

Уровни содержания аминокислот в плазме крови, ассоциированные с высоким риском неблагоприятного исхода у больных в критическом состоянии

Алексеева Е. В.

к.м.н, анестезиолог-реаниматолог, ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ, Москва, Российская Федерация, E-mail: aev_69@mail.ru

На сегодняшний день проведены первые метаболомные работы по изучению у больных в критическом состоянии при их госпитализации в отделения реаниматологии (в период начальных 24-72 часов) прогностической значимости уровней содержания широкого спектра низкомолекулярных веществ в отношении функции 28-дневной выживаемости. В настоящем исследовании у 62 пациентов в критическом состоянии (КС) в первые 6 часов при поступлении в отделение реаниматологии (ОР) определены уровни содержания 32 аминокислот в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии. Ретроспективно, в соответствии с 28-дневной выживаемостью в ОР выделены две группы больных: Группа 1 (n=25) – выживших, Группа 2 (n=37) умерших. Аминограммы сопоставлены в группах пациентов и анализированы с применением классических методов статистического анализа (ППП Statistica 12) и метатехнологии интеллектуального анализа данных (приложения Data Mining Statistica 12). Результаты: 1) Исходные аминограммы плазмы крови различны в группах больных, впоследствии выживших и умерших в течение 28-дневного периода. 2) Учет показателей аминограмм при прогнозировании вероятностного исхода повышает точность его определения. 3) Наиболее достоверными предикторами неблагоприятного течения патологического процесса у больных в КС, со стороны аминокислотного состава плазмы крови, являются: измененные, в сравнении с референсными значениями, концентрации цитруллина / отношение шансов (ОШ) =15,3; прогностичность теста – 0,89; специфичность – 0,88) и сниженные уровни глутаминовой кислоты (ОШ = 5,0; прогностичность – 0,82; специфичность – 0,84). Выводы: сокращение срока включения пациентов в исследование позволило выявить более ранние патогенетические механизмы, ведущие к неблагоприятному исходу патологического процесса у больных в критическом состоянии.

Ключевые слова: больные в критическом состоянии, метаболиты, аминокислоты, прогнозирование

Введение

Использование в реаниматологии интеграции молекулярных методов исследований и математического моделирования расширяет возможности изучения механизмов танатогенеза и определения «ранних» биомаркеров, коррелирующих с функцией выживаемости. Почти треть из 187 метаболитов, определенных в плазме крови у больных в первые 24-72 часа с момента поступления их в отделение реаниматологии (ОР), по данным А.А. Rogers и соавт. (2014) были различны у впоследствии выживших и умерших в ОР. [24]. Аналогичные результаты получены Mickiewicz В, (2013) у пациентов детского возраста с септическим шоком. [16]. Однако, представленные работы являются лишь первыми шагами в изучаемой области, и время включения больных в исследования не позволяло учесть метаболиты, возможно обладающие прогностическим потенциалом, но изменяющиеся при проведении лечебных воздействий более быстро. [24].

В связи с ролью аминокислот (АК) в качестве метаболитов и метаболических регуляторов физиологических и патологических процессов, исследования аминокислотного профиля плазмы крови могут служить необходимым инструментом для идентификации молекулярных механизмов, участвующих в развитии критического состояния [27]. К настоящему времени проведено небольшое количество экспериментальных и клинических работ по исследованию изменений аминокислотного спектра крови (включающего 18-23 АК) в условиях развития критического состояния (КС) организма. [15,26,9,12]. И только единичные работы адресованы изучению прогностической значимости уровней содержания отдельных АК (преимущественно: цитруллина и глутамина) в плазме крови. По данным предшествующих исследований с необходимой степенью достоверности можно утверждать о прогностическом характере у реаниматологических больных для сниженных уровней содержания глутамина (в отношении госпитальной смертности) [18,23]. На сегодняшний день, сочетанное использование таких аналитических технологий, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и масс-спектрометрия (МС), делает возможным одновременное и точное определение в биосредах организма человека концентрации тридцати трёх АК [27]. Представляется актуальным изучение уровней содержания всего доступного комплекса аминокислот в плазме крови у больных в критическом состоянии при их поступлении в ОР.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось определение уровней содержания аминокислот плазмы крови у пациентов в критическом состоянии при поступлении в отделение реаниматологии, взаимосвязанных с неблагоприятным исходом в ближайшем периоде времени (в течение 28 дней).

Материалы и методы исследования

У 62 больных при поступлении в отделение общей реаниматологии определены уровни содержания 32 АК в плазме крови. В исследуемую выборку больных вошли 33 женщины, 29 мужчин, 65 (57; 80) лет. У 31/62 (50%) пациентов в развитии критического состояния (КС) иницирующая роль принадлежала заболеваниям «хирургического профиля», абдоминальным и экстраабдоминальным в 20/62 (32 %) и 11/62 (18%), соответственно. У 31/62 (50%) пациентов формирование КС было обусловлено заболеваниями «терапевтического профиля». Преобладали больные с перитонитом, пневмонией, внутримозговыми кровоизлияниями травматической и нетравматической этиологии. Оценка общей тяжести состояния пациентов при поступлении в ОР по шкале APACHE II – 26 (14; 34) балла. Время включения пациентов в исследование – поступление в ОР, время окончания сбора данных – 28 сутки лечения в ОР или более ранние сроки (перевод в

профильное отделение, смерть). Критерии включения больных в исследование: возраст старше 18 лет. Критерии исключения: хронические заболевания, требующие проведения экстракорпоральных методов детоксикации и перевод пациента в ОР другого стационара до окончания сбора данных. Всем больным проведено комплексное обследование и лечение, согласно Федеральным стандартам оказания специализированной медицинской помощи и современным международным рекомендациям. Ретроспективно выделены две группы больных: 1) выживших (n=25) в течение 28 дней в ОР и 2) умерших (n=37) в течение 28 дней в ОР.

У всех больных учитывали:

- 1) Содержание в плазме крови 32 АК, D-димеров, мочевины, креатинина, билирубина, прокальцитонина, лактата; оценку общей тяжести состояния пациента по APACHE II; уровень насыщения гемоглобина кислородом в верхней полой вене, непосредственно над правыми отделами сердца (ScvO₂) – в первые 6 часов с момента поступления в ОР.
- 2) 28-дневную выживаемость в ОР.

Забор венозной крови на содержание АК осуществляли в пробирки с антикоагулянтом K₂-ЭДТА, до проведения энтерального или парентерального питания – поступления АК извне и использования методов экстракорпоральной детоксикации. Непосредственно после забора пробирку с кровью центрифугировали в режиме 2000 g в течение 10 мин. Плазму отделяли и хранили при температуре минус 40° C в течение не более 5 суток до проведения анализа [3]. Лабораторная часть исследования выполнена в научно-лабораторном научном комплексе ХРОМОЛАБ г. Москва. Уровни АК в плазме крови определены методом ВЭЖХ-МС на тройном квадрупольном масс-спектрометрическом детекторе Shimadzu LC-MS 8030 с применением реагентов Chromsystems, и на аминокислотном анализаторе AAA 400 (INGOS). В качестве референсных значений (для взрослого населения, старше 18 лет) приведены диапазоны концентраций аминокислот в плазме крови, используемые в настоящее время в научно-лабораторном комплексе ХРОМОЛАБ, город Москва.

