

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Применение генных сетей к анализу результатов метаболомного скрининга плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием

В.А. Иванисенко^{1, 2, 7 *}, Н.В. Басов^{2, 3 *}, А.А. Макарова¹, А.С. Вензель^{1, 7}, А.Д. Рогачев^{2, 3} ✉, П.С. Деменков^{1, 2, 7}, Т.В. Иванисенко^{1, 2, 7}, М.А. Клещев¹, Е.В. Гайслер^{2, 3}, Г.Б. Мороз⁴, В.В. Плеско⁴, Ю.С. Сотникова^{2, 3, 5}, Ю.В. Патрушев^{2, 5}, В.В. Ломиворотов^{4, 6}, Н.А. Колчанов^{1, 2}, А.Г. Покровский²

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

⁶ Медицинский центр им. Милтона Херши, Херши, Пенсильвания, США

⁷ Курчатowski геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ rogachev@nioch.nsc.ru

Аннотация. Послеоперационный делирий (ПОД) является серьезным осложнением, приводящим к нарушению когнитивных функций пациентов, увеличению длительности госпитализации, а также повышению расходов на лечение пациента. Проблема ранней диагностики ПОД приобретает особую важность в случае кардиохирургических операций, поскольку частота развития такого осложнения у некоторых категорий пациентов превышает 50 %. Известно, что в развитие ПОД большой вклад вносят нейровоспаление, дисбаланс нейромедиаторов, нарушение нейроэндокринной регуляции и межнейронных связей, однако молекулярно-генетические механизмы ПОД у пациентов, перенесших кардиохирургические операции, а также метаболомные диагностические маркеры, до сих пор плохо изучены. В данной работе с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) был проведен анализ содержания ряда сфингомиелинов в плазме крови пациентов старше 65 лет, взятой после операции на сердце в условиях искусственного кровообращения. Найдено четыре статистически значимо различающихся по содержанию сфингомиелина у пациентов с ПОД по сравнению с пациентами, у которых не развился ПОД (контрольная группа). С помощью реконструкции генных сетей, описывающих генетическую регуляцию пути метаболизма сфинголипидов, определены 82 регуляторных белка, из которых 47 – регуляторы экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболического пути, и 35 – регуляторы активности, деградации и транспорта ферментов данного пути. Анализ перепредставленности заболеваний, с которыми ассоциированы эти регуляторные белки, показал, что регуляторы можно разбить на две группы, ассоциированные с сердечно-сосудистыми патологиями и с нервно-психическими заболеваниями соответственно. Регуляторы, ассоциированные с сердечно-сосудистыми патологиями, ожидаемо связаны с воздействием на ткани миокарда во время операции. Сделано предположение, что нарушение функции регуляторов, ассоциированных с нервно-психическими заболеваниями, может специфически обуславливать развитие ПОД после кардиохирургической операции. Таким образом, выявленные регуляторные гены могут представлять основу для планирования дальнейших экспериментов по изучению нарушений на уровне экспрессии данных генов, а также нарушения функции кодируемых ими белков у пациентов с ПОД. Идентифицированные значимые сфинголипиды могут рассматриваться как потенциальные маркеры послеоперационного делирия. Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; метаболомика; липидомика; послеоперационный делирий; кардиохирургия; биомаркеры; сфинголипиды; генные сети; ANDSystem.

Для цитирования: Иванисенко В.А., Басов Н.В., Макарова А.А., Вензель А.С., Рогачев А.Д., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Клещев М.А., Гайслер Е.В., Мороз Г.Б., Плеско В.В., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Ломиворотов В.В., Колчанов Н.А., Покровский А.Г. Применение генных сетей к анализу результатов метаболомного скрининга плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023; 27(7):768-775. DOI 10.18699/VJGB-23-89

Gene networks for use in metabolomic data analysis of blood plasma from patients with postoperative delirium

V.A. Ivanisenko^{1, 2, 7 *}, N.V. Basov^{2, 3 *}, A.A. Makarova¹, A.S. Venzel^{1, 7}, A.D. Rogachev^{2, 3} ✉, P.S. Demenkov^{1, 2, 7}, T.V. Ivanisenko^{1, 2, 7}, M.A. Kleshchev¹, E.V. Gaisler^{2, 3}, G.B. Moroz⁴, V.V. Plesko⁴, Y.S. Sotnikova^{2, 3, 5}, Y.V. Patrushev^{2, 5}, V.V. Lomivorotov^{4, 6}, N.A. Kolchanov^{1, 2}, A.G. Pokrovsky²

© Иванисенко В.А., Басов Н.В., Макарова А.А., Вензель А.С., Рогачев А.Д., Деменков П.С., Иванисенко Т.В., Клещев М.А., Гайслер Е.В., Мороз Г.Б., Плеско В.В., Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Ломиворотов В.В., Колчанов Н.А., Покровский А.Г., 2023

* Авторы внесли равный вклад в работу.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ E. Meshalkin National Medical Research Center of the Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁵ Borekov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁶ Penn State Health Milton S. Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA

