

## НОВЕЙШИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Н. Л. Стародубцева, Ч. М. Эльдаров, А. Р. Киртбая, Е. Н. Балашова, А. С. Грызунова, О. В. Ионон, В. В. Зубков, Д. Н. Силачев ✉

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Основной проблемой при гипоксической ишемической энцефалопатии новорожденных (ГИЭ) являются ранняя дифференциальная диагностика, прогнозирование и классификация заболевания, от результатов которых напрямую зависит дальнейший метод терапии, в частности, назначение терапевтической гипотермии. Существует прямая зависимость времени начала терапевтической гипотермии и долгосрочного неврологического исхода: чем раньше начата терапевтическая гипотермия, тем лучше прогноз для пациента. В обзоре проанализированы последние достижения в области системной биологии, направленные на раннюю дифференциальную диагностику ГИЭ в дополнение к клиническим: применение протеомных и метаболомных биомаркеров, а также внеклеточных везикул, для которых установлена связь с тяжестью ГИЭ и прогнозом исхода. Выявление селективных маркеров повреждения головного мозга у новорожденных в первые часы жизни затруднено из-за системного влияния гипоксии на весь организм. Особый интерес представляют метаболомные исследования крови новорожденных с использованием хромато-масс-спектрометрии, позволяющие анализировать сотни метаболитов на небольшом количестве биологического образца и определять паттерны, соответствующие повреждению мозга, что будет способствовать более точной и своевременной постановке диагноза ГИЭ для назначения терапевтической гипотермии.

**Ключевые слова:** гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных, диагностика, масс-спектрометрия, протеомика, метаболомика, липидомика

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00454, <https://rscf.ru/project/22-15-00454/>

**Вклад авторов:** Н. Л. Стародубцева, Ч. М. Эльдаров, А. Р. Киртбая, Е. Н. Балашова, А. С. Грызунова, О. В. Ионон, В. В. Зубков, Д. Н. Силачев — анализ литературных данных, написание и редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Николаевич Силачев  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; [d\\_silachev@oparina4.ru](mailto:d_silachev@oparina4.ru)

**Статья получена:** 06.07.2022 **Статья принята к печати:** 20.07.2022 **Опубликована онлайн:** 29.07.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.038

## RECENT ADVANCES IN DIAGNOSTICS OF NEONATAL HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

Starodubtseva NL, Eldarov ChM, Kirtbaya AR, Balashova EN, Gryzunova AS, Ionov OV, Zubkov VV, Silachev DN ✉

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

The prognosis in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) depends on early differential diagnosis for justified administration of emergency therapeutic hypothermia. The moment of therapy initiation directly affects the long-term neurological outcome: the earlier the commencement, the better the prognosis. This review analyzes recent advances in systems biology that facilitate early differential diagnosis of HIE as a pivotal complement to clinical indicators. We discuss the possibilities of clinical translation for proteomic, metabolomic and extracellular vesicle patterns characteristic of HIE and correlations with severity and prognosis. Identification and use of selective biomarkers of brain damage in neonates during the first hours of life is hindered by systemic effects of hypoxia. Chromatography–mass spectrometry blood tests allow analyzing hundreds and thousands of metabolites in a small biological sample to identify characteristic signatures of brain damage. Clinical use of advanced analytical techniques will facilitate the accurate and timely diagnosis of HIE for enhanced management.

**Keywords:** neonatal hypoxic ischemic encephalopathy, diagnostics, mass-spectrometry, proteomics, metabolomics, lipidomics

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation grant number 22-15-00454; <https://rscf.ru/project/22-15-00454/>

**Author contribution:** Starodubtseva NL, Eldarov ChM, Kirtbaya AR, Balashova EN, Gryzunova AS, Ionov OV, Zubkov VV and Silachev DN — literature analysis, manuscript writing and editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis N. Silachev  
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; [d\\_silachev@oparina4.ru](mailto:d_silachev@oparina4.ru)

**Received:** 06.07.2022 **Accepted:** 20.07.2022 **Published online:** 29.07.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.038

### Гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных

Гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных (ГИЭ) — одна из наиболее частых причин неонатальной смертности и инвалидности. Среди недоношенных детей (гестационный возраст < 28 недель) она составляет около 4–48 случаев на 1000 беременностей, однако их число начинает стремительно расти с уменьшением гестационного возраста [1–4]. На долю ГИЭ приходится 6–9% всех неонатальных смертей и 21–23% смертей доношенных детей. По данным литературы, до 10% новорожденных умирают после рождения, у 25% развиваются тяжелые неврологические нарушения: детский церебральный паралич, судороги, умственная отсталость, когнитивные нарушения и эпилепсия [5–9].

При лечении младенцев с данной патологией основная проблема связана с ее прогнозированием, выявлением и классификацией, поскольку все эти факторы влияют на стратегию дальнейшей терапии. Среди младенцев с признаками перинатальной асфиксии около 20% находятся в группе риска ГИЭ с энцефалопатиями различной степени тяжести, из них 40–50% будут подвержены риску инвалидизации, включая умственную отсталость, эпилептические приступы, нарушения зрения и слуха, а также возможен смертельный исход [10].

Терапевтическая гипотермия (ТГ) является доказанным, эффективным методом лечения ГИЭ, она улучшает выживаемость и долгосрочный прогноз у детей [11, 12]. Современные рекомендации по применению ТГ включают детей с ГИЭ от умеренной до тяжелой степени, начиная с 37-й недели гестации, исключая применение гипотермии

у детей с легкой степенью ГИЭ. По результатам национального исследования в Великобритании, 75% центров проводили ТГ младенцам с легкой степенью ГИЭ [13]. Проспективное исследование младенцев с легкой энцефалопатией (PRIME) показало, что у 52% младенцев с легкой формой ГИЭ при выписке были выявлены ранние аномальные изменения на эЭЭГ или судороги, патологическое МРТ головного мозга или неврологическая симптоматика [14]. При последующем наблюдении в среднем через 19 месяцев 16% младенцев имели инвалидность, а у 40% баллы по шкале Бейли III были < 85. Отмечено, что у детей с легкой ГИЭ, не проходивших курс ТГ, когнитивные исходы были такими же, как у детей с ГИЭ средней степени тяжести, которым не проводили ТГ. Систематический обзор результатов у младенцев с легкой степенью ГИЭ показал, что 25% ( $n = 341$ ) имели патологический исход развития нервной системы [15–17].

### Клиническая диагностика и прогнозирование развития ГИЭ

Ранняя и точная оценка тяжести ГИЭ остается одной из самых сложных задач неонатальной помощи. В неонатологии используют разнообразные клинические методы оценки морфофункционального состояния нервной системы для прогнозирования долгосрочных исходов, такие как нейровизуализация и нейрофизиологические инструменты и их комбинации [18–22]. Однако современные методы оценки риска повреждения головного мозга у новорожденного имеют ограничения, присущие первым часам жизни, и неопределенность в отношении тяжести продолжающегося повреждения головного мозга и возможного неврологического исхода сохраняется в этот ранний период [23, 24].

Наиболее доступные инструменты клинической оценки ГИЭ включают: оценку амплитудно-интегрированной электроэнцефалографии (аЭЭГ), нейровизуализацию и исследование мозгового кровотока [22, 24–27]. Многочисленные исследования показали, что около 80% судорог на ЭЭГ у новорожденных не имеют связи с клинической картиной и, следовательно, не могут быть идентифицированы без постоянного мониторинга ЭЭГ даже опытными клиницистами. Более того, нет различий в степени ГИЭ и частотой возникновения судорожной активности клинически или по данным ЭЭГ [28–30].

Амплитудно-интегрированные фоновые паттерны ЭЭГ при ГИЭ тесно коррелируют с неврологическим исходом [31]. Однако их прогностическая ценность зависит от того, как долго изменяются фоновые паттерны по отношению к ГИЭ, а большая прогностическая ценность неблагоприятных исходов у детей, которым проводили лечебную гипотермию, составляет 48–72 ч жизни [27]. Качественная оценка повреждения головного мозга, по данным МРТ-диагностики, в течение первых 48 ч может быть недооценена [32–34].

Выявлены различные факторы риска, влияющие на лечебный эффект ТГ у новорожденных с асфиксией, такие как тяжесть ГИЭ, отсроченное начало лечения, гипо- и гипергликемия, судороги, гипероксия и гипокания во время ТГ. Кроме того, несколько сопутствующих заболеваний могут влиять на нейропротекторную активность ТГ. Одним из хорошо известных факторов риска неблагоприятного неврологического исхода у новорожденных является перинатальный сепсис. Доказано, что ТГ не обладает нейропротективным

действием после сенсibilизированной воспалением гипоксически-ишемической энцефалопатии [35–39].

Метаболические нарушения редко вызывают ГИЭ [40]. Врожденные нарушения метаболизма (ВНМ) возникают в неонатальном периоде после нормального периода родов при отсутствии признаков перинатальной асфиксии. У новорожденных развиваются неврологические нарушения и признаки полиорганной недостаточности, которые могут иметь сходные клинические признаки с ГИЭ. Подробный семейный анамнез для установления таких факторов риска, как кровное родство родителей или гибель ребенка в анамнезе, имеет важное значение, так как большинство врожденных нарушений метаболизма имеют аутосомно-рецессивный тип наследования. Все новорожденные с риском ВНМ должны быть обследованы на предмет метаболических нарушений, так как у этих пациентов могут оказаться эффективными специфические методы лечения, а не гипотермия.

Еще одна категория детей с генетической причиной неврологических нарушений, схожих с ГИЭ, — это дети с неонатальными миопатиями и энцефалопатиями. У пациентов, унаследовавших миопатию (центронуклеарную миопатию), при рождении выявляют мышечную гипотонию в сочетании с дыхательной недостаточностью и ранней смертью, что так же может имитировать ГИЭ [41]. Широкое применение методов полногеномного секвенирования позволило выявить целый ряд новых патологических мутаций, ассоциированных с нарушением функционирования центральной нервной системы, и имеющих схожие клинические признаки с ГИЭ, например в гене *GNAO1* [42, 43]. Таким образом, ТГ показала свою эффективность не у всех пациентов с ГИЭ. Для ранней дифференциальной диагностики ГИЭ новорожденных могут быть применимы подходы по анализу метаболических изменений в крови новорожденных с использованием новых аналитических методов, в частности хромато-масс-спектрометрии. Данный метод позволяет идентифицировать сотни метаболитов в течение нескольких часов, что укладывается во временные рамки, необходимые для получения результатов анализов и принятия решения о назначении ТГ.