В ходе исследования выполнены. 1. Сравнительный анализ исходного содержания 32 АК в плазме крови в группах пациентов, выживших и умерших в течение 28 дней в ОР. 2. Изучены взаимосвязи показателей аминокислот с неблагоприятным исходом. 3. Проведено сопоставление прогностической значимости (в отношении 28-дневной выживаемости в ОР) изменений содержания аминокислотного спектра крови у больных в КС и наиболее известных маркеров функции выживаемости у больных в КС.

Статистическая обработка данных проведена с применением классических математических методов современного статистического анализа (ППП Statistica 12) и метатехнологий интеллектуального анализа данных (приложений Data Mining Statistica

12). Статистическая мощность исследования > 90%. Пороговый уровень статистической значимости (p) < 0,05, клинической – индивидуально для каждого полученного результата. Использованы непараметрические методы представления и сопоставления данных. Сравнение показателей в двух группах – проведено с помощью U-критерия Манна-Уитни и точного критерия Фишера. Наличие/отсутствие и выраженность взаимосвязей между исследуемыми параметрами оценена по результатам корреляционно-ассоциативного анализа (методу Гамма). Оценка функции выживаемости произведена по методу Каплана-Мейера, сравнение выживаемости в различных подгруппах – посредством F-критерия Кокса. Прогностическая значимость предикторов оценена посредством: прогностичности положительного теста, специфичности теста и отношения шансов (ОШ) неблагоприятного исхода в ОР в течение 28-дневного периода. Зависимость времени жизни от независимых переменных оценивалась по адекватности регрессионных моделей: пропорциональных интенсивностей Кокса, экспоненциальной и нормальной регрессии. В приложении Data Mining использованы: 1) Программа Feature Selection and Variable Screening (выбор признаков и экранирование переменной), позволяющая автоматически выбирать «лучшие» предикторы прогнозируемой переменной. 2) Алгоритмы построения моделей (классификаторов) деревьев решений. 3) Программа «быстрого развёртывания» (Rapid deployment) – для сравнения качества нескольких моделей (классификаторов).

Исследование выполнено с соблюдением международного стандарта этических норм и качества научных исследований – «Надлежащая клиническая практика» («Good Clinical Practice» (ГОСТР 52379-2005)).

Результаты исследования

Сводные данные об исходном содержании 32 АК в плазме крови у пациентов, впоследствии умерших и выживших в течение 28-дневного периода в ОР приведены в Таблицах 1 и 2, соответственно.

Таблица 1. Сводная таблица содержания 32 АК в плазме крови у больных в КС, впоследствии умерших в течение 28-дней в ОР

| № п/п | Исследуемая АК | Концентрация исследуемой АК в плазме крови (мкмоль/л) | | Доля (процент) больных, у которых концентрация исследуемой АК относительно референсных показателей | | |
|-------|----------------------------|---|---------------------------------|--|--------------|------------|
| | | Референсные значения | У больных (n=37) Me(25%;75%) | Не изменена | Снижена | Повышена |
| 1 | Лейцин (LEU) | 74-196 | 80 (55; 90)↓ | 22/37 (59%) | 15/37 (41%) | - |
| 2 | Изолейцин (ILEU) | 35-104 | 45 (37; 56) | 33/37 (89 %) | 3/37 (8 %) | 1/37 (3%) |
| 3 | Гидроксипролин (HPRO) | 0-26 | 10 (2; 11) | 37/37 (100%) | - | - |
| 4 | Серин (SER) | 60-172 | 66 (62; 74) | 32/37 (86 %) | 5/37 (14 %) | - |
| 5 | Аспарагин (ASN) | 31-90 | 40 (32; 44) | 30/37 (81%) | 7/37 (19 %) | - |
| 6 | α-аминоадипиновая(AAA) | 0-1,5 | 0 (0; 0,2) | 37/37 (100%) | - | - |
| 7 | Глутамин (GLN) | 372-876 | 394 (371; 405)↓ | 27/37 (73 %) | 10/37 (27 %) | - |
| 8 | β-аланин(BALA) | 0-5 | 0 (0; 1,03) | 40/37 (100%) | - | - |
| 9 | Таурин(TAU) | 29-136 | 34 (31; 41) | 33/37 (89 %) | 4/37 (11%) | - |
| 10 | Гистидин(HIS) | 57-114 | 62 (59; 77) | 29/37 (78 %) | 8/37 (22 %) | - |
| 11 | Треонин (THRE) | 73-216 | 84 (76; 95) | 35/37(95 %) | 2/37 (5 %) | - |
| 12 | 1-метилгистидин(1MHIS) | 0-12 | 0 (0; 2,4) | 37/37 (100%) | - | - |
| 13 | 3-метилгистидин(3MHIS) | 0-9,8 | 0 (0; 1,3) | 37/37 (100%) | - | - |
| 14 | γ-аминомасляная (GABA) | 0 - 1,5 | 0 (0; 0,016) | 37/37 (100%) | - | - |
| 15 | β-аминоизомасляная (BAIBA) | 0-3,2 | 0 (0; 0,12) | 37/37 (100%) | - | - |
| 16 | α-аминомасляная (AABA) | 0-40 | 0 (0; 11) | 37/37 (100%) | - | - |
| 17 | Пролин(PRO) | 99-363 | 106 (102; 114) | 32/37(86 %) | 5/37(14 %) | - |
| 18 | Цистатинин (CYST) | 0-0,3 | 0,01(0; 0,07) | 36/37(97 %) | - | 1/37(3%) |
| 19 | Лизин(LYS) | 120-318 | 129 (124; 150) | 30/37(81 %) | 7/37 (19 %) | - |
| 20 | Цистин(CYS) | 0,8-30 | 1,5 (0,95; 4,6) | 31/37 (84 %) | 6/37 (16%) | - |
| 21 | Цистеиновая (CYSA) | в норме отсутствует | 0 (0; 0) | 37/37 (100%) | - | - |
| 22 | Аланин(ALA) | 177-583 | 158 (128;238)↓↓ | 16/37 (43 %) | 21/37 (57 %) | - |
| 23 | Аргинин(ARG) | 15-140 | 27 (20; 39) | 33/37 (89 %) | 4/37 (11 %) | - |
| 24 | Аспарагиновая (ASP) | 1-240 | 35 (26; 54) | 37/37 (100%) | - | - |
| 25 | Валин(VAL) | 92-313 | 96 (79; 119)↓ | 23/37(62 %) | 14/37 (38 %) | - |
| 26 | Глицин(GLY) | 122-422 | 117 (87; 156)↓↓ | 16/37(43 %) | 20/37(54 %) | 1/37(3 %) |
| 27 | Глутаминовая (GLU) | 92-497 | 92 (71; 119)↓ | 19/37(52 %) | 18/37(48%) | - |
| 28 | Метионин (MET) | 6-34 | 7,5 (5,3; 12,2)↓ | 24/37(65 %) | 12/37(32 %) | 1/37(3 %) |
| 29 | Орнитин (ORN) | 27-183 | 35 (27; 63) | 29/37 (78 %) | 7/37 (19 %) | 1/37(3 %) |
| 30 | Тирозин(TYR) | 24-96 | 41 (30; 61) | 32/37(86%) | 4/37 (11 %) | 1/37 (3 %) |
| 31 | Фенилаланин (PHE) | 20-87 | 32 (26; 51) | 35/37 (95%) | 2/37 (5%) | - |
| 32 | Цитруллин (CIT) | 16-51 | 14 (7,5; 16,5)↓↓ | 12/37 (32 %) | 24/37(65 %) | 1/37 (3 %) |