⁷ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 rogachev@nioch.nsc.ru

Abstract. Postoperative delirium (POD) is considered one of the most severe complications, resulting in impaired cognitive function, extended hospitalization, and higher treatment costs. The challenge of early POD diagnosis becomes particularly significant in cardiac surgery cases, as the incidence of this complication exceeds 50 % in certain patient categories. While it is known that neuroinflammation, neurotransmitter imbalances, disruptions in neuroendocrine regulation, and interneuronal connections contribute significantly to the development of POD, the molecular, genetic mechanisms of POD in cardiac surgery patients, along with potential metabolomic diagnostic markers, remain inadequately understood. In this study, blood plasma was collected from a group of patients over 65 years old after cardiac surgery involving artificial circulation. The collected samples were analyzed for sphingomyelin content and quantity using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS/MS) methods. The analysis revealed four significantly different sphingomyelin contents in patients with POD compared to those who did not develop POD (control group). Employing gene network reconstruction, we perceived a set of 82 regulatory enzymes affiliated with the genetic coordination of the sphingolipid metabolism pathway. Within this set, 47 are assumed to be regulators of gene expression, governing the transcription of enzymes pivotal to the metabolic cascade. Complementing this, an additional assembly of 35 regulators are considered to be regulators of activity, degradation, and translocation dynamics of enzymes integral to the aforementioned pathway. Analysis of the overrepresentation of diseases with which these regulatory proteins are associated showed that the regulators can be categorized into two groups, associated with cardiovascular pathologies (CVP) and neuropsychiatric diseases (NPD), respectively. The regulators associated with CVP are expectedly related to the effects on myocardial tissue during surgery. It is hypothesized that dysfunction of NPD-associated regulators may specifically account for the development of POD after cardiac surgery. Thus, the identified regulatory genes may provide a basis for planning further experiments, in order to study disorders at the level of expression of these genes, as well as impaired function of proteins encoded by them in patients with POD. The identified significant sphingolipids can be considered as potential markers of POD.

Key words: LC-MS/MS; metabolomics; lipidomics; postoperative delirium; cardiac surgery; biomarkers; sphingolipids; gene networks; ANDSystem.

For citation: Ivanisenko V.A., Basov N.V., Makarova A.A., Venzel A.S., Rogachev A.D., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kleshchev M.A., Gaisler E.V., Moroz G.B., Plesko V.V., Sotnikova Y.S., Patrushev Y.V., Lomivorotov V.V., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G. Gene networks for use in metabolomic data analysis of blood plasma from patients with postoperative delirium. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):768-775. DOI 10.18699/VJGB-23-89

Введение

Послеоперационный делирий (ПОД) – серьезное осложнение раннего послеоперационного периода. В сердечно-сосудистой хирургии его частота составляет 52 % (Brown, 2014). Развитие ПОД приводит к ухудшению прогноза, в том числе к увеличению длительности госпитализации, росту количества осложнений и летальности, нарушению когнитивных функций и физического состояния, а также повышению расходов на лечение пациента (Pisani et al., 2009; Gottesman et al., 2010). Делирий и послеоперационные когнитивные нарушения чаще всего возникают у пациентов старше 60 лет (Morigimoto et al., 2009). Этому способствуют такие факторы, как гипоксия ЦНС, эмболии, выброс нейротрансмиттеров, системный воспалительный ответ и другие нарушения, включая метаболические (Wimmer-Greinecker et al., 1998; Cerejeira et al., 2010).

Метаболомика – это направление в биоаналитической химии, связанное с идентификацией и количественным определением низкомолекулярных метаболитов (<1500 Да). Метаболомный подход может быть использован для поиска ассоциаций между метаболическими сигнатурами и фенотипами заболеваний. В частности, метаболомные методы позволяют детектировать низкомолекулярные метаболиты, способные пересекать гематоэнцефалический барьер, что делает метаболомный анализ мощным ин-

струментом для выявления маркеров делирия (Ke et al., 2019). Так, в ряде работ было показано, что нарушения энергетического метаболизма, биосинтеза аминокислот, дефицит омега-3 и омега-6 жирных кислот, а также дисфункция глутамат-глутаминового цикла связаны с послеоперационным делирием при несердечных операциях (Guo et al., 2019; Tripp et al., 2021).

Ранее в наших исследованиях применялись методы метаболомного скрининга и реконструкции генных сетей для поиска биомаркеров патологий. Так, с помощью статистического анализа метаболомных профилей цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и плазмы крови пациентов с глиомой высокой степени злокачественности, полученных с применением метода ВЭЖХ-МС/МС, нами обнаружены корреляции метаболомных профилей плазмы крови и ЦСЖ (Rogachev et al., 2021). Метаболомный анализ в сочетании с реконструкцией генных сетей с применением ANDSystem для интерпретации метаболомных данных (Ivanisenko V.A. et al., 2015, 2019; Ivanisenko T.V. et al., 2020, 2022) позволил установить ключевые белки SARS-CoV-2, взаимодействия которых с белками человека могли приводить к нарушению метаболических процессов у пациентов с COVID-19 (Ivanisenko V.A. et al., 2022).

Сфингомиелины являются одними из основных фосфолипидов, составляющих гидрофобный матрикс плазма-

тических мембран клеток млекопитающих, однако в ответ на стресс сфингомиелины могут расщепляться сфингомиелиназой на фосфатидилхолин и церамид, которые выполняют сигнальную функцию. Изменения в метаболизме сфингомиелинов могут влиять на баланс нейромедиаторов в мозгу, нарушение нейронных связей и индукцию нейровоспаления, что делает их важным объектом для изучения механизмов патогенеза делирия (Wang, Shen, 2018; Xiao et al., 2023).

В настоящей работе с помощью ВЭЖХ-МС/МС был проведен анализ содержания девяти фосфолипидов, относящихся к классу сфингомиелинов, в плазме крови пациентов, перенесших операцию на сердце. Найдено четыре статистически значимо различающихся сфингомиелина по содержанию у пациентов с ПОД по сравнению с пациентами, у которых не развился ПОД (контрольная группа).