### Новые подходы к диагностике ГИЭ: протеомные исследования

В последние годы постоянно повышается интерес к системной биологии — науке, которая объединяет несколько уровней информации для достижения более полного знания о биологической системе. Геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика входят в состав системной биологии и формируют так называемую группу «омикс»-наук. Активное развитие «омикс»-наук обусловлено значительным усовершенствованием экспериментальных технологий и, в первую очередь, успехами в области хроматографии, масс-спектрометрии и секвенирования. Технологии, используемые для создания «омикс»-платформ, представляют собой аналитические подходы для получения информации о входящих в состав биологического образца молекулах различного уровня организации: нуклеиновых кислотах, белках, метаболитах. Эти методы позволяют одновременно регистрировать количественное и качественное содержание нескольких тысяч соединений, создавая тем самым уникальный «отпечаток пальца», характеризующий текущее состояние организма. «Омикс»-науки комплементарны друг другу:

геномика показывает, что организм потенциально способен делать; транскриптомика, что он собирается делать; протеомика, что он делает, метаболомика отражает влияние окружающей среды на геном. В то время как гены и белки создают основу для того, что происходит в клетке, большая часть реальной активности происходит на уровне метаболитов. Более того, метаболизм может изменяться в зависимости от физиологического или патологического состояния клетки, ткани, органа или организма [44].

Развитие методов поиска биомаркеров различных, в том числе социально значимых, заболеваний, одно из наиболее динамично развивающихся направлений геномики, протеомики, метаболомики и инструментальных методов, в частности, ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрии (МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), иммуноферментными методами (ИФА). Об этом свидетельствует возрастающее из года в год число публикаций, специализированных конференций и специальных секций на отраслевых конференциях, посвященных данной проблеме.

Следует отметить, что клинические исследования в неонатальный период очень ограничены; при исследовании динамики молекулярного состава биологических жидкостей преимущественно обладают неинвазивные образцы (моча, стул), а также малоинвазивные образцы (кровь, сухое пятно крови). Некоторое количество таких образцов остается после рутинных клинических анализов, и их можно использовать для проведения дальнейших исследований, не прибегая к дополнительному отбору биологического материала.

В настоящее время в литературе представлены отдельные исследования крови, мочи и спинномозговой жидкости для поиска маркеров различных неонатальных патологий нервной системы, в частности ГИЭ [45]. Следует отметить, что сбор цереброспинальной жидкости (ликвора) является высокоинвазивным методом. Несмотря на наличие в нем специфичных нейрональных маркеров глиального фибриллярного кислого белка GFAP и S100B, эти маркеры не будут доступны в первые критические 6 ч послеродовой жизни и скорее будут подходить для прогнозирования исхода уже развившейся ГИЭ [46]. Предприняты также попытки анализа состава мочи, например, соотношения лактата и креатинина у младенцев с подозрением на патологию ГИЭ, но младенцы с врожденной неонатальной асфиксией, как правило, не выделяют мочу долгое время в связи с повреждением почек. Поэтому моча тоже не подходит для данной клинико-диагностической задачи [47].

В связи с этим, основное внимание исследований направлено на циркулирующие биомаркеры крови, по большей части белкового происхождения, а также нейрональные экзосомы и воспалительные цитокины и метаболиты. Последние достижения в области метаболомики, протеомики и транскриптомики тоже смещают фокус внимания исследователей, направленный на поиск целых молекулярных паттернов биологических молекул, которые бы позволили четко дифференцировать ГИЭ в течение первых 6 ч жизни младенцев от других сопутствующих повреждений (почек, миокарда), которые неизбежны при перинатальной асфиксии. Исследований, позволяющих охарактеризовать первый этап повреждения головного мозга (гипоксическую фазу или первые 6 ч после рождения), недостаточно, чтобы можно было сделать практические выводы для клинической медицины.

Поиск подобных маркеров затруднителен, что в первую очередь связано с процессом развития самой патологии. Гипоксические условия приводят к переключению клеток головного мозга на анаэробный метаболизм, к которому они, в особенности нейроны, не приспособлены. В итоге, довольно быстро в условиях стресса, эксайтотоксичности и накопления метаболитов происходит истощение всех энергетических запасов и как следствие — некротическая гибель клеток головного мозга, которая служит предтечей последующей воспалительной реакции. Наступающая после ишемии/гипоксии фаза реперфузии/реоксигенации способствует продукции активных форм кислорода, инициации апоптозных каскадов и воспалению. После этого наступает перманентная фаза хронического воспаления, которая лишь способствует прогрессии эксайтотоксичности, нарушению окислительного метаболизма, активации протеаз и каспаз, которые в итоге приводят к органическому повреждению головного мозга и нарушению функций [48]. Таким образом, в связи с динамически изменяющимся ходом развития молекулярно-биохимических каскадов, так же динамически изменяется и молекулярный состав крови новорожденных; кроме того многие потенциальные кандидатные молекулы «не попадают» во временной диапазон срочного принятия решения (6 ч). Например, упомянутые выше GFAP, S100B, а также специфичная нейрональная енолаза и основной белок миелина проявляют свои повышенные уровни в крови после первых 6 ч жизни (12–24 ч) [49–51]. Помимо этого, проблема усугубляется еще и тем, что неонатальную ГИЭ довольно сложно дифференцировать от сепсиса или врожденных метаболических заболеваний. Сепсис может сопровождать ГИЭ, изменяя клиническую картину. Важно отметить, что неправильная постановка диагноза и соответственно, назначение гипотермии может принести вред пациентам с энцефалопатиями неишемической природы [52]. Данный факт указывает на необходимость поиска маркеров повреждения головного мозга новорожденных, ассоциированных именно с ишемическим / гипоксическим генезом повреждения.

Еще одним препятствием для молекулярной диагностики ГИЭ служит специфичность самого маркера по отношению к повреждению нейрональных клеток. Предполагается, что большинство подобных маркеров должны относиться к белкам, поддерживающим структурную целостность нервной ткани, соответственно при нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера эти маркеры попадают сначала в спинномозговую жидкость, а затем уже в кровь [53]. Но очень часто ситуация складывается таким образом, что выявить специфичные маркеры на фоне общего воспалительного процесса или других дисфункций, сопутствующих при неонатальной асфиксии, становится довольно непростой задачей. Например, было показано, что в пуповинной крови 25 новорожденных с полным сроком беременности, но с развившейся тяжелой формой ГИЭ уровень креатинфосфокиназы мозгового типа (ВТ-СС) был повышен в несколько раз по сравнению со здоровыми детьми в течение первых 6 и 24 ч жизни [54]. ВТ-СС при этом не является ферментом, специфичным для повреждения головного мозга, а экспрессируется в большинстве тканей и может быть связан с повреждением других органов при асфиксии [55]. Еще одним кандидатом для использования был фермент убиквитин-С-терминальная гидролаза L1 — специфичный для цитоплазмы нейронов маркер апоптоза. Исследование крови, проведенное у 50 новорожденных (средний гестационный возраст — 37 недель), показало,

что уровень этого белка значительно повышается в первые 24 ч жизни новорожденных со средней и тяжелой формой ГИЭ, но обладает очень слабой корреляцией с изменениями, детектируемыми на МРТ уже на пятые сутки жизни и в более позднем периоде (1 год) [56]. Была также показана роль белка легкой цепи нейрофиламента (NFL): он повышался в крови новорожденных со средней и тяжелой формами ГИЭ, проходящих процедуру гипотермии. Первая временная точка была взята по достижении необходимой температуры в камере (18 ч). Несмотря на его высокую корреляцию с картиной МРТ в последующих временных интервалах, повышенный уровень этого белка в первые 6 ч жизни остается под вопросом, и его можно, скорее всего, рассматривать как прогностический признак дальнейшего исхода, а не постановки диагноза [57].

При нарушении целостности гематоэнцефалического барьера происходят активация эндотелиальных клеток и секреция ими неспецифических маркеров ангиогенеза, например васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF). Помимо того, VEGF могут также секретировать и астроциты с микроглией. Однако данные о его повышении в сыворотке крови у новорожденных с ГИЭ остаются под вопросом [58], и эта молекула не специфична для тканей головного мозга [59]. Примерно схоже ситуация выглядит с адrenomодулином и секретонейрином, которые помимо нейрональной ткани секретируются эндокринной и нейроэндокринной системами, и их экспрессия значительно повышается в условиях гипоксии [60, 61].

Маркеры воспаления тоже могут иметь диагностическое значение, так как различные виды иммунных клеток и воспалительных факторов участвуют в повреждении и последующей регенерации после повреждения головного мозга. Было отмечено, что как у доношенных, так и недоношенных детей с неонатальной асфиксией уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, таких как TNF $\alpha$ , интерлейкины IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL10 и ряд других, значительно возрастают [62]. Более того, по результатам исследования 20 новорожденных с ГИЭ с гестационным возрастом в среднем 36 недель, в случае развития асфиксии уровень цитокинов в плазме, особенности IL6 и IL8, значительно повышается в диапазоне 6–24 ч жизни и коррелирует с тяжестью течения ГИЭ [63]. Однако необходимо принимать во внимание, что воспалительному процессу при гипоксии-ишемии подвержена любая система организма, особенно у недоношенных детей. Вдобавок сами роды способны провоцировать воспалительную реакцию, а в условиях ГИЭ она может многократно усиливаться [64]. Исследования новорожденных (35 недель гестации) с ГИЭ, прошедших гипотермическую терапию (при 33 °C в течение 72 ч, начатую в первые 6 ч жизни) и без нее, показали важную роль IL6, IL1 $\beta$ , IL8, TNF $\alpha$  и IL10 в развитии ГИЭ и их корреляцию с тяжестью исхода, однако говорить об их специфичности к повреждению тканей головного мозга говорить не приходится. Было показано, что в случае успешной гипотермической терапии уровни IL6, 8 и 10 значительно снижались к 36 ч жизни [65]. В другом исследовании также проводили оценку цитокинового профиля у новорожденных (36 месяцев гестации) с развившейся ГИЭ и помещенных в условия гипотермии в течение первых 6 ч жизни (72 ч 33,5 °C). Образцы крови, отобранные в первые 24 и 72 ч жизни, показали, что только IL6 оставался повышенным в течение 72 ч в группе с тяжелой формой ГИЭ [51].