Условные обозначения: ↓ - значения показателя в исследуемой выборке снижены относительно референсных показателей более, чем у 25% больных; ↓↓ - значения показателя в исследуемой выборке снижены относительно референсных показателей более, чем у 50% больных; Me (25%; 75%) – медиана и интерквартильный размах (25%-й и 75%-й квартили).

Таблица 2. Сводная таблица содержания 32 АК в плазме крови у больных в КС, впоследствии выживших в течение 28-дней в ОР

| № п/п | Исследуемая АК | Концентрация исследуемой АК в плазме крови (мкмоль/л) | | Доля (процент) больных, у которых концентрация исследуемой АК относительно референсных показателей | | |
|-------|-----------------------------|---|---------------------------------|--|-------------|-----------|
| | | Референсные значения | У больных (n=25) Me(25%;75%) | Не изменена | Снижена | Повышена |
| 1 | Лейцин (LEU) | 74-196 | 86 (77; 99) | 21/25 (84 %) | 4/25 (16 %) | - |
| 2 | Изолейцин (ILEU) | 35-104 | 43 (39; 56) | 23/25 (92 %) | 1/25 (4%) | 1/25 (4%) |
| 3 | Гидроксипролин (HPRO) | 0-26 | 10 (2; 12) | 25/25 (100%) | - | - |
| 4 | Серин (SER) | 60-172 | 68 (65; 78) | 23/25 (92%) | 2/25 (8%) | - |
| 5 | Аспарагин (ASN) | 31-90 | 41 (34; 45) | 25/25 (100%) | - | - |
| 6 | α-аминоадипиновая(AAA) | 0-1,5 | 0,25 (0; 0,56) | 25/25(100%) | - | - |
| 7 | Глутамин(GLN) | 372-876 | 396 (383; 406) | 23/25 (92%) | 2/25 (8%) | - |
| 8 | β-аланин(BALA) | 0-5 | 0,38 (0; 2,2) | 25/25 (100%) | - | - |
| 9 | Таурин(TAU) | 29-136 | 34 (32; 37) | 22/25 (88 %) | 3/25 (12%) | - |
| 10 | Гистидин(HIS) | 57-114 | 65 (60; 69) | 24/25 (96%) | 1/25 (4%) | - |
| 11 | Треонин (THRE) | 73-216 | 85 (79; 98) | 23/25 (92%) | 2/25 (8%) | - |
| 12 | 1-метилгистидин(1MHIS) | 0-12 | 1,0 (0; 2,3) | 25/25(100%) | - | - |
| 13 | 3-метилгистидин(3MHIS) | 0-9,8 | 0,4 (0; 2,9) | 25/25(100%) | - | - |
| 14 | γ-аминомасляная (GABA) | 0 - 1,5 | 0,07 (0; 0,44) | 25/25(100%) | - | - |
| 15 | β-аминоизомасляная (BAIBA) | 0-3,2 | 0,4 (0; 1,1) | 25/25(100%) | - | - |
| 16 | α-аминомасляная (ABA) | 0-40 | 3,7 (0; 11,1) | 25/25(100%) | - | - |
| 17 | Пролин(PRO) | 99-363 | 106 (104; 127) | 24/25 (96%) | 1/25 (4%) | - |
| 18 | Цистатионин (CYST) | 0-0,3 | 0 (0; 0,032) | 25/25(100%) | - | - |
| 19 | Лизин(LYS) | 120-318 | 135 (125; 162) | 23/25 (92%) | 2/25 (8%) | - |
| 20 | Цистин(CYS) | 0,8-30 | 2,4 (1,2; 5,2) | 24/25 (96%) | 1/25 (4%) | - |
| 21 | Цистеиновая (CYSA) | в норме отсутствует | 0 (0; 0) | 25/25(100%) | - | - |
| 22 | Аланин(ALA) | 177-583 | 178 (144;235)↓ | 13/25 (52 %) | 12/25 (48%) | - |
| 23 | Аргинин(ARG) | 15-140 | 30 (20; 58) | 23/25 (92%) | 2/25 (8%) | - |
| 24 | Аспарагиновая кислота (ASP) | 1-240 | 56 (35; 137) | 25/25(100%) | - | - |
| 25 | Валин(VAL) | 92-313 | 111 (93; 126) | 19/25 (76%) | 5/25 (20%) | 1/25 (4%) |
| 26 | Глицин(GLY) | 122-422 | 139 (109; 192)↓ | 18/25 (72%) | 7/25 (28%) | - |
| 27 | Глутаминовая (GLU) | 92-497 | 115 (97; 158) | 21/25 (84%) | 4/25 (16%) | - |
| 28 | Метионин (MET) | 6-34 | 8,2 (5,4; 11,4)↓ | 18/25 (72%) | 7/25 (28%) | - |
| 29 | Орнитин (ORN) | 27-183 | 34 (29; 52) | 23/25 (92%) | 2/25 (8%) | - |
| 30 | Тирозин(TYR) | 24-96 | 44 (35; 62) | 22/25 (88%) | 2/25 (8%) | 1/25 (4%) |
| 31 | Фенилаланин(PHE) | 20-87 | 30 (23; 35) | 25/25 (100%) | - | - |
| 32 | Цитруллин (CIT) | 16-51 | 18 (17; 22) | 22/25 (88%) | 3/25 (12%) | - |

Условные обозначения: ↓- значения показателя в исследуемой выборке снижены относительно референсных показателей более, чем у 25% больных; Me (25%; 75%) – медиана и интерквартильный размах (25%-й и 75%-й квартили).

