

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА ГИПОТЕРМИИ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАННОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ПО МЕТАБОЛОМУ КРОВИ

С. М. Эльдаров^{1,2}✉, Н. Л. Стародубцева¹, Ю. А. Шевцова^{1,2}, К. В. Горюнов¹, О. В. Ионов¹, Д. Н. Силачев^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета, Москва, Россия

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) — тяжелая неонатальная патология, вызывающая различные неврологические нарушения, одна из основных причин смертности доношенных детей. Ключевым методом лечения умеренной и тяжелой ГИЭ является терапевтическая гипотермия (ТГ) — снижение температуры тела новорожденных, которая существенно уменьшает риск летального исхода и способствует улучшению долгосрочных исходов у детей с ГИЭ. Однако для применения этого метода критически важна своевременная диагностика и определение тяжести заболевания, кроме того он имеет ряд ограничений и требований. Актуальны изучение механизма действия ТГ, поиск основных метаболических путей и потенциальных мишеней для терапии ГИЭ. Целью работы было с помощью методов ВЭЖХ-МС исследовать метаболом сухих пятен крови как менее инвазивной для пациента пробы для поиска маркеров и метаболических путей, наиболее активных при ТГ и, вероятно, опосредующих ее положительные эффекты. В результате были обнаружены изменения в классе фосфоглицеролипидов, что может свидетельствовать о важной роли метаболизма эндоканнабиноидов в защите организма от ГИЭ. Кроме того, были изменены пути метаболизма убихинона, ряда жирных кислот, а также желчных кислот. Таргетные количественные исследования данных метаболитов позволят оптимизировать диагностику ГИЭ и ее терапию на основе выявленных потенциальных мишеней.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, неонатальная асфиксия, метаболомика, диагностика, гипоксически-ишемическая энцефалопатия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Российского научного фонда – грант № 22-15-00454.

Вклад авторов: С. М. Эльдаров — пробоподготовка образцов, проведение ВЭЖХ-МС/МС, обработка хромато-масс-спектрометрических данных, написание и редактирование рукописи; Н. Л. Стародубцева — анализ метаболомных результатов, статистический анализ; написание и редактирование рукописи; Ю. А. Шевцова — проведение модельного эксперимента, получение и характеристика образцов, обсуждение результатов, написание и редактирование рукописи; К. В. Горюнов — проведение модельного эксперимента, получение и характеристика образцов, написание и редактирование рукописи; О. В. Ионов — планирование исследования, редактирование рукописи; Д. Н. Силачев — планирование исследования, обсуждение результатов, написание и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ (протокол № 8/22 от 12 июня 2022 г.). Исследование проводили в соответствии со стандартами этического комитета НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ и Хельсинкской декларации 1964 г.

✉ **Для корреспонденции:** Чупалав Максудович Эльдаров
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; me@chup4lav.ru

Статья получена: 03.12.2024 **Статья принята к печати:** 18.12.2024 **Опубликована онлайн:** 29.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.069

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF HYPOTHERMIA AFTER SIMULATED HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY BASED ON BLOOD METABOLOME

Eldarov SM^{1,2}✉, Starodubtseva NL¹, Shevtsova YuA^{1,2}, Goryunov KV¹, Ionov OV¹, Silachev DN^{1,2}

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

Hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) is a severe neonatal condition causing various neurological disorders and one of the main causes of mortality among full-term babies. Therapeutic hypothermia (TH), i.e. the newborn's body temperature decrease that significantly reduces the risk of fatality and contributes to improvement of long-term outcomes in infants with HIE is the key treatment method for moderate-to-severe HIE. However, the timely diagnosis and disease severity determination are crucial for this method to be used, and the method has a number of limitations and requirements. Assessment of the mechanism underlying the effects of TH and the search for the major metabolic pathways and potential targets for HIE therapy are relevant. The study aimed to assess metabolome of dried blood spots by HPLC-MS, since it is the least invasive to patients test for the search for markers and metabolic pathways most active in TH that are likely to mediate its positive effects. As a result, alterations in the class of phosphoglycerolipids were found, which suggests an important role of endocannabinoid metabolism in protection of the body against HIE. Furthermore, metabolic pathways of ubiquinone, certain fatty acids, and bile acids were altered. The targeted quantitative studies of these metabolites will make it possible to optimize HIE diagnosis and treatment based on the potential targets identified.

Keywords: mass spectrometry, neonatal asphyxia, metabolomics, diagnosis, hypoxic ischemic encephalopathy

Funding: the study was supported by the Russian Federation on behalf of the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00454).

Author contribution: Eldarov SM — sample preparation, conducting HPLC-MS/MS, chromatography–mass spectrometry data processing, manuscript writing and editing; Starodubtseva NL — metabolomic data analysis, statistical analysis; manuscript writing and editing; Shevtsova YuA — conducting the model experiment, sample acquisition and characterization, discussing the results, manuscript writing and editing; Goryunov KV — conducting the model experiment, sample acquisition and characterization, manuscript writing and editing; Ionov OV — study planning, manuscript editing; Silachev DN — study planning, discussing the results, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow State University (protocol No. 8/22 dated 12 June 2022). The study was compliant with the standards of the Ethics Committee of the Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, and the Declaration of Helsinki (1964).

✉ **Correspondence should be addressed:** Chupalav M. Eldarov
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; me@chup4lav.ru

Received: 03.12.2024 **Accepted:** 18.12.2024 **Published online:** 29.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.069

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) — это тяжелое неврологическое состояние, возникающее из-за нехватки кислорода и недостаточного кровоснабжения мозга новорожденного до или во время родов. Частота умеренных и тяжелых форм ГИЭ составляет 1–8 случаев на 1000 живорождений в странах с развитой медициной и не имеет тенденции к снижению. ГИЭ является причиной 6–9% случаев смертности новорожденных и 21–23% случаев смертности среди доношенных детей, а у 25% пострадавших развиваются серьезные неврологические нарушения (церебральный паралич, эпилепсия, судороги и задержка в развитии) [1].