Из выше проведенных исследований можно сделать следующие выводы: подход, основанный на

использовании уникальных единичных маркеров ГИЭ, не показал свою высокую прогностическую способность и целесообразность их дальнейшей трансляции в клиническую практику остается под вопросом. Можно предположить, что для дифференцированной диагностики ГИЭ необходим паттерн биологических молекул, которые могут быть выявлены с помощью омиксных технологий, в частности масс-спектрометрическими методами анализа различных классов молекул, включая белки, липиды, а также различные метаболиты.

На сегодняшний день в литературе представлено всего несколько работ, где авторы применяли протеомный анализ биологических жидкостей новорожденных с ГИЭ [66, 67]. В первом исследовании (2020 г.) было 12 пациентов по 4 новорожденных для каждой степени тяжести ГИЭ и группа контроля (16 детей). Все включенные в исследование пациенты имели гестационный срок 37 недель. Кровь объемом 3 мл отбирали до процедуры гипотермии в течение первых 5–7 ч жизни. Анализ крови проводили методом количественной масс-спектрометрии с применением изобарической метки для относительного количественного определения (iTRAQ). Дальнейший биоинформатический анализ показал, что пациенты с ГИЭ с различной степенью тяжести отличались от участников контрольной группы по уровню экспрессии белков. Наибольшие изменения были зарегистрированы в группе с максимальной степенью тяжести. Было обнаружено 133 уникальных белка, из них 14 были повышены в крови новорожденных. В основном данные белки участвовали в процессах клеточного повреждения, острого и хронического воспаления, входили в состав мембран внеклеточных органелл и экзосом. Результаты анализа методом Вестерн-блота и ПЦР смогли подтвердить изменения только в двух наиболее сильно изменяющихся белках: гаптоглобине и S100A8. Белок S100A8 участвует в ряде важных биологических процессов, включая воспаление и регуляцию гомеостаза кальция посредством взаимодействия с S100A9 [68]. Комплекс S100A8/A9 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов, подавляя чрезмерно выраженную воспалительную реакцию [69]. В свою очередь гаптоглобин, экспрессирующийся в тканях печени и мозга, является антиоксидантным белком, связывающим свободный гемоглобин, что защищает головной мозг от активных форм кислорода (АФК) при кровоизлияниях [70]. На сегодняшний день это пока единственная работа, в которой был применен протеомный анализ крови новорожденных с ГИЭ [67].

Еще рядом авторов в 2020 г. был проведен протеомный анализ цереброспинальной жидкости. У четырех новорожденных со сроком гестации 38–39 недель с ГИЭ и менее 5 баллов по Апгар при рождении брали образцы цереброспинальной жидкости в течение первых суток жизни. Масс-спектрометрический анализ методом iTRAQ выявил разницу в экспрессии 34 пептидов от 25 белков по сравнению с группой контроля. Биоинформатический анализ показал, что большинство из них связано с процессом укладки хроматина в ядре. Пептид белка теплового шока 90 $\alpha$  был наиболее выраженно снижен. Данный пептид вовлечен в процесс гибели клеток путем образования пор в мембране. Для подтверждения данной функциональной активности пептида было проведено исследование *in vitro*. Эксперименты на линии клеток РС12 продемонстрировали, что пептид белка теплового шока 90 $\alpha$  действительно защищает клетки от пироптоза, вызванного глюкозно-кислородной депривацией в течение

6 ч [66]. Подобный подход показывает возможность трансляции данных, полученных на животных и клеточных моделях повреждения головного мозга, с целью выявления специфических паттернов повреждения для внедрения в клиническую практику. Таким образом, удается анализировать непосредственно клиническую картину повреждения ткани головного мозга, не осложненную сопутствующими при асфиксии заболеваниями и функциональными нарушениями.

#### Клеточные модели для определения маркеров повреждения головного мозга

С целью упростить многофакторность системы у пациентов с ГИЭ и выявить специфические паттерны повреждения головного мозга применяют протеомный и метаболомный анализ на *in vivo* и *in vitro* моделях. Полученные данные можно учитывать при анализе и интерпретации клинических результатов исследования для поиска новых молекулярных паттернов повреждения головного мозга. Так, в одном из исследований проводили процедуру ишемии-гипоксии (перевязка сонной артерии и камера с гипоксическим газом 92% N<sub>2</sub> / 8% O<sub>2</sub> в течение 30 мин) семидневным мышам, а через 24 ч анализировали ткань головного мозга методом масс-спектрометрии. Уже через сутки после гипоксического воздействия была значительно снижена экспрессия белков-медиаторов реакции коллапса, которые активно участвуют в направлении роста аксонов и роста нейронов в целом [71]. Другие авторы проводили метаболомные исследования на новорожденных свиньях. Животных подвергали процедуре перевязки левой яремной вены и правой сонной артерии, после чего помещали в условия гипоксии для моделирования асфиксии (12–36 ч жизни). У животных отбирали кровь до процедуры, после гипоксии и через 120 мин после гипоксии в течение фазы реоксигенации. Результаты были получены методом жидкостной хроматографии с времяпролетной масс-спектрометрией: в плазме крови при гипоксии значительно увеличилось содержание метаболитов, свидетельствующих о переходе на анаэробный тип метаболизма, в частности, производных цитидина и уридина, свободных жирных кислот и холина. Авторы предлагают использовать эти соединения в качестве ранних маркеров диагностики ГИЭ у новорожденных [72]. В литературе описан ряд *in vitro* исследований на клеточных культурах, которые можно рассматривать как подходы по идентификации маркеров повреждения клеток головного мозга. Так, линию клеток гиппокампа мыши HT22 подвергали гипоксии в течение 17,5 ч с целью выяснить позитивное влияние низких концентраций глюкозы 0,69 мМ на эти клетки. Протеомный анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии позволил выявить около 105 уникальных белков между экспериментальной группой и группой контроля (нормоксия). Дальнейший биоинформатический анализ показал, что большинство из этих 105 белков являются мишенями фактора HIF-1 $\alpha$ , индуцируемого гипоксией; несмотря на то, что сам белок определить в протеоме не удалось, его увеличение было обнаружено Вестерн-блоттом. Результатом индукции мишеней HIF-1 $\alpha$  стали запуск гликолиза, активация антиоксидантных систем, блокировка воспаления [73]. В другой работе тоже моделировали повреждения, возникающие в первичной культуре нейронов при ацидозе (pH = 6,2) в течение суток, с последующим протеомным

анализом. Обнаружено 69 «уникальных» белков, связанных с клеточной гибелью, нарушением синаптической пластичности и окислительным стрессом [74]. Подобные работы показывают применимость клеточных моделей для идентификации уникальных белков, ассоциированных с повреждением нейрональных клеток для решения дальнейших поисковых задач дифференциальной диагностики повреждения нервной системы.

#### Метаболомные подходы для диагностики и прогноза развития ГИЭ

Анализ метаболомного профиля крови может быть высокочувствительным методом при таких патологиях, как сепсис, ГИЭ, наследственные метаболические нарушения. Некоторые метаболиты-кандидаты могут служить многообещающими биомаркерами для ранней диагностики ГИЭ. Во всех исследованиях бактериального сепсиса у новорожденных были обнаружены изменения в метаболизме глюкозы и лактата, отражающие возможное перераспределение потребления глюкозы от митохондриального окислительного фосфорилирования к пути гликолиза и пентозофосфата, так же как признаки повышенного окислительного стресса и окисления жирных кислот при сепсисе [75].

Следует отметить еще один немаловажный факт — степень тяжести и динамика развития ГИЭ зависит от гестационного возраста. В связи с этим не исключено, что в зависимости от времени гестации будут меняться протеомные и метаболомные профили как качественно, так и количественно [76, 77]. Показано, что метаболомный профиль специфичен для созревания доношенных и недоношенных новорожденных. Уровни продуктов метаболизма тирозина, биосинтеза триптофана, фенилаланина, цикла мочевины, метаболизма аргинина и пролина в моче демонстрируют значительную корреляцию с гестационным возрастом [78].

Успехи современной масс-спектрологии и ЯМР с недавнего времени позволяют применять метаболомный анализ и для ГИЭ, потому что стал возможным одномоментный анализ сотен метаболитов в единицу времени, что крайне важно при таких динамически развивающихся патологиях, как ГИЭ. Соответственно природе патологии, метаболомный анализ направлен на обнаружение доказательств клеточной гипоксии и нарушения обмена веществ. Таким образом, исследователи применяют три метаболомных подхода: целевой (т. е. анализ небольшого количества predetermined метаболитов), полуцелевой (анализ большого количества метаболитов) и нецелевой (анализ всех обнаруженных метаболитов). На данный момент в литературе описано около десятка исследований метаболома мочи и крови новорожденных с ГИЭ. При исследовании мочи использовали ЯМР- и MS-методы.

В одной из работ 2018 г. анализировали мочу, полученную от 10 новорожденных с ГИЭ, средним гестационным возрастом 38 недель и баллом по Апгар от 5 до 7. Мочу отбирали в течение первых 6 и 48 ч жизни во время гипотермии и после терапии (72 ч), а также после месяца жизни. Методом ЯМР было показано, что в образцах мочи погибших пациентов были значительно увеличены уровни лактата, миоинозитола и бетаин, а промежуточные продукты цикла Кребса (цитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат), ацетон, диметиламин (DMA), глутамин, пируват, N-ацетильные группы, аргинин и

ацетат, наоборот, снижены по сравнению с контролем (здоровые дети) [79]. В другой работе 2017 г. применяли метод ВЭЖХ-МС/МС для метаболомного анализа мочи у 13 новорожденных с ГИЭ со средним гестационным возрастом 36 недель и средним баллом по Апгар, равным 2–3. Мочу отбирали на 12 ч, третьи и девятые сутки жизни. Результаты показали достоверное снижение уровня ряда аминокислот (разветвленные лейцин, изолейцин, а также ароматические фенилаланин, тирозин, триптофан) и кинуренина и гиппуровой кислоты, повышение уровня ацилкарнитина между группой ГИЭ и контролем (здоровые дети) [80].