I. Результаты, полученные с помощью современных классических методов статистического анализа данных

1. В группе умерших больных исходно наблюдались чаще (по точному критерию Фишера), чем в группе выживших: 1) измененные, по отношению к референсным значениям, концентрации цитруллина (в 5,6 раз чаще, $p=0,0001$); 2) сниженные, по отношению к референсным значениям, концентрации: цитруллина (в 5,4 раз чаще, $p=0,0001$); глутаминовой кислоты (в 3 раз чаще; $p=0,007$), лейцина (в 2,5 раза чаще, $p=0,02$), аспарагина (у 19% больных, впоследствии умерших, в группе выживших – во всех случаях были референсные значения, $p=0,04$).
2. В группе умерших больных исходно были ниже (по методу Манна-Уитни) абсолютные концентрации: цитруллина (в среднем на 35%, $p=0,0003$), глутаминовой кислоты (на 25%, $p=0,01$), аспарагиновой кислоты (на 60%, $p=0,01$), α -аминоадипиновой кислоты (в 2,5 раза, $p=0,01$), β -аминоизомасляной кислоты (в 4 раза, $p=0,04$).
3. Выявлена прямая ассоциативная взаимосвязь (по методу Гамма, $p<0,05$) между неблагоприятным исходом в течение 28-дней в ОР и наличием у больных при поступлении в ОР: 1) измененного содержания: цитруллина ($r= 0,877$); глицина ($r= 0,549$); орнитина ($r = -0,525$). 2) сниженных уровней: аспарагина ($r= 1,0$); гистидина ($r = 0,737$); глутаминовой кислоты ($r = 0,665$); цистина – ($r = 0,645$); глутамин ($r= 0,619$); лейцина ($r = 0,563$).
4. Показано снижение функции 28-дневной выживаемости (по F-критерию Кокса) у больных в КС с наличием исходных изменений в плазме крови уровней, следующих АК: 1) цитруллина (как измененного содержания, $p = 0,00003$, так и сниженного содержания, $p=0,00011$); 2) сниженного содержания: глутаминовой кислоты ($p = 0,001$); аспарагина ($p = 0,004$); гистидина ($p = 0,02$); лейцина ($p = 0,03$); цистина ($p = 0,03$) и глутамин ($p = 0,04$); 3) измененного содержания глицина ($p = 0,006$).
5. Статистическим подтверждением наличия причинно-следственной связи между функцией 28-дневной выживаемости больных в ОР и изменениями относительно референсных значений концентрации в плазме 8 вышеописанных АК (цитруллина, глицина, глутаминовой кислоты, лейцина, цистина, аспарагина, гистидина и глутамин) могут служить регрессионные модели: пропорциональных интенсивностей Кокса (Chi-Square: 18,6; $df=8$; $p= 0,01$); экспоненциальной регрессии (Chi-Square: 20,7; $df=8$; $p= 0,007$) и нормальной регрессии (Chi-Square: 18,9; $df=8$; $p= 0,01$).

Таким образом, по результатам проведенного классического статистического анализа, наиболее значимым прогностическим потенциалом в отношении н 28-дневной

смертности в ОР у больных в КС обладают: исходно измененные и сниженные уровни цитруллина и сниженные уровни глутаминовой кислоты в плазме крови. Вероятность неблагоприятного исхода (по отношению шансов, прогностичности и специфичности тестов) в течение 28-дневного периода в ОР выше у больных: 1) с измененными, относительно референсных значений, концентрациями в плазме крови цитруллина (ОШ = 15,3, прогностичность положительного теста 0,89; специфичность 0,88), 2) со сниженными уровнями в плазме крови: цитруллина (ОШ = 13; прогностичность 0,88; специфичность 0,88) и 3) со сниженными уровнями в плазме крови глутаминовой кислоты (ОШ = 4.5, прогностичность 0,82; специфичность 0,84), (Таблица 3).

Таблица 3. Прогностическая значимость наиболее достоверных предикторов

| Исследуемый тест | | Выборки больных, количество больных в выборках (n=) | | Отношение шансов наступления неблагоприятного исхода; ОШ = (a/v)/(c/d) | Прогностичность положительного теста (a/(a+b)) | Специфичность теста d/b+d |
|---------------------------------------|--------------------|---|--|---|--|---------------------------|
| | | Пациенты, впоследствии умершие в течение 28-дней в ОР | Пациенты, впоследствии выжившие в течение 28-дней в ОР | | | |
| «Уровень цитруллина изменен» | Положительный тест | a(n=25) | b(n=3) | 15,3 | 0,89 | 0,88 |
| | Отрицательный тест | c (n=12) | d(n=22) | | | |
| «Уровень цитруллина снижен» | Положительный тест | a (n=24) | b (n=3) | 13, 5 | 0,88 | 0,88 |
| | Отрицательный тест | c (n=13) | d (n=22) | | | |
| «Уровень глутаминовой кислоты снижен» | Положительный тест | a (n=18) | b (n=4) | 5 | 0,82 | 0,84 |
| | Отрицательный тест | c (n=19) | d (n=21) | | | |

Прогностичность положительного результата теста (a/a+b) – в настоящем исследовании вероятность того, что пациент с положительным результатом теста будет действительно иметь неблагоприятный исход в течение 28 дней в ОР. Для измененного относительно референсных значений уровня цитруллина в плазме крови у больных в КС она равна 89%. Это означает, что у 89 пациентов из 100 с положительным тестом («уровень цитруллина в плазме крови изменен»), наступит неблагоприятный исход в течение 28 дней в ОР. Положительный результат теста указывает на нежелательное значение теста, или отклонение от нормы.

Специфичность теста (доля истинно отрицательных результатов = d/b+d) – способность отрицательного теста правильно идентифицировать пациентов с благоприятным прогнозом. Для уровня цитруллина в плазме крови в пределах референсных значений у больных в КС она равна 88%. То есть из 100 больных с благоприятным в последующем прогнозом выживаемости в течение 28 дней в ОР

отрицательный тест («уровень цитруллина в пределах референсных»), способен правильно идентифицировать 84% больных. [4].

II. Результаты, полученные с помощью метатехнологий интеллектуального анализа данных

Известно утверждение, о том, что не следует полагаться на единственный классификатор, «...в одиночку ни один классификатор не в состоянии наделить нас способностями безошибочного принятия решений» [5]. Программа Feature Selection and Variable Screening (выбор признаков и экранирование переменной) в приложении Data Mining Statistica 12. позволяет выбрать произвольное количество «лучших» предикторов прогнозируемой категориальной переменной (исхода лечения больных в КС в течение 28 дней в ОР). В Табл. 4 представлены отобранные, с помощью программы, восемь «лучших» предикторов (уровней АК), с учетом их статистической достоверности. С высокой статистической достоверностью ($p < 0,01$) в качестве значимых предикторов функции 28-дневной выживаемости больных в ОР служат два: изменение относительно референсных показателей в плазме крови цитруллина и снижение глутаминовой кислоты.