Для объяснения возможных механизмов нарушений метаболизма сфинголипидов с помощью ANDSystem нами были реконструированы генные сети, описывающие генетическую регуляцию пути KEGG Sphingolipid metabolism (hsa: 00600). Анализ генных сетей позволил выявить 35 регуляторов транспорта, активности и деградации ферментов данного пути, а также 47 регуляторов экспрессии генов, кодирующих эти ферменты.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование были включены пациенты старше 65 лет, которым проводилась кардиохирургическая операция в условиях искусственного кровообращения. Критериями исключения были: экстренное вмешательство, операция на аорте, гемодинамически значимые стенозы сонных артерий, болезнь Паркинсона, цирроз печени (Чайлд В или С), прием антихолинергических препаратов, антидепрессантов, противоэпилептических и химиотерапевтических препаратов. Набор пациентов осуществлялся с июня 2019 г. по январь 2021 г. Всего в исследование было включено 39 пациентов (половозрастная характеристика представлена в табл. 1). В течение 5 дней после операции пациенты оценивались на наличие послеоперационного делирия при помощи теста CAM-ICU (Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit). Первый тест проводился через 6–8 ч после операции, далее – два раза в сутки. Наличием делирия считалось, если тест CAM-ICU был положительным хотя бы один раз.

Исследование одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра им. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия).

Отбор образцов крови и пробоподготовка. Образцы крови были взяты у пациентов через 24 ч после проведения кардиохирургической операции. Венозную кровь собирали в пробирки BD Vacutainer® KEDTA объемом 10 мл, содержащие ЭДТА калия в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли от клеток крови центрифугированием в течение 15 мин при 2000 г и 4 °С, разделяли на аликвоты и хранили в замороженном виде при –80 °С до дальнейшего использования.

Все образцы обрабатывали одновременно в соответствии с протоколом, описанным в работе (Li et al., 2017): к 100 мкл плазмы крови прибавляли 400 мкл охлажденной

Таблица 1. Половозрастная характеристика пациентов

Группа	Пол (М/Ж)	Возраст, лет				
		мин.	макс.	средний	медиана	станд. отклон.
Контроль	11/16	65	75	69.6	70	3.0
ПОД	5/7	65	79	69.7	69.5	4.3

смеси метанола и ацетонитрила (1:1). Образцы встряхивали на шейкере, затем центрифугировали 15 мин при +4 °С и 16000 об/мин. Супернатант переносили в стеклянную вставку для виалы и анализировали. По той же методике готовили два образца контроля качества, полученных путем смешивания равных объемов образцов плазмы крови от пациентов с ПОД и группы контроля.

Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС проводили на хроматографе Shimadzu LC-20AD Prominence, оснащенный градиентным насосом, автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония), термостатируемым при 10 °С, и термостатом для колонок CTO-10ASvp с температурой 35 °С. Хроматографическое разделение выполняли на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола (Basov et al., 2024). Монолитный материал синтезировали в стеклянных трубках с внутренним диаметром 2 мм, как описано ранее (Patrushev et al., 2020). В качестве подвижной фазы А был взят водный 20 мМ раствор карбоната аммония, доведенный до pH = 9.8 25%-м водным раствором аммиака и содержащий 5 об. % ацетонитрила; подвижной фазой Б служил чистый ацетонитрил. Градиент элюирования был следующим: 0 мин – 0 % Б, 1 мин – 0 % Б, 6 мин – 98 % Б, 16 мин – 98 % Б, после чего колонка уравнивалась в течение 3 мин. Скорость потока составляла 300 мкл/мин, объем пробы – 2 мкл.

Детекцию метаболитов проводили на масс-спектрометре API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенный источником электрораспылительной ионизации, работающим в режиме положительной ионизации. Метаболиты детектировали в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM).

Основные масс-спектрометрические параметры были следующими. Напряжение на источнике ионов 5500 В. Температура газа-осушителя 475 °С, давление газа CAD – «высокое», давление газа GS1, GS2 и газа завесы – 33, 33 и 30 psi соответственно. Потенциал декластеризации (DP) составлял 91 В, потенциал входа (EP) – 10 В, а потенциал выхода из ячейки соударений (СХР) – 10 В. Переходы ионов-предшественников и фрагментных ионов, названия метаболитов, время пребывания и соответствующие энергии столкновений представлены в Приложении S1¹. Управление прибором и сбор информации осуществлялись с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX, Фремингем, США). Хроматограммы обрабатывали в программе MultiQuant 2.1 (AB SCIEX).

Предварительная обработка и статистический анализ данных. Исходные данные были предварительно обработаны для заполнения пропущенных значений со-

¹ Приложения S1–S10 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx24.xlsx>

держания метаболитов в анализируемых пробах следующим образом. В случае, если число проб с пропусками не превышало 5 % от общего числа по 39 пациентам, в качестве значения содержания метаболита бралась медиана, рассчитанная по остальным пробам. Такой подход обусловлен робастностью медианы к выбросам. Статистические различия по содержанию метаболитов в пробах плазмы крови в группе пациентов с ПОД и группе без ПОД оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Реконструкция и анализ генных сетей. Список генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболическом пути Sphingolipid metabolism (ID: hsa00600), был извлечен из базы данных KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>, Kanehisa, 2002; Kanehisa et al., 2022). Реконструкцию регуляторной генной сети осуществляли с использованием программно-информационной системы ANDSystem (Ivanisenko V.A. et al., 2015, 2019; Ivanisenko T.V. et al., 2020, 2022). Работу с базой знаний ANDSystem проводили в программном модуле ANDVisio. Анализ перепредставленности биологических процессов (Gene Ontology) и заболеваний, связанных с белками регуляторной генной сети, выполняли с помощью веб-инструмента DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>, Huang D.W. et al., 2009).

Результаты

Исследование содержания сфинголипидов в плазме крови пациентов с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС

Поскольку нарушение метаболизма сфингомиелинов может вносить вклад в развитие делирия, целью нашего анализа было изучение их роли в осложнении ПОД на основе исследования их содержания в плазме крови пациентов после кардиохирургической операции. В частности, проведен сравнительный анализ экспрессии SM в плазме крови пациентов, перенесших операцию на сердце. Метаболиты данного класса, которые статистически значимо различались по содержанию в пробах, взятых в группе пациентов с ПОД, по сравнению с группой пациентов, у которых не развился ПОД, представлены в табл. 2.