Были проведены и исследования метаболома крови новорожденных с ГИЭ. В одной из работ применен нецелевой метод метаболомного анализа пуповинной крови новорожденных с гестационным возрастом 36 недель и оценке по Апгар 6 баллов с неонатальной асфиксией без ГИЭ, асфиксией с признаками ГИЭ. Пуповинную кровь собирали в течение первых 20 мин после выхода плаценты во время родов. Показано, что между группой младенцев с неразвившейся ГИЭ и ГИЭ существовали статистически достоверные различия в уровне мелатонина, лейцина, кинуренина и 3-гидроксидодекановой кислоты. Были также выявлены маркеры степени тяжести ГИЭ, среди которых D-эритрозифосфат, ацетон, 3-оксотетрадекановая кислота и метилглутарилкарнитин. Биоинформатический анализ показал, что ГИЭ нарушает около 50 и 75% метаболитических путей триптофана и пиримидина [81]. В одном из недавних исследований (2021 г.) был применен метод газовой хроматографии с времяпролетной масс-спектрометрией. В данной работе у 24 новорожденных с тяжелой и среднетяжелой формами ГИЭ (гестационный возраст 35 недель, оценка по Апгар меньше 7 баллов) и у 24 новорожденных группы контроля сразу после рождения из бедренной артерии отбирали 2 мл крови с целью получения плазмы и ее дальнейшего метаболомного анализа. Обнаружено, что 52 метаболита в крови новорожденных четко дифференцируют ГИЭ от группы контроля. Эти метаболиты были связаны с путями, участвующими в метаболизме аминокислот, энергетическом обмене, биосинтезе нейротрансмиттеров, метаболизме пиримидина, регулировании NIF кислородом и передаче сигналов от рецепторов, связываемых с G-белком, GPCR. Около 14 метаболитов показали высокую прогностическую значимость для ГИЭ, в частности, аланин, глутаминовая кислота, глутамин, L-яблочная кислота, янтарная кислота, пировиноградная кислота и таурин. Помимо этого,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота и гидроксилламин обладали высокой прогностической ценностью между средней и тяжелой формами ГИЭ, площадь под ROC-кривой составила 0,729 [82].

Обнаруженные в данных работах закономерности согласуются с нарушением энергетического обмена и повреждением митохондрий, которые инициируются при ГИЭ. Так, изменения в энергетических метаболитах, которые указывают на переход в сторону анаэробного метаболизма (увеличение лактата) и нарушение цикла Кребса, были наиболее часто встречаемыми результатами в описанных выше работах. Накопление лактата и промежуточных продуктов цикла Кребса (цитрата, альфа-кетоглутарата, сукцината и фумарата) можно объяснить истощением АТФ и дисфункцией дыхательной цепи. У новорожденных с тяжелой формой ГИЭ повышенный уровень сукцината также может коррелировать с уровнем тяжести энцефалопатии [83]. Стоит также отметить, что в

ряде работ неоднократно было отмечено, что и после 48 ч реанимации новорожденные с успешно купированной ГИЭ обладают особенностями метаболизма, отличающимися их от здоровых детей [84]. Отдельно стоит упомянуть изменения в глутамине: он необходим для синтеза глутамата — основного медиатора возбуждения во время перинатальной травмы мозга [85]. В подобных работах часто обнаруживают и гипоксантин, который при взаимодействии с ксантиноксидазой образует АФК, губительные для тканей. Его увеличение считают основной характерной биохимической клинической чертой асфиксии [86].

Метаболомный анализ позволил выявить важную роль липидов в перинатальной асфиксии. У холина наиболее повышенный уровень среди липидных метаболитов во время ГИЭ [83]. Холин и его производные необходимы для структурной целостности клеточных мембран и передачи сигналов (фосфолипиды), нейротрансмиссии (синтез ацетилхолина), транспорта липидов (липопротеины) и метаболизма метильных групп (снижение гомоцистеина) [87]. Уровень инозитола, основного предшественника для синтеза фосфорилированных соединений-передатчиков сигналов, значительно увеличивается в крови после перинатальной асфиксии у новорожденных, однако не специфичен к повреждению нервной системы [46, 77]. Подводя итог, можно предположить, что наиболее эффективным и целесообразным направлением движения в области ранней диагностики ГИЭ будет поиск маркеров нейронального повреждения методом метаболомного анализа.

### Внеклеточные везикулы в диагностике ГИЭ

В качестве альтернативы стоит рассмотреть и таргетный анализ внеклеточных везикул нейрональных клеток во время ГИЭ. Внеклеточные везикулы (ВВ) — это специализированные контейнеры клеточного происхождения, состоящие из цитоплазмы, окруженной фосфолипидной мембраной [88]. Известно, что ВВ принимают участие в большинстве важных биологических процессов: иммунной регуляции, модуляции воспаления, передаче сигналов от клетки к клетке, ангиогенезе и других. Известно, что ВВ, высвобождающиеся из нейронов, играют важную роль в поддержании их функциональной активности и развитии [89]. Было также показано, что в случае механического повреждения головного мозга или инсульта число нейрональных ВВ возрастает по сравнению с нормой [90, 91]. ВВ довольно привлекательны для исследователей в качестве диагностических маркеров. Они несут на своей поверхности трансмембранные белки, специфичные для клеток, их продуцирующих, что позволяет отбирать определенные классы ВВ для анализа. На поверхности нейрональных ВВ обнаружены молекулы адгезии, а также лиганды или рецепторы для таргетного взаимодействия с клетками-реципиентами (мишенями), которые, вероятно, могут играть важную роль в синаптогенезе и теоретически служить важными диагностическими маркерами нарушения развития нервной системы. Содержимое ВВ защищено от деградации, что указывает на их прогностическую ценность даже с течением времени или при условии длительного хранения [92–94].

На сегодняшний день в литературе описано всего несколько клинических исследований, где применяли нейрональные ВВ в качестве маркеров повреждения

при ГИЭ. В одной из работ (2015 г.) у 14 новорожденных (36 недель гестации, оценка по Апгар — 2–5 баллов) с ГИЭ и помещенных в условия гипотермии в течение первых 6 ч жизни отбирали венозную кровь (500 мкл) через 8, 10 и 14 ч после начала гипотермии. В данной работе был разработан метод получения нейрональных ВВ, суть которого в том, что 100 мкл плазмы, полученной из крови, инкубировали с коммерческим реагентом для осаждения экзосом (EXOQ; System Biosciences, Inc.; Mountainview, CA), после чего полученную суспензию инкубировали с биотинилизованными антителами на контактин-2 — специфичную молекулу адгезии, которые затем преципитировали с помощью стрептавидина. К сожалению, в работе не указана концентрация полученных ВВ, однако сами исследователи говорят о том, что их было довольно мало, так как в дальнейшем методом ИФА в полученных ВВ определяли содержание только четырех маркеров: синаптодопина, синаптофизина, нейрональной енолазы и митохондриальной цитохром-С-оксидазы. Оказалось, что лишь синаптоподин обладает диагностической ценностью, но его изменение отражает уже вторичное повреждение, возникающее после 6 ч жизни [95]. Следует отметить, что данная химическая модификация ВВ делает их не пригодными для масс-спектрометрического или метаболомного анализа. Более того, концентрация частиц в образце позволяет предположить, что измерения, вероятно, будут статистически недостоверны или пройдут на уровне фонового сигнала. В другой работе (2021 г.) этот же коллектив авторов провел исследование венозной крови 26 новорожденных с ГИЭ (гестационный возраст 39 недель, оценка по Апгар — 5 баллов) 0–6, 12, 24, 48 и 96 ч жизни. После выделения нейрональных ВВ способом, описанным выше, методом ИФА определяли нейрональные маркеры: синаптоподин, нейтрофильный, связанный с желатиназой, липокаллин (NGAL) и нейропетраксин-2 [96]. Известно, что NGAL хорошо коррелирует со степенью тяжести и исходом при гемморагическом инсульте, в то же время является маркером почечного повреждения [97, 98]. В свою очередь нейропетраксин-2 входит в систему возбуждающего синаптического окончания, связываясь с  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат (или AMPA) глутаматным рецептором [99]. Как и в предыдущем исследовании, синаптоподин обладал прогностической значимостью и коррелировал со степенью повреждения

на МРТ при незначительном повреждении, но при более серьезной степени повреждения его прогностическая ценность была незначимой, тогда как чувствительность его в диапазоне от 0–12 часов падала с 40 до 18%. Была также обнаружена прогностическая ценность NGAL относительно картины МРТ при средней и высокой степени тяжести, но в диапазоне 12–48 ч. Попытки обнаружить корреляцию между снижением уровня синаптодопина и ростом NGAL во времени не имели успеха [96]. Остается неясным вопрос о возможности применения данного метода для ранней диагностики ГИЭ из-за крайне малого количества образца нейрональных ВВ.

Таким образом, показана перспективность использования методов, основанных на протеомном и метаболомном анализе, для диагностики ГИЭ на ранних этапах развития патологии. Однако требуются исследования, направленные на поиск специфичных для повреждения головного мозга молекулярных паттернов для дифференциальной диагностики в виду сочетания с повреждениями других органов при системном воздействии гипоксии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сохраняющиеся высокие показатели заболеваемости и смертности у новорожденных с ГИЭ свидетельствуют о необходимости поиска дополнительных методов диагностики, подтверждающих перенесенную гипоксию для своевременного принятия решения о проведении терапевтической гипотермии и для исключения пациентов со схожей клинической картиной, таких как ранний неонатальный сепсис, и детей с подозрением на наследственные болезни обмена. Существует прямая зависимость времени начала терапевтической гипотермии и долгосрочным неврологическим исходом: чем раньше начата терапевтическая гипотермия, тем лучший прогноз для пациента. Для ранней дифференциальной диагностики ГИЭ новорожденных могут быть применимы подходы к диагностике метаболических изменений в крови новорожденных с использованием хромато-масс-спектрометрии с выявлением метаболитов-кандидатов, имеющих высокий диагностический потенциал при ГИЭ. Использование дополнительных критериев, таких как метаболомные маркеры, будет способствовать более точной постановке диагноза ГИЭ и дифференциальной диагностике с другими заболеваниями.