Таблица 4. Восемь наиболее информативных показателей содержания АК в плазме крови для прогнозирования 28-дневного исхода в ОР

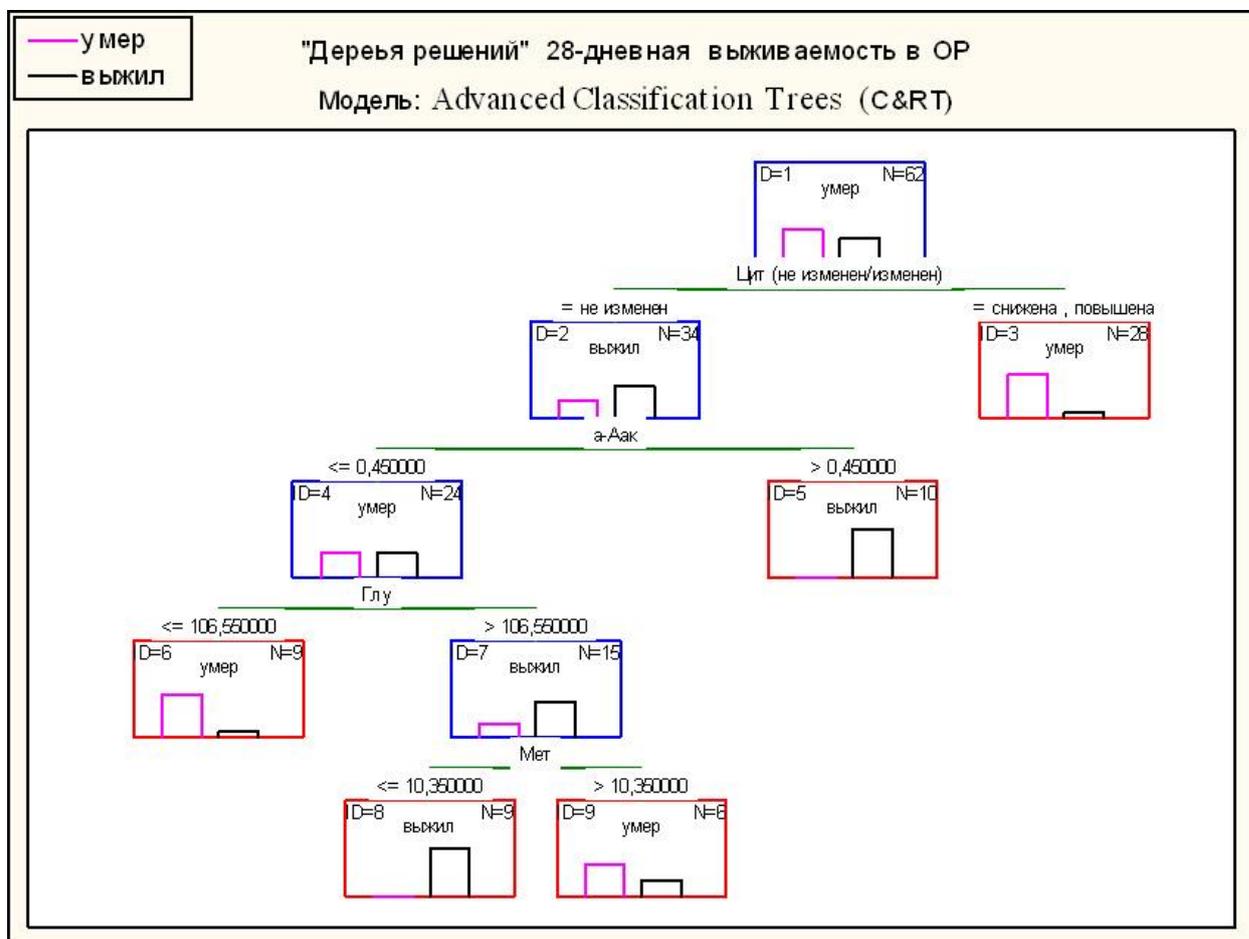
| Исследуемые предикторы (абсолютные уровни аминокислот в плазме крови и изменения или снижение их по отношению к референсным значениям) | Значимость исследуемого предиктора для прогнозируемой переменной – 28-дневного исхода в ОР | |
|---|--|---------|
| | Chi-square | p |
| <i>Цитруллин (изменение)</i> | 18,6 | 0,00008 |
| <i>Глутаминовая кислота (снижение)</i> | 6,9 | 0,008 |
| <i>Цитруллин</i> | 16,7 | 0,01 |
| <i>Аспарагин (снижение)</i> | 5,3 | 0,020 |
| <i>А-аминоадипиновая кислота</i> | 12,8 | 0,025 |
| <i>У-аминомасляная кислота</i> | 12,4 | 0,029 |
| <i>Лейцин (снижение)</i> | 4,2 | 0,03 |
| <i>В-аланин</i> | 13,0 | 0,04 |

Условные обозначения: Аминокислота – абсолютный уровень аминокислоты; Аминокислота (изменение) – наличие изменения уровня содержания аминокислоты по отношению к референсным значениям. Аминокислота (снижение) – наличие снижения уровня содержания аминокислоты по отношению к референсным значениям.

Применив наиболее легко интерпретируемый метод создания классификационных моделей в пакете компьютерных программ Data Mining Statistica 12 – деревья решений и используя его разновидности, были построены четыре модели (классификаторы) зависимости 28-дневной выживаемости больных в КС в ОР от уровня содержания 32 АК в плазме крови: Самый низкий уровень ошибочной классификации (9,6 %, величина стандартной ошибки – 3,7%) был выявлен при работе модели Advanced Classification Trees (C&RT) – «Усовершенствованные деревья решений». Согласно представленной модели (Рис. 1), функция 28-дневной выживаемости больных в КС в ОР, зависит от: исходного

наличия изменения концентрации цитруллина; уровней содержания: а-аминоадипиновой кислоты, глутаминовой кислоты, метионина.

Рисунок 1. «Деревья решений» 28-дневная выживаемость в ОР



Условные обозначения: Цит – цитруллин, а-Аак – а-аминоадипиновая кислота, Глу – глутаминовая кислота, Мет – метионин.

Зависимость 28-дневной выживаемости у больных в ОР от исходного аминокислотного состава плазмы крови (использован алгоритм «Усовершенствованные деревья решений» Advanced Classification Trees (C&RT) приложения Data Minig пакета ППП Statistica1 2).

Итак, в настоящем исследовании с помощью методов классической математической статистики и технологий интеллектуального анализа данных показано достоверное различие функции 28-дневной выживаемости у больных в КС в зависимости от исходного (при поступлении пациентов в ОР) содержания АК в плазме крови. Наиболее значимыми из уровней АК, связанных с высоким риском неблагоприятного исхода больных в КС в течение 28-дневного периода в ОР являются: измененная в сравнении с референсными значениями концентрация в плазме крови цитруллина и сниженный уровень глутаминовой кислоты.

Проведено сопоставление значимости содержания АК в плазме крови у больных в КС для прогнозирования 28-дневной выживаемости в ОР с наиболее известными маркерами риска неблагоприятного исхода. Рассмотрена точность работы (процент ошибок) классификатора – модели Advanced Classification Trees (C&RT) – «усовершенствованные деревья решений», при использовании в роли предикторов *известных маркеров* риска неблагоприятного исхода (таких, как уровень прокальцитонина [28], лактата [7], D-димеров и другие) а также, значения общей тяжести состояния больных по шкале APACHE II [14]; в качестве прогнозируемой переменной – выживаемость больных в течение 28 дней в ОР. Данные представлены в Табл. 5.