Согласно критерию Манна–Уитни, из девяти анализируемых сфингомиелинов четыре (SM(d18:1/22:2 OH), SM(d18:1/24:0), SM(d18:1/24:1) и SM(d18:1/22:2)) показали статистически значимые (p -value < 0.05) различия между исследуемыми группами пациентов. Мы предположили, что нарушение метаболизма сфинголипидов может быть связано с нарушением метаболического пути их биосинтеза. Для проверки данной гипотезы с помощью программно-информационной системы ANDSystem мы провели реконструкцию и анализ генной сети, описывающей регуляцию экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболического пути KEGG Sphingolipid metabolism, а также регуляцию транспорта, активности и деградации данных ферментов.

Реконструкция регуляторной генной сети

Для реконструкции регуляторной генной сети из базы данных KEGG был извлечен список генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме сфинголипидов Sphingolipid metabolism (hsa00600). Полученный список

Таблица 2. Статистическая значимость различий между группой пациентов с ПОД и контрольной группой по содержанию метаболитов в образцах плазмы крови при сравнении по критерию Манна–Уитни

Метаболит	p -value
SM(d18:1/22:2 OH)	0.0273
SM(d18:1/24:0)	0.0430
SM(d18:1/24:1)	0.0462
SM(d18:1/22:2)	0.0496
SM(d18:1/18:0)	0.0750
SM(d18:1/22:1)	0.1483
SM(d18:1/20:1)	0.3693
SM(d18:1/20:0)	0.5129
SM(d18:1/24:2)	0.5943

содержал 43 гена человека (Приложение S2). Реконструкция графа генной сети проводилась в модуле «Мастер запросов» ANDVisio.

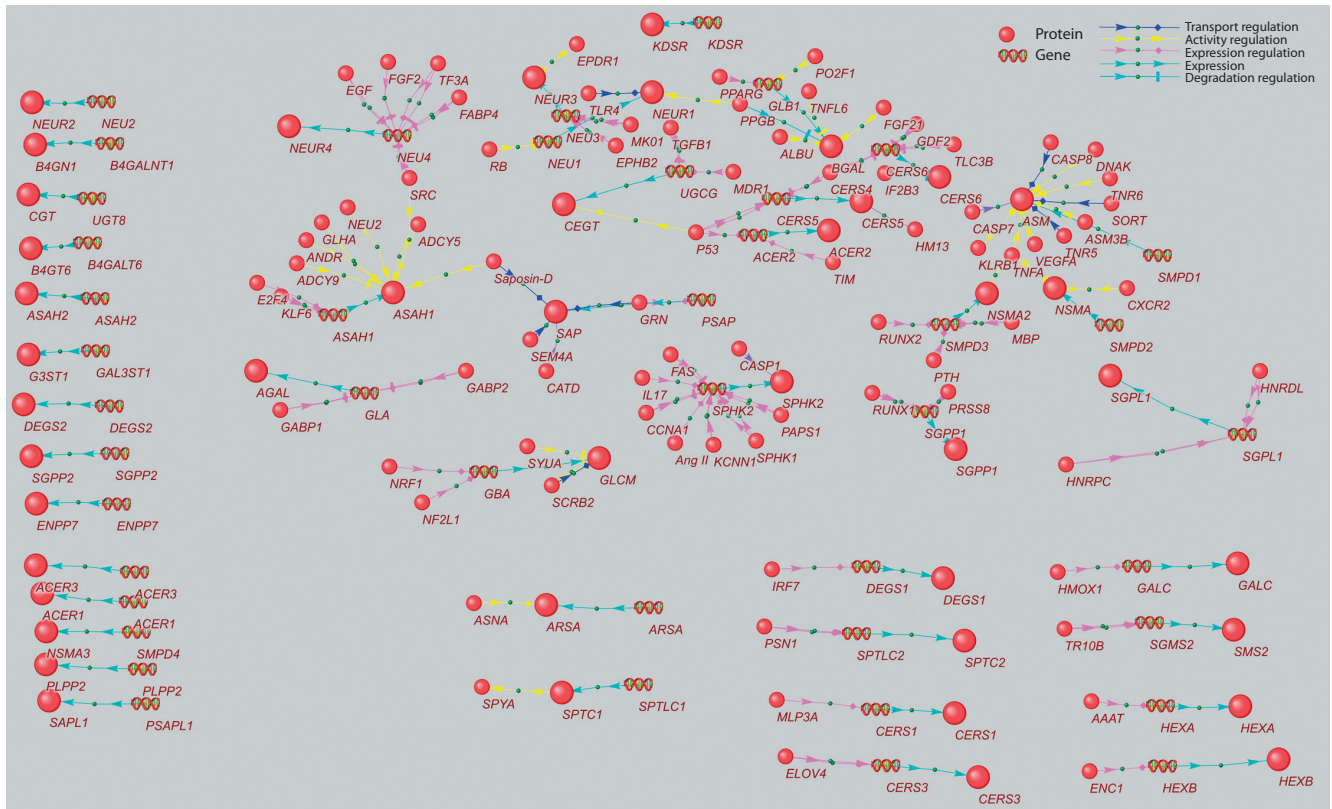
Следует отметить, что в генной сети мы рассматривали только регуляторные связи, направленные от белков-регуляторов к ферментам метаболического пути. Результирующая генная сеть содержала 43 гена человека, 125 белков (43 фермента метаболического пути и 82 регуляторных белка) и 159 взаимодействий между ними (см. рисунок). Различные типы взаимодействий между участниками генной сети были представлены в следующем соотношении: 28 связей, соответствующих типу «регуляция активности», 2 – «регуляция деградации», 4 – «протеолиз», 8 – «регуляция транспорта», 43 – «экспрессия», 74 связи – «регуляция экспрессии».