## Литература

- Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 [cited 2022 Jun 28]; 215 (1): 103.e1–103.e14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26772790/>.
- Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr.* 1995 [cited 2022 Jun 28]; 84 (8): 927–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7488819/>.
- Thorngren-Jerneck K, Herbst A. Low 5-minute Apgar score: a population-based register study of 1 million term births. *Obstet Gynecol.* 2001 [cited 2022 Jun 28]; 98 (1): 65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11430958/>.
- Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2012 [cited 2022 Jun 28]; 72 (2): 156–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926849/>.
- Lawn J, Shibuya K, Stein C. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ.* 2005 [cited 2022 Jun 28]; 83 (6): 409. Available from: <https://pmc/articles/PMC2626256/?report=abstract>.
- Hoehn T, Hansmann G, Bühner C, Simbruner G, Gunn AJ, Yager J, et al. Therapeutic hypothermia in neonates. Review of current clinical data, ILCOR recommendations and suggestions for implementation in neonatal intensive care units. *Resuscitation.* 2008 [cited 2022 Jun 28]; 78 (1): 7–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554560/>.
- Okereafor A, Allsop J, Counsell SJ, Fitzpatrick J, Azzopardi D, Rutherford MA, et al. Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events. *Pediatrics.* 2008 [cited 2022 Jun 28]; 121 (5): 906–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18450893/>.
- Long M, Brandon DH. Induced hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Obstet Gynecol neonatal Nurs J OGN.* 2007 [cited 2022 Jun 28]; 36 (3): 293–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17489937/>.

9. Pierrat V, Haouari N, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005 [cited 2022 Jun 28];90(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15846019/>.
10. Lee ACC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res.* 2013 [cited 2022 Jun 28]; 74 Suppl 1(Suppl 1): 50–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366463/>.
11. Wang LS, Cheng GQ, Zhou WH, Sun JQ, Cao Y, Shao XM. Meta-analysis of mild hypothermia for gestational age over 35-week newborns with hypoxic- ischemic encephalopathy. *Natl Med J China.* 2012 [cited 2022 Jun 28]; 92 (20): 1400–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22883198/>.
12. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ.* 2010 [cited 2022 Jun 28]; 340 (7743): 409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144981/>.
13. Oliveira V, Singhvi DP, Montaldo P, Lally PJ, Mendoza J, Manerkar S, et al. Therapeutic hypothermia in mild neonatal encephalopathy: a national survey of practice in the UK. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2018 [cited 2022 Jun 28]; 103 (4): F1–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28942433/>.
14. Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective research on infants with mild encephalopathy: The PRIME study. *Journal of Perinatology. J Perinatol.* 2018 [cited 2022 Jun 28]; 38: 80–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095433/>.
15. Chalak LF, Nguyen KA, Prempunpong C, Heyne R, Thayil S, Shankaran S, et al. Prospective research in infants with mild encephalopathy identified in the first six hours of life: neurodevelopmental outcomes at 18–22 months. *Pediatr Res.* 2018 [cited 2022 Jun 28]; 84 (6): 861–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30250303/>.
16. Murray DM, O'Connor CM, Anthony Ryan C, Korotchkova I, Boylan GB. Early EEG Grade and Outcome at 5 Years After Mild Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics.* 2016 [cited 2022 Jun 28]; 138 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27650049/>.
17. Conway JM, Walsh BH, Boylan GB, Murray DM. Mild hypoxic ischaemic encephalopathy and long term neurodevelopmental outcome — A systematic review. *Early Hum Dev.* 2018 [cited 2022 Jun 28]; 120: 80–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496329/>.
18. Nanavati T, Seemaladinne N, Regier M, Yossuck P, Pergami P. Can We Predict Functional Outcome in Neonates with Hypoxic Ischemic Encephalopathy by the Combination of Neuroimaging and Electroencephalography? *Pediatr Neonatol.* 2015 [cited 2022 Jun 28]; 56 (5): 307–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862075/>.
19. Polat M, Şimşek A, Tansuğ N, Sezer RG, Özkol M, Başpınar P, et al. Prediction of neurodevelopmental outcome in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2013 [cited 2022 Jun 28];17 (3): 288–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231917/>.
20. Shellhaas RA, Kushwaha JS, Plegue MA, Selewski DT, Barks JDE. An Evaluation of Cerebral and Systemic Predictors of 18-Month Outcomes for Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Child Neurol.* 2015 [cited 2022 Jun 28]; 30 (11): 1526–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25724376/>.
21. Chang T, Du Plessis A. Neurodiagnostic techniques in neonatal critical care. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012 [cited 2022 Jun 29]; 12 (2):145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22318538/>.
22. Van Laerhoven H, De Haan TR, Offringa M, Post B, Van Der Lee JH. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics.* 2013 [cited 2022 Jun 29]; 131 (1): 88–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23248219/>.
23. Rasmussen LA, Cascio MA, Ferrand A, Shevell M, Racine E. The complexity of physicians' understanding and management of prognostic uncertainty in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinatol.* 2019 [cited 2022 Jun 29]; 39 (2): 278–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568164/>.
24. Natarajan N, Pardo AC. Challenges in neurologic prognostication after neonatal brain injury. *Semin Perinatol.* 2017 [cited 2022 Jun 29]; 41 (2): 117–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28139254/>.
25. Merchant N, Azzopardi D. Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol.* 2015 [cited 2022 Jun 29]; 57 (S3): 8–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25800487/>.
26. Merhar SL, Chau V. Neuroimaging and Other Neurodiagnostic Tests in Neonatal Encephalopathy. *Clin Perinatol.* 2016 [cited 2022 Jun 29]; 43 (3): 511–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27524451/>.
27. Del Río R, Ochoa C, Alarcon A, Arnáez J, Blanco D, García-Alix A. Amplitude integrated electroencephalogram as a prognostic tool in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review. *PLoS One.* 2016 [cited 2022 Jun 29]; 11 (11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27802300/>.
28. Mizrahi EM. Neonatal seizures and neonatal epileptic syndromes. *Neurol Clin.* 2001 [cited 2022 Jun 29]; 19 (2): 427–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11358751/>.
29. Murray DM, Boylan GB, Ali I, Ryan CA, Murphy BP, Connolly S. Defining the gap between electrographic seizure burden, clinical expression and staff recognition of neonatal seizures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008 [cited 2022 Jun 29]; 93 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17626147/>.
30. Clancy RR, Legido A, Lewis D. Occult neonatal seizures. *Epilepsia.* 1988 [cited 2022 Jun 29]; 29 (3): 256–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3371282/>.
31. Weeke LC, Boylan GB, Pressler RM, Hallberg B, Blennow M, Toet MC, et al. Role of EEG background activity, seizure burden and MRI in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia. *Eur J Paediatr Neurol.* 2016 [cited 2022 Jun 28]; 20 (6): 855–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370316/>.
32. Gunn AJ, Wyatt JS, Whitelaw A, Barks J, Azzopardi D, Ballard R, et al. Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *J Pediatr.* 2008 [cited 2022 Jun 29]; 152 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18154900/>.
33. Boudes E, Tan X, Saint-Martin C, Shevell M, Wintermark P. MRI obtained during versus after hypothermia in asphyxiated newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015 [cited 2022 Jun 29]; 100 (3): F238–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605620/>.
34. Bonifacio SL, deVries LS, Groenendaal F. Impact of hypothermia on predictors of poor outcome: how do we decide to redirect care? *Semin Fetal Neonatal Med.* 2015 [cited 2022 Jun 29]; 20 (2): 122–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577654/>.
35. Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K, et al. Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology.* 2013 [cited 2022 Jun 29]; 104 (3): 228–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24030160/>.
36. Basu SK, Kaiser JR, Guffey D, Minard CG, Guillet R, Gunn AJ. Hypoglycaemia and hyperglycaemia are associated with unfavourable outcome in infants with hypoxic ischaemic encephalopathy: A post hoc analysis of the CoolCap Study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2016 [cited 2022 Jun 29]; 101 (2): F149–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26283669/>.
37. Shah DK, Wusthoff CJ, Clarke P, Wyatt JS, Ramaiah SM, Dias RJ, et al. Electrographic seizures are associated with brain injury in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014 [cited 2022 Jun 29]; 99 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24443407/>.