Таблица 5. Сводная таблица точности работы классификатора – модели Advanced Classification Trees (C&RT) – «усовершенствованные деревья решений», при использовании различных маркеров для прогнозирования 28-дневной выживаемости в ОР

| Исследуемый предиктор | Точность прогнозирования 28-дневной выживаемости на основе исследуемого предиктора | |
|---|--|-----------------------------|
| | Доля ошибочной классификации | Величина стандартной ошибки |
| APACHE II (баллы) | 0,080 | 0,034 |
| Содержание в плазме крови | 32 аминокислот | 0,096 |
| | D-димеры | 0,139 |
| | Мочевина | 0,226 |
| | Прокальцитонин | 0,239 |
| | Креатинин | 0,274 |
| | Билирубин | 0,295 |
| ScvO ₂ | 0,288 | 0,062 |
| Содержание в плазме крови лактата | 0,310 | 0,060 |
| Одновременный учет APACHE II и содержания в плазме крови 32 аминокислот | 0,064 | 0,031 |

Закономерным результатом проведенного сравнения была наибольшая точность прогнозирования 28-дневной выживаемости при одновременном использовании в модели в качестве исследуемых предикторов оценки общей тяжести состояния по APACHE II – интегрального маркера неблагоприятного исхода у больных в КС, и уровней содержания 32-АК в плазме крови. Но в задачи исследования не входило создание более оптимальной, чем имеющиеся в настоящее время модели прогнозирования неблагоприятного исхода у больных в КС. Вместе с тем, из представленной Табл. 5 видно, что качество работы модели (Boosted Trees) при использовании в роли предикторов уровней содержания 32-АК в плазме крови превосходит точность прогнозирования этой модели при использовании в качестве предикторов многих известных метаболитов – *маркеров* риска неблагоприятного исхода. Следовательно, у больных в КС значимость изменений уровней АК в плазме крови для прогнозирования 28-дневной выживаемости высока и её необходимо учитывать – при этом повышается точность прогностических расчетов (Табл.5).

Обсуждение результатов исследования

Общим результатом, ранее проведенных работ и настоящего исследования, служит заключение о том, что аминокислотный состав плазмы крови различен у реаниматологических пациентов с неблагоприятным и благоприятным последующим прогнозом [25,24,16,11].

Полученные нами результаты в отношении прогностической значимости у больных в критическом состоянии сниженного уровня содержания в плазме крови глутаминовой кислоты в определенной мере согласуются с данными A.J. Rogers et al. (2014). В проводимом этими авторами исследовании уровни глутаминовой кислоты в плазме крови, у 90 больных в первые 72 часа с момента поступления в ОР, были также ниже у пациентов, впоследствии умерших в течение 28 дней в ОР, по сравнению с выжившими (значение β в уравнении логистической регрессии равняется 0.35; уровень $p=0,1543$). Однако, A.J. Rogers et al. (2014) не получили необходимой статистической достоверности. Возможным объяснением этому, по мнению самих авторов служит интервал времени для включения больных в исследование – 72 часа с момента поступления в ОР. Таким образом, были учтены лишь метаболиты, которые остаются измененными у пациентов в критическом состоянии в течение нескольких дней с момента начала лечения в отделении интенсивной терапии, и, возможно, пропущены метаболиты с прогностическим потенциалом, которые изменяются при проведении лечебных воздействий более быстро [24]. В настоящем исследовании аминокислотный состав плазмы пациентов изучен непосредственно при поступлении в ОР (в течение первых 6 часов) – на самых ранних стадиях критического состояния. Выявленные метаболические изменения отражают патогенетические механизмы, обуславливающие начальные этапы развития критического состояния и, в то же время, обладают прогностической значимостью в отношении дальнейшего развития патологического процесса и функции 28-дневной выживаемости. Глутаминовая кислота (одна из наиболее распространенных многофункциональных нейромедиаторных АК, «универсальная молекула», присутствующая, как в центральной нервной системе, так и в периферических органах и тканях), входит в состав большого количества метаболических реакций и принимает участие в регулировании множества ключевых физиологических процессов [17,8]. И, вместе с тем, она до настоящего времени остается малоизученной. Предшествующие исследования в абсолютном большинстве были адресованы функциональному действию глутаминовой кислоты в центральной нервной системе, их итогом служат многочисленные дискуссионные концепции относительно бифазных эффектов глутамата и повреждающего действия повышенного и сниженного внеклеточного уровня глутаминовой кислоты на активность нейронов головного мозга в экспериментальных моделях травмы, ишемии и воспаления [1,2]. Доказательства участия глутаминовой кислоты в регуляции физиологических и патологических процессов в других органах и тканях: легких, почках, печени, сердце, желудочно-кишечном тракте и иммунной системе, были получены лишь в последние годы [10]. Анализ накопленных к настоящему времени экспериментальных и клинических данных позволяет считать снижение функциональной

активности глутаматергической нейромедиаторной системы у реаниматологических больных, в качестве индикатора наиболее неблагоприятного её состояния в прогностическом отношении и одного из возможных факторов развития основных механизмов танатогенеза.

В настоящем исследовании показана высокая статистическая достоверность прогностической значимости исходно измененного (чаще сниженного) уровня содержания в плазме крови цитруллина у больных при поступлении в отделение реаниматологии, в отношении их неблагоприятного исхода в течение 28-дневного периода. В этом заключении наши данные полностью согласуются с результатами работ G Piton et al. (2010) и G Piton et al. (2013). В двух исследованиях G Piton et al. (2010) у 67 реаниматологических больных и G Piton et al. (2013) у 103 пациентов в критическом состоянии, низкий уровень в плазме цитруллина в первые сутки поступления в ОР был установлен независимым предиктором неблагоприятного исхода в течение 28-дневного периода лечения в ОР. (ОШ =8,7 и ОШ – 5,17) [21, 23]. Данные также согласуются с результатами более позднего исследования – Kulu R et al. (2016), показавшим, что уровни цитруллина в предоперационном периоде были статистически значимыми для прогнозирования исхода заболевания у больных с острой абдоминальной патологией [13]. На сегодняшний день вопрос о возможности признания сниженного уровня содержания в плазме крови цитруллина в качестве доказанного биомаркера у больных в критическом состоянии все ещё остается дискуссионным. Известно, что цитруллин представляет собой аминокислоту, которая практически не содержится в пищевых веществах и в основном синтезируется энтероцитами. Пациенты в критическом состоянии могут иметь сниженную синтетическую способность тонкой кишки, также, уменьшение концентрации цитруллина в плазме крови у реаниматологических больных может быть обусловлено отличными, от пониженной массы энтероцитов, механизмами. Однако, снижение концентрации цитруллина у пациентов в критическом состоянии может быть ограничено наличием у них почечной дисфункции, поскольку цитруллин метаболизируется преимущественно в проксимальных канальцах почек. [22]. По данным настоящего и ряда других исследований низкая концентрация цитруллина в плазме крови плазмы связана с неблагоприятным прогнозом [20].