Чтобы исследовать связи регуляторных белков с патологиями, мы проанализировали перепредставленность заболеваний и биологических процессов Gene Ontology с помощью веб-инструмента DAVID. В качестве входных данных подавался список, состоящих из 82 генов, кодирующих регуляторные белки генной сети. Результаты анализа перепредставленности заболеваний и биологических процессов приведены в Приложениях S3 и S4 соответственно.

Все регуляторные белки, представленные в генной сети (см. рисунок), могут быть разбиты на две группы: 1) регуляторы экспрессии генов и 2) регуляторы активности, стабильности, транспорта и др., которые можно назвать регуляторами функции белков. Для исследования особенностей ассоциированных с ними заболеваний и биологических процессов был проведен анализ перепредставленности отдельно для каждой группы белков (Приложения S5–S8).

Обсуждение

Согласно литературным данным, сфингомиелины (SM) играют важную роль в функционировании нервной системы, и изменение их метаболизма может вносить вклад в развитие делирия путем индукции нейровоспаления, изменения баланса нейромедиаторов и нарушения нейронных связей (Wang, Shen, 2018; Xiao et al., 2023). Про-



Генная сеть регуляции пути метаболизма сфинголипидов.

веденный нами метаболомный анализ с применением ВЭЖХ-МС/МС плазмы крови пациентов, перенесших кардиохирургические операции, позволил выявить четыре из девяти сфингомиелинов, содержание которых статистически значимо отличалось в анализируемых образцах пациентов с ПОД по сравнению с пациентами, у которых ПОД не развился (см. табл. 2).

Для изучения потенциальных механизмов нарушений метаболизма сфинголипидов с помощью ANDSysystem была реконструирована генная сеть (см. рисунок), описывающая регуляцию экспрессии генов и функции кодируемых ими ферментов – участников метаболического пути KEGG «Метаболизм сфинголипидов» (Sphingolipid metabolism, hsa: 00600). Анализ сети показал, что в регуляции метаболического пути участвуют 82 регуляторных белка, нарушение функции которых могло оказывать влияние на нарушение метаболизма сфинголипидов. На основе анализа обогащенности списка генов, кодирующих данные белки, генами, ассоциированными с заболеваниями, было определено 168 статистически значимо перепредставленных заболеваний.

Список заболеваний был разделен на пять групп для удобства представления результатов (табл. 3). Наиболее значимым оказалось заболевание из группы патологий сердечно-сосудистой системы, что, вероятно, обусловлено кардиохирургической операцией, которую перенесли пациенты в связи с патологией сердца. Проведенная операция и медицинские процедуры, такие как искусственное кровообращение, также могут объяснять наличие среди выявленных значимых патологий групп «воспаление»,

«патологии почек» и «оперативное вмешательство» (Stafford-Smith et al., 2008; Squicciarro et al., 2019). По-видимому, эти патологии связаны с обеими группами пациентов (как с ПОД, так и без него) тем, что каждый из них перенес операцию на сердце.

Особый интерес в контексте развития послеоперационного делирия представляет группа патологий «нервно-психические заболевания». В частности, в работе (Huang H. et al., 2022) рассмотрена роль нейровоспаления в развитии послеоперационного делирия. Авторы выделяют нейровоспаление и нарушение ГЭБ как одни из основных патофизиологических факторов возникновения делирия. Связь нервно-психических патологий с ПОД тоже широко обсуждается в научной литературе. Например, O’Sullivan с коллегами предположили, что связь между делирием и депрессивным расстройством может быть обусловлена общими патофизиологическими механизмами, включающими нарушения стрессовых и воспалительных реакций, моноаминовой и мелатонинергической сигнализации (O’Sullivan et al., 2014). Согласно результатам нашего анализа, на молекулярно-генетическом уровне данные патофизиологические механизмы могут затрагивать генетическую регуляцию пути метаболизма сфинголипидов. Список регуляторных генов из генной сети, ассоциированных с группой «нервно-психические заболевания», приведен в Приложении S9.

Статистический анализ перепредставленности биологических процессов Gene Ontology на основе списка регуляторных генов позволил выявить 67 значимых биологических процессов (БП, см. Приложение S4), которые были

Таблица 3. Статистическая значимость перепредставленности заболеваний на основе анализа списка генов-регуляторов

Группа патологий	Количество патологий в группе	Наиболее значимая патология	FDR	Количество генов
Патологии сердечно-сосудистой системы	23	Гипертония	7.7×10^{-6}	12
Патологии почек	8	Острая почечная недостаточность	7.3×10^{-6}	10
Воспалительные процессы	4	Воспаление	7.3×10^{-6}	11
Оперативное вмешательство	2	Повреждение при реперфузии	1.4×10^{-5}	9
Нервно-психические заболевания	26	Депрессивное расстройство	2.1×10^{-4}	12

Примечание. False Discovery Rate (FDR) и количество генов, ассоциированных с патологией, приведены для наиболее статистически значимой патологии.

Таблица 4. Статистическая значимость перепредставленности биологических процессов на основе анализа списка генов-регуляторов

Группа биологических процессов (БП)	Количество БП в группе	Наиболее значимый БП	FDR	Количество генов
Регуляция апоптоза	7	Положительная регуляция апоптоза	4.1×10^{-7}	14
Ответ на стрессовые факторы	3	Клеточный ответ на механический стимул	4.1×10^{-7}	9
Регуляция клеточных сигнальных путей	9	Положительная регуляция активности MAP-киназ	4.0×10^{-7}	9
Регуляция транскрипции	8	Положительная регуляция транскрипции с промотора RNA-pol. II	3.9×10^{-7}	23
Регуляция пролиферации клеток сердечно-сосудистой системы	7	Положительная регуляция ангиогенеза	6.8×10^{-5}	9
Регуляция клеточной пролиферации	3	Положительная регуляция клеточной пролиферации	0.0014	12
Воспалительные процессы	5	Положительная регуляция воспалительного ответа	0.0046	6

Примечание. False Discovery Rate (FDR) и количество генов, ассоциированных с БП, приведены для наиболее статистически значимого БП.