38. Sabir H, Jary S, Tooley J, Liu X, Thoresen M. Increased inspired oxygen in the first hours of life is associated with adverse outcome in newborns treated for perinatal asphyxia with therapeutic hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 161 (3): 409–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22521111/>.
39. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation*. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 85 (4): 567–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24361672/>.
40. Uziel G, Ghezzi D, Zeviani M. Infantile mitochondrial encephalopathy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011 [cited 2022 Jun 29]; 16: 205–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620787/>.
41. Bruyland M, Liebaers I, Sacre L, Vandeplass Y, De Meirleir L, Martin JJ. Neonatal myotubular myopathy with a probable X-linked inheritance: observations on a new family with a review of the literature. *J Neurol*. 1984 [cited 2022 Jun 29]; 231 (4): 220–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6512577/>.
42. Danti FR, Galosi S, Romani M, Montomoli M, Carss KJ, Lucy Raymond F, et al. GNAO1 encephalopathy: Broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol Genet*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 3 (2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28357411/>.
43. Solis GP, Kozhanova TV, Koval A, Zhilina SS, Mescheryakova TI, Abramov AA, et al. Pediatric Encephalopathy: Clinical, Biochemical and Cellular Insights into the Role of Gln52 of GNAO1 and GNAI1 for the Dominant Disease. *Cells*. 2021 [cited 2022 Jul 4]; 10 (10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34685729/>.
44. Cuzzolin L, Zaccaron A, Fanos V. Unlicensed and off-label uses of drugs in paediatrics: a review of the literature. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 [cited 2022 Jun 30]; 17 (1): 125–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12588640/>.
45. Robertson NJ, Thayyil S, B. Cady E, Raivich G. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in term perinatal asphyxial encephalopathy: from neuropathological correlates to future clinical applications. *Curr Pediatr Rev*. 2014 [cited 2022 Jun 30]; 10 (1): 37–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25055862/>.
46. Massaro AN, Chang T, Kadom N, Tsuchida T, Scaffidi J, Glass P, et al. Biomarkers of brain injury in neonatal encephalopathy treated with hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 30]; 161 (3): 434–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494878/>.
47. Jones R, Heep A, Odd D. Biochemical and clinical predictors of hypoxic-ischemic encephalopathy after perinatal asphyxia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 31 (6): 791–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28274150/>.
48. Fatemi A, Wilson MA, Johnston M V. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the Term Infant [Internet]. *Clinics in Perinatology*. *Clin Perinatol*. 2009 [cited 2022 Jun 30]; 36: 835–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19944838/>.
49. Ennen CS, Huisman TAGM, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 [cited 2022 Jun 30]; 205 (3): 251.e1–251.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21784396/>.
50. Kim HJ, Tsao JW, Stanfill AG. The current state of biomarkers of mild traumatic brain injury. *JCI insight*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 3 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29321373/>.
51. Orrock JE, Panchapakesan K, Vezina G, Chang T, Harris K, Wang Y, et al. Association of brain injury and neonatal cytokine response during therapeutic hypothermia in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res*. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26717001/>.
52. Tann CJ, Martinello KA, Sadoo S, Lawn JE, Seale AC, Vega-Poblete M, et al. Neonatal Encephalopathy With Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review, Investigator Group Datasets, and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 65 (suppl\_2): S173–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117330/>.
53. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy-Review of the literature to date and future directions for research. *Handb Clin Neurol*. 2019 [cited 2022 Jun 30]; 162: 281–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31324315/>.
54. Alkholy UM, Abdalmonem N, Zaki A, Ali YF, Mohamed SA, Abdelsalam NI, et al. Early predictors of brain damage in full-term newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 13: 2133–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28860770/>.
55. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of brain injury in the premature infant. *Front Neurol*; 2013 [cited 2022 Jun 30]; 3 JAN. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23346073/>.
56. Massaro AN, Wu YW, Bammler TK, Comstock B, Mathur A, McKinstry RC, et al. Plasma Biomarkers of Brain Injury in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 194: 67–75.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29478510/>.
57. Shah DK, Ponnusamy V, Evanson J, Kapellou O, Ekitzidou G, Gupta N, et al. Raised plasma neurofilament light protein levels are associated with abnormal MRI outcomes in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Front Neurol*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 9 (MAR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29556208/>.
58. Sweetman DU, Onwuneme C, Watson WR, Murphy JFA, Molloy EJ. Perinatal Asphyxia and Erythropoietin and VEGF: Serial Serum and Cerebrospinal Fluid Responses. *Neonatology*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 111 (3): 253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27902983/>.
59. Lv H, Wang Q, Wu S, Yang L, Ren P, Yang Y, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 450: 282–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320853/>.
60. Hasslacher J, Lehner GF, Harler U, Beer R, Ulmer H, Kirchmair R, et al. Secretoneurin as a marker for hypoxic brain injury after cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med*. 2014 [cited 2022 Jul 4]; 40 (10): 1518–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138227/>.
61. Risso FM, Sanna A, Gavilanes DAW, Vles HJ, Colivicchi M, Ricotti A, et al. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 25 (SUPPL.4): 93–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958034/>.
62. Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Merin Sigala ME, Barrera de León JC, Lemus-Varela M de L, Torres-Mendoza BM de G, et al. Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatr Neonatol*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 58 (1): 70–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27522459/>.
63. Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Laptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr*. 2014 [cited 2022 Jul 4]; 164 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24332821/>.
64. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, De Luca T, Assumma M, Signore F, et al. Umbilical cord interleukin-6 levels are elevated in term neonates with perinatal asphyxia. *Eur J Clin Invest*. 2003 [cited 2022 Jul 4]; 33 (4): 352–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12662167/>.
65. Jenkins DD, Rollins LG, Perkel JK, Wagner CL, Katikaneni LP, Bass WT, et al. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 32 (10): 1888–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805873/>.
66. Hou X, Yuan Z, Wang X, Cheng R, Zhou X, Qiu J. Peptidome analysis of cerebrospinal fluid in neonates with hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Brain*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 13 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008433/>.
67. Zhu Y, Yun Y, Jin M, Li G, Li H, Miao P, et al. Identification of novel biomarkers for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using iTRAQ. *Ital J Pediatr*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 46 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448169/>.
68. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory

- response in human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2005 [cited 2022 Jul 4]; 105 (7): 2955–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598812/>.
69. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009 [cited 2022 Jul 4]; 86 (3): 557–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451397/>.
  70. Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta JC, et al. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. *J Neurosci*. 2009 [cited 2022 Jul 4]; 29 (50): 15819–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20016097/>.
  71. Zhou Y, Bhatia I, Cai Z, He QY, Cheung PT, Chiu JF. Proteomic analysis of neonatal mouse brain: Evidence for hypoxia- and ischemia-induced dephosphorylation of collapsin response mediator proteins. *J Proteome Res*. 2008 [cited 2022 Jul 4]; 7 (6): 2507–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471005/>.
  72. Solberg R, Kulligowski J, Pankratov L, Escobar J, Quintás G, Lliso I, et al. Changes of the plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res*. 2016 [cited 2022 Jul 4]; 80 (2): 284–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055187/>.
  73. Li H, Kittur FS, Hung CY, Li PA, Ge X, Sane DC, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Beneficial Effects of Low Glucose on Neuronal Cell Survival in an in vitro Ischemic Penumbra Model. *Front Cell Neurosci*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33033473/>.
  74. Shi Y, Cai EL, Yang C, Ye CY, Zeng P, Wang XM, et al. Protection of melatonin against acidosis-induced neuronal injuries. *J Cell Mol Med*. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 24 (12): 6928–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364678/>.
  75. Bjerkhaug AU, Granslo HN, Klingenberg C. Metabolic responses in neonatal sepsis—A systematic review of human metabolomic studies. *Acta Paediatr*. 2021 [cited 2022 Jun 29]; 110 (8): 2316–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33851423/>.
  76. Beckstrom AC, Ricca RL, Gow KW, McAdams RM. Persistent posterior pneumomediastinum in a neonate. *Pediatr Int*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 54 (3): 441–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22631580/>.
  77. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. 2008 [cited 2022 Jul 4]; 455 (7216): 1054–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18948945/>.
  78. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Griffin JL, Fanos V. Metabonomics: a new tool for the neonatologist. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 [cited 2022 Jul 4]; 22 (SUPPL. 3): 50–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19701858/>.
  79. Looi E, Noto A, Puddu M, Pomeroy G, Demontis R, Dalmazzo C, et al. A longitudinal 1H-NMR metabolomics analysis of urine from newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing hypothermia therapy. Clinical and medical legal insights. *PLoS One*. 2018 [cited 2022 Jul 4]; 13 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
  80. Sarafidis K, Efstathiou N, Begou O, Soubasi V, Agakidou E, Gika E, et al. Urine metabolomic profile in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Hippokratia*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 21 (2): 80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
  81. Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, et al. Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019 [cited 2022 Jul 4]; 39 (1): 147–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31668681/>.
  82. Jia Y, Jia X, Xu H, Gao L, Wei C, Li Y, et al. Blood Plasma Metabolic Profile of Newborns with Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy by GC-MS. *Biomed Res Int*. 2021 [cited 2022 Jul 4]; 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258280/>.
  83. Reinke SN, Walsh BH, Boylan GB, Sykes BD, Kenny LC, Murray DM, et al. 1H NMR derived metabolomic profile of neonatal asphyxia in umbilical cord serum: implications for hypoxic ischemic encephalopathy. *J Proteome Res*. 2013 [cited 2022 Jul 4]; 12 (9): 4230–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931672/>.
  84. Longini M, Giglio S, Perrone S, Vivi A, Tassini M, Fanos V, et al. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine samples in preterm asphyctic newborn: a metabolomic approach. *Clin Chim Acta*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 444: 250–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25727514/>.
  85. Johnston M V. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol*. 2005 [cited 2022 Jul 4]; 15 (3): 234–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16196390/>.
  86. Pietz J, Guttenberg N, Gluck L. Hypoxanthine: a marker for asphyxia. *Obstet Gynecol*. 1988 [cited 2022 Jul 4]; 72 (5): 762–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3140152/>.
  87. Penry JT, Manore MM. Choline: An important micronutrient for maximal endurance-exercise performance? *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2008 [cited 2022 Jul 4]; 18: 191–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18458362/>.
  88. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 [cited 2022 Jul 4]; 200 (4): 373–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420871/>.
  89. Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol*. 2012 [cited 2022 Jul 4]; 3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22654762/>.
  90. Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Peña E, Padró T, Jiménez-Xarrié E, et al. Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. *PLoS One*. 2016 [cited 2022 Jul 4]; 11 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26815842/>.
  91. Patz S, Trattning C, Grünbacher G, Ebner B, Güllý C, Novak A, et al. More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J Neurotrauma*. 2013 [cited 2022 Jul 4]; 30 (14): 1232–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23360174/>.
  92. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 2 (7): 769–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273689/>.
  93. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 85 (1): 40–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26062630/>.
  94. Силачев Д. Н., Горюнов К. В., Плотников Е. Ю., Швецова Ю. А., Бабенко В. А., Буров А. А., et al. Внеклеточные везикулы мочи как диагностический маркер почечных патологий. «Педиатрия» имени Г. Н. Сперанского. 2020 [cited 2022 Jul 4]; 99 (5): 154–63. Available from: <https://pediatriajournal.ru/archive?show=378&section=6017>.
  95. Goetzl L, Merabova N, Darbinian N, Martirosyan D, Poletto E, Fugarolas K, et al. Diagnostic Potential of Neural Exosome Cargo as Biomarkers for Acute Brain Injury. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018 [cited 2022 Jul 4]; 5 (1): 4–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29376087/>.
  96. Pineles B, Mani A, Sura L, Rossignol C, Albayram M, Weiss MD, et al. Neuronal exosome proteins: novel biomarkers for predicting neonatal response to therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2022 [cited 2022 Jul 4]; 107 (1): F60–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34021027/>.
  97. Chen S, Chen XC, Lou XH, Qian SQ, Ruan ZW. Determination of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a prognostic biomarker of acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta*. 2019 [cited 2022 Jul 4]; 492: 72–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30771300/>.
  98. Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., Павленко Т. А., Павлова В. С., Крючко Д. С., Зубков ВВ, et al. Острое повреждение почек у новорожденных. От эксперимента к клинике. *Неонатология*. 2017; (4): 58–63.
  99. Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, Lanahan A, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron*. 2003 [cited 2022 Jul 4]; 39 (3): 513–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12895424/>.