В настоящей работе (как и в исследовании A.J. Rogers et al. (2014)), выборки больных были гетерогенны по основному заболеванию, обусловившему развитие критического состояния. Это, свидетельствует о том, что выявленные метаболические «маркеры» являются обобщенными, и имеют патогенетическое и прогностическое значение в отношении развития патологического процесса у реаниматологических пациентов, как «терапевтического», так и «хирургического» профиля. Изучаемые образцы плазмы крови были высокого качества: технология их подготовки предотвращала изменения концентраций аминокислот, вследствие возможных ферментативных реакций. Все аминокислоты определены методом ВЭЖХ-МС с расчетом абсолютной концентрации каждой аминокислоты в плазме крови. В настоящее время лишь спектроскопические методы ВЭЖХ-МС и ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) признаны наиболее точными для

метаболических исследований. Но масс-спектрометрия обладает большей чувствительностью, в сравнении с ЯМР [6]. Поэтому, результаты лабораторной части исследования корректно отражали изменения аминокислотного спектра крови в исследуемой выборке больных.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Выводы

1. Значимость исходных уровней аминокислот в плазме крови у больных в критическом состоянии для прогнозирования функции 28-дневной выживаемости в отделении реаниматологии высока, при их учете повышается точность прогностических расчетов.
2. Со стороны показателей аминокислотного состава плазмы крови, наиболее достоверными предикторами неблагоприятного исхода у реаниматологических пациентов в течение 28-дневного периода, являются исходно измененные, в сравнении с референсными значениями, концентрации цитруллина и сниженные уровни глутаминовой кислоты.
3. Выявленные метаболические изменения отражают ранние патогенетические механизмы, ведущие к неблагоприятному исходу патологического процесса у больных в критическом состоянии.

Список литературы

1. Александрова Е. В. Синдромы дисфункции нейромедиаторных систем в процессе восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы: Дисс. Москва. 2013.
2. Александрова Е.В., Зайцев О.С., Потапов А.А. Клинические синдромы дисфункции нейромедиаторных систем при тяжелой травме мозга. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015; 7: 40-6.
3. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Огурцов П.П. Подготовка пациента, правила взятия, хранения и транспортировки биоматериала для лабораторных исследований: Методические рекомендации для студентов медицинских учебных заведений, лечащих врачей, сотрудников процедурных кабинетов и клиничко-диагностических лабораторий. Общие правила. М.: РУДН, 2012.
4. Ланг Т.А. Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов. М.: Практическая медицина, 2011.

5. Марманис Х. Бабенко Д. Алгоритмы интеллектуального интернета. Передовые методики сбора, анализа и обработки данных. Спб.: Символ-Плюс, 2011.
6. Antcliffe D., Gordon A.C. Metabonomics and intensive care *Crit Care*. 2016; 20(1): 68.
7. Bao L., Zhang M., Yan P., Wu X., Shao J., Zheng R. Retrospective analysis of the value of arterial blood lactate level and its clearance rate on the prognosis of septic shock patients. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2015; 27(1): 38-42.
8. Brosnan J.T., Brosnan M. E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013; 45(3): 413-8
9. Chan D.L., Rozanski E.A., Freeman L.M. Relationship among plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity, and outcome in critically ill dogs. *J.Vet Intern Med*. 2009; 23 (3):559-63.
10. Du J., Li X.H., Li Y.J. Glutamate in peripheral organs: biology and pharmacology. *Eur J. Pharmacol*. 2016 May 6.
11. Ferrario M., Cambiaghi A., Brunelli L., Giordano S., Caironi P., Guatteri L. et al. Mortality prediction in patients with severe septic shock: a pilot study using a target metabolomics approach. *Sci Rep*. 2016; 6:20391.
12. Gielen M., Vanhorebeek I., Wouters P.J., Mesotten D., Wernerman J., Van den Berghe G., rooyackers O. Amino acid concentrations in critically ill children following cardiac surgery. *Pediatr Crit Care Med*. 2014;15 (4):314-28.
13. Kulu R., Akyildiz H., Akcan A., Oztürk A., Sozuer E. Plasma citrulline measurement in the diagnosis of acute mesenteric ischaemia. *ANZ J Surg*. 2016; Apr 8.
14. Liu J., Cheng Q., Yang Q., Li X., Shen X., Zhang L. et al. Prognosis-related factors in intensive care unit (ICU) patients with hematological malignancies: A retrospective cohort analysis in a Chinese population. *Hematology*. 2015; Jan 13.
15. Martínez MJ, Giráldez J. Plasma aminogram in critical patients. *Nutr Hosp*. 1993; 8(2):79-93.
16. Mickiewicz B., Vogel H.J., Wong H.R., Winston B.W. Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(9): 967-76.
17. Newsholme P., Lima M.M., Procopio J., Pithon-Curi T.C, Doi S.Q., Bazotte R.B. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36 (2):153-63.
18. Oudemans-van Straaten H.M., Bosman R.J., Treskes M., van der Spoel, H.J., Zandstra D.F. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*. 2001; 27: 84–90
19. Piton G., Belon F., Cypriani B., Regnard J., Puyraveau M., Manzon C. et al. Enterocyte damage in critically ill patients is associated with shock condition and 28-day mortality. *Crit Care Med*. 2013; 41(9): 2169-76.
20. Piton G., Capellier G. Plasma citrulline in the critically ill: intriguing biomarker, cautious interpretation. *Crit Care*. 2015; 19:204.
21. Piton G., Manzon C., Monnet E., Cypriani B., Barbot O., Navellou J.C et al. Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients // *Intensive Care Med*. 2010; 36(4):702-6
22. Poole A., Deane A., Summers M., Fletcher J., Chapman M. The relationship between fasting plasma citrulline concentration and small intestinal function in the critically ill. *Crit Care*. 2015; 19:16.
23. Rodas, P.C., Rooyackers, O., Hebert C., Norberg, A., Wernerman J. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122: 591–7

24. Rogers A.J, McGeachie M., Baron rM., Gazourian L., Haspel J.A., Nakahira K. et al. Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. PLoS One. 2014; 9(1): e87538.
25. Seymour C.W., Yende S., Scott M.J., Pribis J., Mohny R.P., Bell L.N. et al. Metabolomics in pneumonia and sepsis: an analysis of the GenIMS cohort study. Intensive Care Med. 2013; 39(8):1423-34.
26. van Waardenburg D.A., de Betue C.T., Luiking Y.C., Engel M., Deutz N.E. Plasma arginine and citrulline concentrations in critically ill children: strong relation withinflammation. Am J. Clin Nutr. 2007; 86 (5):1438-44.
27. Wang H., McNeil Y.R., Yeo T.W., Anstey N.M. Simultaneous determination of multiple amino acids in plasma in critical illness by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013; 940:53-8.
28. Wang S., Chen D. The correlation between procalcitonin, C-reactive protein and severity scores in patients with sepsis and their value in assessment of prognosis. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 2015; 27(2):97-101.