подразделены на семь групп (табл. 4). Среди значимых оказались фундаментальные регуляторные процессы, включающие регуляцию транскрипции, регуляцию пролиферации, активацию клеточных сигнальных путей и др. Такой результат был ожидаем, поскольку участники генной сети являются регуляторами экспрессии генов и функций кодируемых ими ферментов. Анализируемый нами набор регуляторов оказался обогащен генами, вовлеченными в процесс пролиферации клеток сердечно-сосудистой системы (см. табл. 4 и Приложение S10), что можно объяснить активацией восстановительных процессов после оперативного вмешательства. Помимо указанных, выделим более специфически связанные с делирием БП, такие как воспалительные процессы, ответ на стрессовые факторы и регуляция апоптоза (Steiner, 2011; Vutskits, Xie, 2016).

Заметим, что регуляторные связи в генной сети можно разделить на две группы: регуляция экспрессии генов и регуляция функции (активности, деградации и транспорта) белковых продуктов их экспрессии. По этой причине интересен вопрос, существуют ли характерные особенности, связанные с молекулярными механизмами развития делирия, для регуляторов из этих двух отдельно взятых групп. Для поиска ответа мы проанализировали перепредставленности заболеваний и биологических процессов отдельно для регуляторов экспрессии, а также для регуляторов функции белков (см. Приложения S5–S8).

Неожиданным для нас стало, что среди регуляторов функции белков в десятке наиболее значимых патологий оказались нервно-психические заболевания (например,

шизофрения, биполярные расстройства, аутизм), которые, по данным литературы, специфически связаны с делирием (García-Bueno et al., 2016a, b). Интересно, что в литературе обсуждается связь болевого фактора перед операцией с депрессивными симптомами и последующим развитием ПОД (O’Sullivan et al., 2014). При рассмотрении регуляторов экспрессии генов среди значимых патологий преобладала группа патологий сердечно-сосудистой системы, что вполне ожидаемо с учетом анамнеза пациентов. В связи с этим можно предположить особую роль делирия в проявлении патологических механизмов через регуляцию активности белковых продуктов и, в меньшей степени, регуляцию экспрессии генов. Отметим, что в результате анализа перепредставленности БП существенных различий между двумя группами регуляторов не выявлено.

Важной структурной характеристикой графа генных сетей, определяющей особенности их функционирования, является центральность вершин. Один из ее показателей – центральность вершин по степени, которая характеризует отношение количества связей заданной вершины к общему количеству связей в графе и широко применяется в анализе генных сетей. Среди вершин графа, соответствующих ферментам, наибольшим количеством связей (регуляция активности, деградации, транспорта) с регуляторными белками обладал фермент сфингомиелиназа (ASM, см. рисунок). Данный фермент расщепляет сфингомиелины на фосфатидилхолин и церамид, которые выполняют сигнальную функцию. Функция фермента ASM модулировалась десятью регуляторными белками, из которых шесть имели тип связей «регуляция активности»

(ASM3B, Hsp70, KLRB1, TNFA, TNFR6, VEGFA), три белка (CASP8, SORT, TNFR5) – «регуляция транспорта»; также была представлена одна связь с белком CASP7 с типом «протеолиз». Отметим, что среди регуляторных белков присутствовали каспаза-8 (CASP8) и фактор некроза опухоли альфа (TNFA), которые были ассоциированы с перепредставленными заболеваниями, такими как эпилепсия, депрессия, деменция, и другими нервно-психическими заболеваниями. Согласно литературе, CASP8 осуществляет активацию и транслокацию ASM на поверхность плазматической мембраны. В результате активации ASM происходит расщепление сфингомиелинов и образуется церамид, способствующий повышению активности каспазы-8 и индукции апоптоза (Grassmé et al., 2003). Кроме того, известно, что хирургические вмешательства провоцируют проникновение через ГЭБ провоспалительных факторов, в частности интерлейкинов и TNFA, что способствует нейровоспалению и может быть связано с развитием ПОД (Alam et al., 2018). Согласно реконструированной генной сети, TNFA повышает активность фосфомиелиназы (Cogge et al., 2013), а также ассоциирован с перепредставленными нервно-психическими заболеваниями, например депрессией, эпилепсией и др. (см. Приложение S3).

Наибольшим показателем центральности среди вершин графа генной сети, соответствующих генам, обладал ген *SPHK2* (см. рисунок), кодирующий фермент сфингозин киназу 2. В генной сети было представлено семь регуляторов экспрессии данного гена, кодируемых генами *AGT*, *CCNA1*, *FAS*, *IL17A*, *KCNN1*, *SPHK1*, *PAPSS1*. В отличие от вершины, соответствующей белку ASM, среди регуляторов экспрессии *SPHK2* не оказалось таковых, ассоциированных с нервно-психическими заболеваниями. Этот факт еще раз указывает на то, что наиболее важный вклад в нарушение функционирования пути метаболизма сфинголипидов, ассоциированное с послеоперационным делирием, может вносить не регуляция экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболического пути, а нарушение транспорта, активности и стабильности продуктов данных генов. Гены, ассоциированные с другими группами заболеваний, были представлены среди регуляторов экспрессии *SPHK2* (см. Приложение S5). Например, активность синтазы жирных кислот (*FAS*) связана с инфарктом миокарда, гипертонией, диабетом 2-го типа и другими заболеваниями (Nosrati-Oskouie et al., 2021).