## References

1. Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 215 (1): 103.e1–103.e14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26772790/>.
2. Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr*. 1995 [cited 2022 Jun 28]; 84 (8): 927–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7488819/>.
3. Thorngren-Jerneck K, Herbst A. Low 5-minute Apgar score: a population-based register study of 1 million term births. *Obstet Gynecol*. 2001 [cited 2022 Jun 28]; 98 (1): 65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11430958/>.
4. Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2012 [cited 2022 Jun 28]; 72 (2): 156–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926849/>.
5. Lawn J, Shibuya K, Stein C. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ*. 2005 [cited 2022 Jun 28]; 83 (6): 409. Available from: <https://pmc/articles/PMC2626256/?report=abstract>.
6. Hoehn T, Hansmann G, Bühler C, Simbruner G, Gunn AJ, Yager J, et al. Therapeutic hypothermia in neonates. Review of current clinical data, ILCOR recommendations and suggestions for implementation in neonatal intensive care units. *Resuscitation*. 2008 [cited 2022 Jun 28]; 78 (1): 7–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554560/>.
7. Okerefor A, Allsop J, Counsell SJ, Fitzpatrick J, Azzopardi D, Rutherford MA, et al. Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events. *Pediatrics*. 2008 [cited 2022 Jun 28]; 121 (5): 906–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18450893/>.
8. Long M, Brandon DH. Induced hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Obstet Gynecol neonatal Nurs JOGNN*. 2007 [cited 2022 Jun 28]; 36 (3): 293–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17489937/>.
9. Pierrat V, Haouari N, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005 [cited 2022 Jun 28]; 90(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15846019/>.
10. Lee ACC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res*. 2013 [cited 2022 Jun 28]; 74 Suppl 1(Suppl 1): 50–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366463/>.
11. Wang LS, Cheng GQ, Zhou WH, Sun JQ, Cao Y, Shao XM. Meta-analysis of mild hypothermia for gestational age over 35-week newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Natl Med J China*. 2012 [cited 2022 Jun 28]; 92 (20): 1400–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22883198/>.
12. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ*. 2010 [cited 2022 Jun 28]; 340 (7743): 409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144981/>.
13. Oliveira V, Singhvi DP, Montaldo P, Lally PJ, Mendoza J, Manerkar S, et al. Therapeutic hypothermia in mild neonatal encephalopathy: a national survey of practice in the UK. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 103 (4): F1–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28942433/>.
14. Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective research on infants with mild encephalopathy: The PRIME study. *Journal of Perinatology*. *J Perinatol*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 38: 80–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29095433/>.
15. Chalak LF, Nguyen KA, Prempunpong C, Heyne R, Thayil S, Shankaran S, et al. Prospective research in infants with mild encephalopathy identified in the first six hours of life: neurodevelopmental outcomes at 18–22 months. *Pediatr Res*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 84 (6): 861–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30250303/>.
16. Murray DM, O'Connor CM, Anthony Ryan C, Korotchkova I, Boylan GB. Early EEG Grade and Outcome at 5 Years After Mild Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 138 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27650049/>.
17. Conway JM, Walsh BH, Boylan GB, Murray DM. Mild hypoxic ischaemic encephalopathy and long term neurodevelopmental outcome — A systematic review. *Early Hum Dev*. 2018 [cited 2022 Jun 28]; 120: 80–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496329/>.
18. Nanavati T, Seemaladine N, Regier M, Yossuck P, Pergami P. Can We Predict Functional Outcome in Neonates with Hypoxic Ischemic Encephalopathy by the Combination of Neuroimaging and Electroencephalography? *Pediatr Neonatol*. 2015 [cited 2022 Jun 28]; 56 (5): 307–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862075/>.
19. Polat M, Şimşek A, Tansuğ N, Sezer RG, Özkol M, Başpınar P, et al. Prediction of neurodevelopmental outcome in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013 [cited 2022 Jun 28]; 17 (3): 288–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231917/>.
20. Shellhaas RA, Kushwaha JS, Plegue MA, Selewski DT, Barks JDE. An Evaluation of Cerebral and Systemic Predictors of 18-Month Outcomes for Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *J Child Neurol*. 2015 [cited 2022 Jun 28]; 30 (11): 1526–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25724376/>.
21. Chang T, Du Plessis A. Neurodiagnostic techniques in neonatal critical care. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 12 (2): 145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22318538/>.
22. Van Laerhoven H, De Haan TR, Offringa M, Post B, Van Der Lee JH. Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics*. 2013 [cited 2022 Jun 29]; 131 (1): 88–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23248219/>.
23. Rasmussen LA, Cascio MA, Ferrand A, Shevell M, Racine E. The complexity of physicians' understanding and management of prognostic uncertainty in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinatol*. 2019 [cited 2022 Jun 29]; 39 (2): 278–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568164/>.
24. Natarajan N, Pardo AC. Challenges in neurologic prognostication after neonatal brain injury. *Semin Perinatol*. 2017 [cited 2022 Jun 29]; 41 (2): 117–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28139254/>.
25. Merchant N, Azzopardi D. Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 57 (S3): 8–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25800487/>.
26. Merhar SL, Chau V. Neuroimaging and Other Neurodiagnostic Tests in Neonatal Encephalopathy. *Clin Perinatol*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 43 (3): 511–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27524451/>.
27. Del Río R, Ochoa C, Alarcon A, Arnáez J, Blanco D, García-Alix A. Amplitude integrated electroencephalogram as a prognostic tool in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review. *PLoS One*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 11 (11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27802300/>.
28. Mizrahi EM. Neonatal seizures and neonatal epileptic syndromes. *Neurol Clin*. 2001 [cited 2022 Jun 29]; 19 (2): 427–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11358751/>.
29. Murray DM, Boylan GB, Ali I, Ryan CA, Murphy BP, Connolly S. Defining the gap between electrographic seizure burden, clinical expression and staff recognition of neonatal seizures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008 [cited 2022 Jun 29]; 93 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17626147/>.
30. Clancy RR, Legido A, Lewis D. Occult neonatal seizures. *Epilepsia*. 1988 [cited 2022 Jun 29]; 29 (3): 256–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30250303/>.

- pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3371282/.
31. Weeke LC, Boylan GB, Pressler RM, Hallberg B, Blennow M, Toet MC, et al. Role of EEG background activity, seizure burden and MRI in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016 [cited 2022 Jun 28]; 20 (6): 855–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370316/>.
  32. Gunn AJ, Wyatt JS, Whitelaw A, Barks J, Azzopardi D, Ballard R, et al. Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *J Pediatr*. 2008 [cited 2022 Jun 29]; 152 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18154900/>.
  33. Boudes E, Tan X, Saint-Martin C, Shevell M, Wintermark P. MRI obtained during versus after hypothermia in asphyxiated newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 100 (3): F238–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605620/>.
  34. Bonifacio SL, deVries LS, Groenendaal F. Impact of hypothermia on predictors of poor outcome: how do we decide to redirect care? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015 [cited 2022 Jun 29]; 20 (2): 122–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577654/>.
  35. Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K, et al. Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology*. 2013 [cited 2022 Jun 29]; 104 (3): 228–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24030160/>.
  36. Basu SK, Kaiser JR, Guffey D, Minard CG, Guillet R, Gunn AJ. Hypoglycaemia and hyperglycaemia are associated with unfavourable outcome in infants with hypoxic ischaemic encephalopathy: A post hoc analysis of the CoolCap Study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2016 [cited 2022 Jun 29]; 101 (2): F149–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26283669/>.
  37. Shah DK, Wusthoff CJ, Clarke P, Wyatt JS, Ramaiah SM, Dias RJ, et al. Electrographic seizures are associated with brain injury in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 99 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24443407/>.
  38. Sabir H, Jary S, Tooley J, Liu X, Thoresen M. Increased inspired oxygen in the first hours of life is associated with adverse outcome in newborns treated for perinatal asphyxia with therapeutic hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 29]; 161 (3): 409–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22521111/>.
  39. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M, Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation*. 2014 [cited 2022 Jun 29]; 85 (4): 567–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24361672/>.
  40. Uziel G, Ghezzi D, Zeviani M. Infantile mitochondrial encephalopathy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011 [cited 2022 Jun 29]; 16: 205–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620787/>.
  41. Bruyland M, Liebaers I, Sacre L, Vandeplas Y, De Meirleir L, Martin JJ. Neonatal myotubular myopathy with a probable X-linked inheritance: observations on a new family with a review of the literature. *J Neurol*. 1984 [cited 2022 Jun 29]; 231 (4): 220–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6512577/>.
  42. Danti FR, Galosi S, Romani M, Montomoli M, Carss KJ, Lucy Raymond F, et al. GNAO1 encephalopathy: Broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol Genet*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 3 (2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28357411/>.
  43. Solis GP, Kozhanova TV, Koval A, Zhilina SS, Mescheryakova TI, Abramov AA, et al. Pediatric Encephalopathy: Clinical, Biochemical and Cellular Insights into the Role of Gln52 of GNAO1 and GNAI1 for the Dominant Disease. *Cells*. 2021 [cited 2022 Jul 4]; 10 (10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34685729/>.
  44. Cuzzolin L, Zaccaron A, Fanos V. Unlicensed and off-label uses of drugs in paediatrics: a review of the literature. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 [cited 2022 Jun 30]; 17 (1): 125–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12588640/>.
  45. Robertson NJ, Thayyil S, B. Cady E, Raivich G. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in term perinatal asphyxial encephalopathy: from neuropathological correlates to future clinical applications. *Curr Pediatr Rev*. 2014 [cited 2022 Jun 30]; 10 (1): 37–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25055862/>.
  46. Massaro AN, Chang T, Kadom N, Tsuchida T, Scafidi J, Glass P, et al. Biomarkers of brain injury in neonatal encephalopathy treated with hypothermia. *J Pediatr*. 2012 [cited 2022 Jun 30]; 161 (3): 434–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22494878/>.
  47. Jones R, Heep A, Odd D. Biochemical and clinical predictors of hypoxic-ischemic encephalopathy after perinatal asphyxia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 31 (6): 791–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28274150/>.
  48. Fatemi A, Wilson MA, Johnston M V. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the Term Infant [Internet]. *Clinics in Perinatology*. *Clin Perinatol*. 2009 [cited 2022 Jun 30]; 36: 835–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19944838/>.
  49. Ennen CS, Huisman TAGM, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 [cited 2022 Jun 30]; 205 (3): 251.e1–251.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21784396/>.
  50. Kim HJ, Tsao JW, Stanfill AG. The current state of biomarkers of mild traumatic brain injury. *JCI insight*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 3 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29321373/>.
  51. Orrock JE, Panchapakesan K, Vezina G, Chang T, Harris K, Wang Y, et al. Association of brain injury and neonatal cytokine response during therapeutic hypothermia in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res*. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26717001/>.
  52. Tann CJ, Martinello KA, Sadoo S, Lawn JE, Seale AC, Vega-Poblete M, et al. Neonatal Encephalopathy With Group B Streptococcal Disease Worldwide: Systematic Review, Investigator Group Datasets, and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 65 (suppl\_2): S173–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117330/>.
  53. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy-Review of the literature to date and future directions for research. *Handb Clin Neurol*. 2019 [cited 2022 Jun 30]; 162: 281–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31324315/>.
  54. Alkholy UM, Abdalmonem N, Zaki A, Ali YF, Mohamed SA, Abdelsalam NI, et al. Early predictors of brain damage in full-term newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 [cited 2022 Jun 30]; 13: 2133–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28860770/>.
  55. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of brain injury in the premature infant. *Front Neurol*; 2013 [cited 2022 Jun 30]; 3 JAN. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23346073/>.
  56. Massaro AN, Wu YW, Bammler TK, Comstock B, Mathur A, McKinstry RC, et al. Plasma Biomarkers of Brain Injury in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 194: 67–75.e1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29478510/>.
  57. Shah DK, Ponnusamy V, Evanson J, Kapellou O, Ekitzidou G, Gupta N, et al. Raised plasma neurofilament light protein levels are associated with abnormal MRI outcomes in newborns undergoing therapeutic hypothermia. *Front Neurol*. 2018 [cited 2022 Jun 30]; 9 (MAR). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29556208/>.
  58. Sweetman DU, Orwuneme C, Watson WR, Murphy JFA, Molloy EJ. Perinatal Asphyxia and Erythropoietin and VEGF: Serial Serum and Cerebrospinal Fluid Responses. *Neonatology*. 2017 [cited 2022 Jul 4]; 111 (3): 253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27902983/>.
  59. Lv H, Wang Q, Wu S, Yang L, Ren P, Yang Y, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*. 2015 [cited 2022 Jul 4]; 450: 282–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320853/>.
  60. Hasslacher J, Lehner GF, Harler U, Beer R, Ulmer H, Kirchmair R,