Levels of Amino Acid Content in Blood Plasma Associated with an Increased Risk of Adverse Outcomes in Critically Ill Patients

Alekseeva E. V.

candidate of medical sciences, anesthesiologist-reanimatologist, Federal State Budgetary Institution "Central Clinical Hospital and Outpatient Department" Department for President Affairs of the Russian Federation, Moscow

First metabolomic studies were conducted in patients being in critical condition on admission in the resuscitation department (during the initial 24-72 hours), to determine prognostic significance of the levels of a wide variety of low molecular weight substances in relation to 28-day survival. In this study, we determined levels of 32 amino acids in the blood plasma of 62 patients being in a critical condition (CC) in the first 6 hours on admission to the intensive care unit (ICU) by the method of high performance liquid chromatography - mass spectrometry. In retrospect, we allocated two groups of ICU patients in accordance with 28-day survival rate: Group 1 (n = 25) - survivors, Group 2 (n = 37) - deceased. Aminograms were compared in groups of patients, and analyzed by using classical methods of statistical analysis (software package Statistica 12) and meta-data mining (Data Mining Statistica 12 applications). Results: 1) Initial aminograms of the blood plasma are different in groups of patients who subsequently died and survived within 28-day period. 2) Accounting of aminogram parameters in predicting probable outcomes increase the accuracy of its determination. 3) The most significant predictors of adverse course of the pathological process in patients being in critical condition in amino acid composition of the blood plasma are the following: changes, compared to the reference values of citrulline level/odds ratio (OR) = 15.3; predictive test - 0.89; specificity - 0.88), and decreased levels of glutamic acid (OR = 5.0; predictability - 0.82; specificity - 0.84). Conclusions: more rapid inclusion of patients in the study revealed earlier pathogenetic mechanisms leading to the adverse outcome of the pathological process in patients being in critical condition.

Keywords: patients in critical condition, metabolites, amino acids, prediction

References

1. Aleksandrova E. V. Dysfunction Syndromes of neurotransmitter systems in the process of recovery of consciousness after severe traumatic brain injury. PhD Thesis, Moscow, 2013.

2. Aleksandrova E.V., Zajcev O.S., Potapov A.A, "Clinical syndromes of neurotransmitter systems dysfunction in severe brain injury." Клинические синдромы дисфункции нейромедиаторных систем при тяжелой травме мозга. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2015; 7: 40-6.
3. Kochetov A.G., Lyang O.V., Ogurcov P.P, Preparation of the patient, rules for taking, biomaterial storage and transportation of laboratory analysis: Guidelines for medical students, doctors, employees of treatment rooms and clinical diagnostic laboratories. General rules. Moscow: RUDN, 2012. Print.
4. Lang T.A., Sesik M, How to describe the statistics in medicine. Annotated Guide for authors, editors and reviewers. Moscow: Prakticheskaya medicina. 2011. Print.
5. Marmanis H. Babenko D, Mining Algorithms in Internet. Best practices in data collection, analysis and data processing. St. Petersburg: Simvol-Plyus, 2011. Print.
6. Antcliffe D., Gordon A.C. Metabonomics and intensive care *Crit Care*. 2016; 20(1): 68.
7. Bao L., Zhang M., Yan P., Wu X., Shao J., Zheng R. Retrospective analysis of the value of arterial blood lactate level and its clearance rate on the prognosis of septic shock patients. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2015; 27(1): 38-42.
8. Brosnan J.T., Brosnan M. E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013; 45(3): 413-8
9. Chan D.L., Rozanski E.A., Freeman L.M. Relationship among plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity, and outcome in critically ill dogs. *J.Vet Intern Med*. 2009; 23 (3):559-63.
10. Du J., Li X.H, Li Y.J. Glutamate in peripheral organs: biology and pharmacology. *Eur J. Pharmacol*. 2016 May 6.
11. Ferrario M., Cambiaghi A., Brunelli L., Giordano S., Caironi P., Guatteri L. et al. Mortality prediction in patients with severe septic shock: a pilot study using a target metabolomics approach. *Sci Rep*. 2016; 6:20391.
12. Gielen M., Vanhorebeek I., Wouters P.J., Mesotten D., Wernerman J., Van den Berghe G., rooyackers O. Amino acid concentrations in critically ill children following cardiac surgery. *Pediatr Crit Care Med*. 2014;15 (4):314-28.
13. Kulu R., Akyildiz H., Akcan A., Oztürk A., Sozuer E. Plasma citrulline measurement in the diagnosis of acute mesenteric ischaemia. *ANZ J Surg*. 2016; Apr 8.
14. Liu J., Cheng Q., Yang Q., Li X., Shen X., Zhang L. et al. Prognosis-related factors in intensive care unit (ICU) patients with hematological malignancies: A retrospective cohort analysis in a Chinese population. *Hematology*. 2015; Jan 13.
15. Martínez MJ, Giráldez J. Plasma aminogram in critical patients. *Nutr Hosp*. 1993; 8(2):79-93.
16. Mickiewicz B., Vogel H.J., Wong H.R., Winston B.W. Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(9): 967-76.
17. Newsholme P., Lima M.M., Procopio J., Pithon-Curi T.C, Doi S.Q., Bazotte R.B. et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36 (2):153-63.
18. Oudemans-van Straaten H.M., Bosman R.J., Treskes M., van der Spoel, H.J., Zandstra D.F. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*. 2001; 27: 84–90
19. Piton G., Belon F., Cypriani B., Regnard J., Puyraveau M., Manzon C. et al. Enterocyte damage in critically ill patients is associated with shock condition and 28-day mortality. *Crit Care Med*. 2013; 41(9): 2169-76.

20. Piton G., Capellier G. Plasma citrulline in the critically ill: intriguing biomarker, cautious interpretation. *Crit Care*. 2015; 19:204.
21. Piton G., Manzon C., Monnet E., Cypriani B., Barbot O., Navellou J.C et al. Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients // *Intensive Care Med*. 2010; 36(4):702-6
22. Poole A., Deane A., Summers M., Fletcher J., Chapman M. The relationship between fasting plasma citrulline concentration and small intestinal function in the critically ill. *Crit Care*. 2015; 19:16.
23. Rodas, P.C., Rooyackers, O., Hebert C., Norberg, A., Wernerman J. Glutamine and glutathione at ICU admission in relation to outcome. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122: 591–7
24. Rogers A.J, McGeachie M., Baron rM., Gazourian L., Haspel J.A., Nakahira K. et al. Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. *PLoS One*. 2014; 9(1):e87538.
25. Seymour C.W., Yende S., Scott M.J., Pribis J., Mohny R.P., Bell L.N. et al. Metabolomics in pneumonia and sepsis: an analysis of the GenIMS cohort study. *Intensive Care Med*. 2013; 39(8):1423-34.
26. van Waardenburg D.A., de Betue C.T., Luiking Y.C., Engel M., Deutz N.E. Plasma arginine and citrulline concentrations in critically ill children: strong relation withinflammation. *Am J. Clin Nutr*. 2007; 86 (5):1438-44.
27. Wang H., McNeil Y.R., Yeo T.W., Anstey N.M. Simultaneous determination of multiple amino acids in plasma in critical illness by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013; 940:53-8.
28. Wang S., Chen D. The correlation between procalcitonin, C-reactive protein and severity scores in patients with sepsis and their value in assessment of prognosis. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2015; 27(2):97-101.