Заключение

Комплексный подход, заключающийся в метаболомном анализе плазмы крови у пациентов, перенесших кардиохирургические операции, основанный на ВЭЖХ-МС/МС и биоинформатических методах реконструкции генных сетей ANDSystem, позволил выявить потенциальные маркеры класса сфингомиелинов, а также регуляторные гены, нарушение функции которых может лежать в основе механизмов развития послеоперационного делирия. В результате анализа перепредставленности заболеваний обнаружено, что с данными регуляторными белками ассоциированы в первую очередь нервно-психические заболевания, патологии сердца и почек, воспалительные процессы и оперативное вмешательство. Функция регуляторов, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболе-

ваниями, могла быть нарушена у пациентов с ПОД в связи с перенесенной операцией на сердце и медицинскими процедурами, такими как искусственное кровообращение (Gao et al., 2005). В то же время, поскольку операция на сердце была перенесена всеми испытуемыми, можно ожидать, что изменение функции этих регуляторных белков могло в равной степени повлиять на пациентов обеих групп – с послеоперационным делирием и без него. Поэтому можно предположить, что функция группы регуляторов, ассоциированных с нервно-психическими заболеваниями, могла быть специфически нарушена у пациентов с ПОД, что и обусловило снижение содержания сфинголипидов в плазме крови этих пациентов.

Среди вершин графа генной сети наибольшим показателем центральности обладала вершина с 10 регуляторными связями, соответствующая ферменту ASM (фосфомиелиназа). В числе регуляторов активности и транспорта ASM были найдены белки, кодируемые генами *TNFA*, *CASP8*, *TNFR5*, *VEGFA*, которые ассоциированы с эпилепсией, депрессией и другими нервно-психическими заболеваниями. Среди вершин, соответствующих генам, наибольшим показателем центральности в графе обладал ген *SPHK2* (сфингозин киназа 2). Его экспрессию регулируют семь белков, кодируемых генами *AGT*, *CCNA1*, *FAS*, *IL17A*, *KCNN1*, *SPHK1*, *PAPSS1*.

Предложенные гипотезы о роли регуляторных генов в развитии послеоперационного делирия могут быть использованы при планировании экспериментов транскриптомного и протеомного анализа для изучения молекулярно-генетических механизмов данного осложнения.

Список литературы / References

- Alam A., Hana Z., Jin Z., Suen K.C., Ma D. Surgery, neuroinflammation and cognitive impairment. *EBioMedicine*. 2018;37:547-556. DOI 10.1016/j.ebiom.2018.10.021
- Basov N.V., Rogachev A.D., Aleshkova M.A., Gaisler E.V., Sotnikova Y.S., Patrushev Y.V., Tolstikova T.G., Yarovaya O.I., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole. *Talanta*. 2024;267:125168. DOI 10.1016/j.talanta.2023.125168
- Brown C.H. Delirium in the cardiac surgical intensive care unit. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 2014;27(2):117-122. DOI 10.1097/ACO.000000000000061
- Cerejeira J., Firmino H., Vaz-Serra A., Mukaetova-Ladinska E.B. The neuroinflammatory hypothesis of delirium. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(6):737-775. DOI 10.1007/s00401-010-0674-1
- Corre I., Guillonneau M., Paris F. Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(11):22678-22696. DOI 10.3390/ijms141122678
- Gao L., Taha R., Gauvin D., Othman L.B., Wang Y., Blaise G. Post-operative cognitive dysfunction after cardiac surgery. *Chest*. 2005; 128(5):3664-3670. DOI 10.1378/chest.128.5.3664
- García-Bueno B., Gassó P., MacDowell K.S., Callado L.F., Mas S., Bernardo M., Lafuente A., Meana J.J., Leza J.C. Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 proinflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* 2016a;41(3):E46-E55. DOI 10.1503/jpn.150195
- García Bueno B., Caso J.R., Madrigal J.L., Leza J.C. Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016b;64:134-147. DOI 10.1016/j.neubeh.2016.02.013
- Gottesman R.F., Grega M.A., Bailey M.M., Pham L.D., Zeger S.L., Baumgartner W.A., Selnes O.A., McKhann G.M. Delirium after co-