- et al. Secretoneurin as a marker for hypoxic brain injury after cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med.* 2014 [cited 2022 Jul 4]; 40 (10): 1518–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138227/>.
61. Risso FM, Sannia A, Gavilanes DAW, Vles HJ, Colivicchi M, Ricotti A, et al. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 25 (SUPPL.4): 93–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958034/>.
  62. Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Merin Sigala ME, Barrera de León JC, Lemus-Varela M de L, Torres-Mendoza BM de G, et al. Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatr Neonatol.* 2017 [cited 2022 Jul 4]; 58 (1): 70–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27522459/>.
  63. Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Lupton AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr.* 2014 [cited 2022 Jul 4]; 164 (3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24332821/>.
  64. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, De Luca T, Assumma M, Signore F, et al. Umbilical cord interleukin-6 levels are elevated in term neonates with perinatal asphyxia. *Eur J Clin Invest.* 2003 [cited 2022 Jul 4]; 33 (4): 352–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12662167/>.
  65. Jenkins DD, Rollins LG, Perkel JK, Wagner CL, Katikaneni LP, Bass WT, et al. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 32 (10): 1888–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805873/>.
  66. Hou X, Yuan Z, Wang X, Cheng R, Zhou X, Qiu J. Peptidome analysis of cerebrospinal fluid in neonates with hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Brain.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 13 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008433/>.
  67. Zhu Y, Yun Y, Jin M, Li G, Li H, Miao P, et al. Identification of novel biomarkers for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using iTRAQ. *Ital J Pediatr.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 46 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448169/>.
  68. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2005 [cited 2022 Jul 4]; 105 (7): 2955–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598812/>.
  69. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009 [cited 2022 Jul 4]; 86 (3): 557–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451397/>.
  70. Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta JC, et al. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. *J Neurosci.* 2009 [cited 2022 Jul 4]; 29 (50): 15819–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20016097/>.
  71. Zhou Y, Bhatia I, Cai Z, He QY, Cheung PT, Chiu JF. Proteomic analysis of neonatal mouse brain: Evidence for hypoxia- and ischemia-induced dephosphorylation of collapsin response mediator proteins. *J Proteome Res.* 2008 [cited 2022 Jul 4]; 7 (6): 2507–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471005/>.
  72. Solberg R, Kuligowski J, Pankratov L, Escobar J, Quintás G, Liso I, et al. Changes of the plasma metabolome of newly born piglets subjected to postnatal hypoxia and resuscitation with air. *Pediatr Res.* 2016 [cited 2022 Jul 4]; 80 (2): 284–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055187/>.
  73. Li H, Kittur FS, Hung CY, Li PA, Ge X, Sane DC, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Beneficial Effects of Low Glucose on Neuronal Cell Survival in an in vitro Ischemic Penumbra Model. *Front Cell Neurosci.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33033473/>.
  74. Shi Y, Cai EL, Yang C, Ye CY, Zeng P, Wang XM, et al. Protection of melatonin against acidosis-induced neuronal injuries. *J Cell Mol Med.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 24 (12): 6928–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364678/>.
  75. Bjerkaug AU, Granslo HN, Klingenberg C. Metabolic responses in neonatal sepsis-A systematic review of human metabolomic studies. *Acta Paediatr.* 2021 [cited 2022 Jun 29]; 110 (8): 2316–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33851423/>.
  76. Beckstrom AC, Ricca RL, Gow KW, McAdams RM. Persistent posterior pneumomediastinum in a neonate. *Pediatr Int.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 54 (3): 441–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22631580/>.
  77. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008 [cited 2022 Jul 4]; 455 (7216): 1054–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18948945/>.
  78. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Griffin JL, Fanos V. Metabonomics: a new tool for the neonatologist. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 [cited 2022 Jul 4]; 22 (SUPPL. 3): 50–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19701858/>.
  79. Locci E, Noto A, Puddu M, Pomerio G, Demontis R, Dalmazzo C, et al. A longitudinal 1H-NMR metabolomics analysis of urine from newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing hypothermia therapy. *Clinical and medical legal insights. PLoS One.* 2018 [cited 2022 Jul 4]; 13 (4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668681/>.
  80. Sarafidis K, Efstathiou N, Begou O, Soubasi V, Agakidou E, Gika E, et al. Urine metabolomic profile in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Hippokratia.* 2017 [cited 2022 Jul 4]; 21 (2): 80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258280/>.
  81. Denihan NM, Kirwan JA, Walsh BH, Dunn WB, Broadhurst DI, Boylan GB, et al. Untargeted metabolomic analysis and pathway discovery in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 [cited 2022 Jul 4]; 39 (1): 147–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32448169/>.
  82. Jia Y, Jia X, Xu H, Gao L, Wei C, Li Y, et al. Blood Plasma Metabolic Profile of Newborns with Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy by GC-MS. *Biomed Res Int.* 2021 [cited 2022 Jul 4]; 2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258280/>.
  83. Reinke SN, Walsh BH, Boylan GB, Sykes BD, Kenny LC, Murray DM, et al. 1H NMR derived metabolomic profile of neonatal asphyxia in umbilical cord serum: implications for hypoxic ischemic encephalopathy. *J Proteome Res.* 2013 [cited 2022 Jul 4]; 12 (9): 4230–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931672/>.
  84. Longini M, Giglio S, Perrone S, Vivi A, Tassini M, Fanos V, et al. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine samples in preterm asphyctic newborn: a metabolomic approach. *Clin Chim Acta.* 2015 [cited 2022 Jul 4]; 444: 250–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25727514/>.
  85. Johnston M V. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 2005 [cited 2022 Jul 4]; 15 (3): 234–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16196390/>.
  86. Pietz J, Guttenberg N, Gluck L. Hypoxanthine: a marker for asphyxia. *Obstet Gynecol.* 1988 [cited 2022 Jul 4]; 72 (5): 762–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3140152/>.
  87. Penry JT, Manore MM. Choline: An important micronutrient for maximal endurance-exercise performance? *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2008 [cited 2022 Jul 4]; 18: 191–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18458362/>.
  88. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 [cited 2022 Jul 4]; 200 (4): 373–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420871/>.
  89. Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol.* 2012 [cited 2022 Jul 4]; 3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22654762/>.
  90. Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Peña E, Padró T, Jiménez-Xarrié E, et al. Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. *PLoS One.* 2016 [cited 2022 Jul 4]; 11 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26815842/>.
  91. Patz S, Trattning C, Grünbacher G, Ebner B, Güllü C, Novak A, et al. More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J Neurotrauma.* 2013 [cited 2022 Jul 4]; 30 (14): 1232–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23360174/>.

92. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Low neural exosomal levels of cellular survival factors in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015 [cited 2022 Jul 4]; 2 (7): 769–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273689/>.
93. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Miller BL, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology.* 2015 [cited 2022 Jul 4]; 85 (1): 40–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26062630/>.
94. Silachev DN, Goryunov KV, Plotnikov EY, Shevtsova YA, Babenko VA, Burov AA, et al. Urinary extracellular vesicles as markers for kidney diseases. *Pediatrics n.a. G.N. Speransky.* 2020 [cited 2022 Jul 4]; 99 (5): 154–63. Available from: <https://pediatrajournal.ru/archive?show=378&section=6017>. Russian.
95. Goetzl L, Merabova N, Darbinian N, Martirosyan D, Poletto E, Fugarolas K, et al. Diagnostic Potential of Neural Exosome Cargo as Biomarkers for Acute Brain Injury. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018 [cited 2022 Jul 4]; 5 (1): 4–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29376087/>.
96. Pineles B, Mani A, Sura L, Rossignol C, Albayram M, Weiss MD, et al. Neuronal exosome proteins: novel biomarkers for predicting neonatal response to therapeutic hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2022 [cited 2022 Jul 4]; 107 (1): F60–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34021027/>.
97. Chen S, Chen XC, Lou XH, Qian SQ, Ruan ZW. Determination of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a prognostic biomarker of acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta.* 2019 [cited 2022 Jul 4]; 492: 72–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30771300/>.
98. Plotnikov EY, Silachev DN, Pavlenko TA, Pavlova VS, Kryukov DS, Zubkov VV, et al. Acute kidney injury in newborns. From experiment to clinic. *Neonatologiya.* 2017; (4): 58–63. Russian.
99. Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, Lanahan A, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron.* 2003 [cited 2022 Jul 4]; 39 (3): 513–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12895424/>.