi:10.1038/s41598-021-85788-0.
- Song JW, Lam SM, Fan X, et al. Omics-driven systems interrogation of metabolic dysregulation in covid-19 pathogenesis. *Cell Metab.* 2020;32:1-15. doi:10.1016/j.cmet.2020.06.016.
- Barberis E, Timo S, Amede E, et al. Large-Scale Plasma Analysis Revealed New Mechanisms and Molecules Associated with the Host Response to SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8623. doi:10.3390/ijms21228623.
- Danlos FX, Grajeda-Iglesias C, Durand S, et al. Metabolomic analyses of COVID-19 patients unravel stage-dependent and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* 2021;12(3):258. doi:10.1038/s41419-021-03540-y.
- Caterino M, Costanzo M, Fedele R, et al. The Serum Metabolome of Moderate and Severe COVID-19 Patients Reflects Possible Liver Alterations Involving Carbon and Nitrogen Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9548. doi:10.3390/ijms22179548.
- Shen B, Yi X, Sun Y, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell.* 2020;182(1):59-72. e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.032.
- Thomas T, Stefanoni D, Reisz JA, et al. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight.* 2020;5(14):e140327. doi:10.1172/jci.insight.140327.
- Ceballos FC, Virseda-Berdices A, Resino S, et al. Metabolic Profiling at COVID-19 Onset Shows Disease Severity and Sex-Specific Dysregulation. *Front. Immunol.* 2022;13:925558. doi:10.3389/fimmu.2022.925558.
- Valdés A, Moreno LO, Rello SR, et al. Metabolomics study of COVID-19 patients in four different clinical stages. *Sci Rep.* 2022;12(1):1650. doi:10.1038/s41598-022-05667-0.
- Maltais-Payette I, Lajeunesse-Trempe F, Pibarot P, et al. Association between Circulating Amino Acids and COVID-19 Severity. *Metabolites.* 2023;13(2):201. doi:10.3390/metabo13020201.
- Ozturk A, Bayraktar N, Bayraktar M, et al. Evaluation of amino acid profile in serum of patients with Covid-19 for providing a new treatment strategy. *J Med Biochem.* 2022;41(4):526-33. doi:10.5937/jomb0-37514.
- Stanifer ML, Kee C, Cortese M, et al. Critical Role of Type III Interferon in Controlling SARS-CoV-2 Infection in Human Intestinal Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2020;32(1):107863. doi:10.1016/j.celrep.2020.107863.
- Danchin A, Marlière P. Cytosine drives evolution of SARS-CoV-2. *Environ Microbiol.* 2020;22(6):1977-85. doi:10.1111/1462-2920.15025.
- Perla-Kaján J, Jakubowski H. COVID-19 and One-Carbon Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(8):4181. doi:10.3390/ijms23084181.
- Silvagno F, Vernone A, Pescarmona GP. The Role of Glutathione in Protecting against the Severe Inflammatory Response Triggered by COVID-19. *Antioxidants.* 2020;9(7):624. doi:10.3390/antiox9070624.
- Bramer LM, Hontz RD, Eisfeld AJ, et al. Multi-omics of NET formation and correlations with CNDP1, PSPB, and L-cystine levels in severe and mild COVID-19 infections. *Heliyon.* 2023;9(3):e13795. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13795.
- Paez-Franco JC, Maravillas-Montero JL, Mejía-Domínguez NR, et al. Metabolomics analysis identifies glutamic acid and cystine imbalances in COVID-19 patients without comorbid conditions. Implications on redox homeostasis and COVID-19 pathophysiology. *PLoS One.* 2022;17(9):e0274910. doi:10.1371/journal.pone.0274910.
- Galli F, Marcantonini G, Giustarini D, et al. How Aging and Oxidative Stress Influence the Cytopathic and Inflammatory Effects of SARS-CoV-2 Infection: The Role of Cellular Glutathione and Cysteine Metabolism. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(7):1366. doi:10.3390/antiox11071366.
- Kryukov EV, Ivanov AV, Karpov VO, et al. Plasma S-Adenosylmethionine Is Associated with Lung Injury in COVID-19. *Dis Markers.* 2021;2021:7686374. doi:10.1155/2021/7686374.
- Cai Y, Kim DJ, Takahashi T, et al. Kynurenine acid may underlie sex-specific immune responses to COVID-19. *Sci Signal.* 2021;14:eabf8483. doi:10.1126/scisignal.abf8483.