- ronary artery bypass graft surgery and late mortality. *Ann. Neurol.* 2010;67(3):338-344. DOI 10.1002/ana.21899
- Grassmé H., Cremesti A., Kolesnick R., Gulbins E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene.* 2003; 22(35):5457-5470. DOI 10.1038/sj.onc.1206540
- Guo Y., Li Y., Zhang Y., Fang S., Xu X., Zhao A., Zhang J., Li J.V., Ma D., Jia W., Jiang W. Post-operative delirium associated with metabolic alterations following hemiarthroplasty in older patients. *Age Ageing.* 2019;49(1):88-95. DOI 10.1093/ageing/afz132
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protocols.* 2009;4(1):44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211
- Huang H., Han J., Li Y., Yang Y., Shen J., Fu Q., Chen Y. Early serum metabolite profile of post-operative delirium in elderly patients following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Front. Aging Neurosci.* 2022;14:857902. DOI 10.3389/fnagi.2022.857902
- Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. ANDDigest: a new web-based module of ANDSYSTEM for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics.* 2020;21(Suppl.11):228. DOI 10.1186/s12859-020-03557-8
- Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. The new version of the ANDDigest tool with improved ai-based short names recognition. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(23):14934. DOI 10.3390/ijms232314934
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSYSTEM: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Sys. Biol.* 2015;9(Suppl.2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2
- Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSYSTEM tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics.* 2019; 20(Suppl.1):34. DOI 10.1186/s12859-018-2567-6
- Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Cheresiz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khripko O.P., Khripko Y.I., Voevoda S.M. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of nonstructural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients. *Sci. Rep.* 2022;12(1):19977. DOI 10.1038/s41598-022-24170-0
- Kanehisa M. The KEGG Database. In: 'In silico' Simulation of Biological Processes: Novartis Foundation Symposium. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2002;247:91-103. DOI 10.1002/0470857897.ch8
- Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Sci.* 2022;31(1): 47-53. DOI 10.1002/pro.4172
- Ke C., Pan C.W., Zhang Y., Zhu X., Zhang Y. Metabolomics facilitates the discovery of metabolic biomarkers and pathways for ischemic stroke: a systematic review. *Metabolomics.* 2019;15(12):152. DOI 10.1007/s11306-019-1615-1
- Li K., Naviaux J.C., Bright A.T., Wang L., Naviaux R.K. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics.* 2017;13(10):122. DOI 10.1007/s11306-017-1264-1
- Morimoto Y., Yoshimura M., Utada K., Setoyama K., Matsumoto M., Sakabe T. Prediction of postoperative delirium after abdominal surgery in the elderly. *J. Anesth.* 2009;23(1):51-56. DOI 10.1007/s00540-008-0688-1
- Nosrati-Oskouie M., Aghili-Moghaddam N.S., Sathyapalan T., Sahebkar A. Impact of curcumin on fatty acid metabolism. *Phytother. Res.* 2021;35(9):4748-4762. DOI 10.1002/ptr.7105
- O'Sullivan R., Inouye S.K., Meagher D. Delirium and depression: inter-relationship and clinical overlap in elderly people. *Lancet Psychiatry.* 2014;1(4):303-311. DOI 10.1016/S2215-0366(14)70281-0
- Patrushev Y.V., Sotnikova Y.S., Sidel'nikov V.N. A monolithic column with a sorbent based on 1-vinyl-1,2,4-triazole for hydrophilic HPLC. *Protect. Met. Phys. Chem. Surf.* 2020;56(1):49-53. DOI 10.1134/s2070205119060248
- Pisani M.A., Kong S.Y.J., Kasl S.V., Murphy T.E., Araujo K.L.B., Ness P.H.V. Days of delirium are associated with 1-year mortality in an older intensive care unit population. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2009;180(11):1092-1097. DOI 10.1164/rccm.200904-0537OC
- Rogachev A.D., Alesasov N.A., Ivanisenko V.A., Ivanisenko N.V., Gaisler E.V., Oleshko O.S., Cheresiz S.V., Mishinon S.V., Stupak V.V., Pokrovsky A.G. Correlation of metabolic profiles of plasma and cerebrospinal fluid of high-grade glioma patients. *Metabolites.* 2021;11(3):133. DOI 10.3390/metabo11030133
- Squicciarro E., Labriola C., Malvindi P.G., Margari V., Guida P., Viscicchio G., Kounakis G., Favale A., Dambruso P., Mastroianni G., Lorusso R., Paparella D. Prevalence and clinical impact of systemic inflammatory reaction after cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2019;33(6):1682-1690. DOI 10.1053/j.jvca.2019.01.043
- Stafford-Smith M., Patel U.D., Phillips-Bute B.G., Shaw A.D., Swaminathan M. Acute kidney injury and chronic kidney disease after cardiac surgery. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2008;15(3):257-277. DOI 10.1053/j.ackd.2008.04.006
- Steiner L.A. Postoperative delirium. Part 1: Pathophysiology and risk factors. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2011;28(9):628-636. DOI 10.1097/EJA.0b013e328349b7f5
- Tripp B.A., Dillon S.T., Yuan M., Asara J.M., Vasunilashorn S.M., Fong T.G., Metzger E.D., Inouye S.K., Xie Z., Ngo L.H., Marcantonio E.R., Libermann T.A., Otu H.H. Targeted metabolomics analysis of postoperative delirium. *Sci. Rep.* 2021;11(1):1521. DOI 10.1038/s41598-020-80412-z
- Vutskits L., Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance. *Nat. Rev. Neurosci.* 2016;17:705-717. DOI 10.1038/nrn.2016.128
- Wang Y., Shen X. Postoperative delirium in the elderly: the potential neuropathogenesis. *Aging Clin. Experim. Res.* 2018;30(11):1287-1295. DOI 10.1007/s40520-018-1008-8
- Wimmer-Greinecker G., Matheis G., Brieden M., Dietrich M., Oremek G., Westphal K., Winkelmann B.R., Moritz A. Neuropsychological changes after cardiopulmonary bypass for coronary artery bypass grafting. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998;46(4):207-212. DOI 10.1055/s-2007-1010226
- Xiao M.Z., Liu C.X., Zhou L.G., Yang Y., Wang Y. Postoperative delirium, neuroinflammation, and influencing factors of postoperative delirium: a review. *Medicine.* 2023;102(8):e32991-e32991. DOI 10.1097/MD.00000000000032991

ORCID ID

V.A. Ivanisenko orcid.org/0000-0002-1859-4631
N.V. Basov orcid.org/0000-0001-6390-5796
A.A. Makarova orcid.org/0009-0005-1844-7921
A.S. Venzel orcid.org/0000-0002-7419-5168
A.D. Rogachev orcid.org/0000-0002-3338-8529
P.S. Demenkov orcid.org/0000-0001-9433-8341
T.V. Ivanisenko orcid.org/0000-0002-0005-9155

M.A. Kleshchev orcid.org/0000-0002-7537-2525
G.B. Moroz orcid.org/0000-0002-0154-4662
Y.S. Sotnikova orcid.org/0000-0002-0545-703X
Y.V. Patrushev orcid.org/0000-0002-2078-5488
V.V. Lomivorotov orcid.org/0000-0001-8591-6461
N.A. Kolchanov orcid.org/0000-0001-6800-8787
A.G. Pokrovsky orcid.org/0000-0001-5982-8580

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-23-01068. Авторы также выражают благодарность Центру коллективного пользования «Биоинформатика» за вычислительные ресурсы и их программное обеспечение, созданное в рамках бюджетного проекта FWN-2022-0020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.07.2023. После доработки 12.08.2023. Принята к публикации 24.08.2023.