Своевременная диагностика и точное определение степени тяжести ГИЭ критически важны для улучшения исходов и повышения качества жизни детей [2]. Терапевтическая гипотермия (ТГ) — это ключевой метод лечения умеренной и тяжелой ГИЭ, широко применяемый в отделениях интенсивной терапии. Данный подход существенно снижает риск летального исхода и способствует улучшению долгосрочных результатов у детей с ГИЭ [3].

Снижение температуры тела или головы в рамках ТГ замедляет метаболические процессы, снижает потребность нейронов в кислороде, уменьшает уровень оксидативного стресса и его медиаторов — глутамата и свободных радикалов. Кроме того, подавляется воспалительная реакция и предотвращается апоптоз клеток, что смягчает последствия первичного гипоксически-ишемического инсульта [4]. Однако для достижения оптимальных результатов необходимо начать ТГ в течение первых шести часов жизни (острая фаза гипоксически-ишемического повреждения), до активации вторичных механизмов повреждения, таких как воспаление и апоптоз [5]. К сожалению, несмотря на доказанную эффективность ТГ, около 20% новорожденных с умеренно-тяжелой или тяжелой ГИЭ не получают необходимого лечения из-за поздней диагностики [6]. ТГ имеет ряд ограничений, и ее применение может быть опасным при неправильной диагностике [7]. Это подчеркивает важность быстрого реагирования и совершенствования диагностических процедур в неонатологии, в том числе анализа биохимических маркеров, ассоциированных с повреждением головного мозга.

Поиск маркеров ГИЭ затруднен как низкой частотой данной патологии в популяции, так и сложностью разграничения с сопутствующими патологиями, например сепсисом и врожденными метаболическими нарушениями [2, 8]. Использование неинвазивных образцов (моча, кал) и малоинвазивных (кровь, сухие пятна крови) позволяет эффективно изучать динамику молекулярного состава биожидкостей. Остаточные образцы после рутинных процедур можно применять для дальнейших исследований без дополнительных вмешательств.

Для идентификации маркеров, связанных исключительно с повреждением мозга, проводят исследования в контролируемых условиях на модельных системах [8, 9]. Модель Райса–Ваннуччи, предложенная в 1981 г., наиболее часто используют как доклиническую модель для изучения ГИЭ и применяют в лабораториях по всему миру на протяжении последних четырех десятилетий [9, 10].

Омиксные технологии, объединяющие геномику, транскриптомику, протеомику и метаболомику, в значительной степени способствовали уточнению сложных патофизиологических механизмов, лежащих в основе ГИЭ. Данные процессы включают изменения

в энергетическом обмене клеток мозга, окислительный стресс, нарушение метаболизма нейротрансмиттеров и гормонов, а также апоптоз нейронов и активацию нейротрофических (защитных) механизмов [5, 8, 11–13]. Анализ метабололических изменений в сухих каплях крови с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) является перспективной стратегией для улучшения диагностики и прогнозирования ГИЭ у новорожденных. Совместно с методами многофакторного анализа метод ВЭЖХ-МС позволяет выделять целые паттерны биомолекул, специфичные для гипоксически-ишемического (ГИ) повреждения мозга [5].

Цель данного исследования — уточнение молекулярных механизмов и идентификация маркеров повреждения головного мозга, запускаемых при гипотермии при восстановлении после ГИ повреждения мозга на модифицированной модели Райса–Ваннуччи методом нецелевой метаболомики (ВЭЖХ-МС) сухих пятен крови в отрицательной моде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование ГИЭ

Протокол работы с животными был одобрен локальным этическим комитетом в соответствии с принципами Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA). Для экспериментов использовали аутбредных белых крыс, полученных из вивария НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ.

Для моделирования ГИ повреждения мозга применяли модифицированную модель Райса–Ваннуччи [26–27]. Семидневные крысята обоих полов были анестезированы 1%-м изофлюраном, после чего левая сонная артерия была хирургически изолирована и электрокоагулирована. Через 1,5 ч крысят помещали в CO₂-инкубатор (Binder; Туттлинген, Германия) с газовой смесью из 8% кислорода и 92% азота при 37 °C на 2 ч.

Терапевтическая гипотермия

Крыс случайным образом помещали в группы нормотермии и гипотермии сразу после окончания ГИ на 6 ч, после чего получали образцы сухих пятен крови. Всего в эксперименте участвовали три группы животных: контрольная группа ($n = 13$), крысы с ГИЭ и последующей шестичасовой гипотермией ($n = 16$), и крысы с ГИЭ и шестичасовой нормотермией ($n = 14$). Нормотермию поддерживали на уровне 37 °C, гипотермическое восстановление происходило при 30 °C. Крысят помещали в открытом контейнере на водяной бане для поддержания нужной температуры.

Отбор сухих пятен крови

Кровь у крысят брали через 6 ч после нормотермии/гипотермии из подключичной артерии и наносили по 40 мкл на тест-бланк из фильтровальной бумаги PerkinElmer 226. При нанесении крови на бланк следили за тем, чтобы кончик шприца не касался бумаги. После высыхания пятна крови проверяли на пригодность для анализа (площадь бумаги, пропитанная кровью, должна быть не менее 3 мм в диаметре). Образцы считали непригодными, если площадь пятна крови была недостаточной, а в случае небольших образцов — если кровь не пропитала бумагу насковозь.

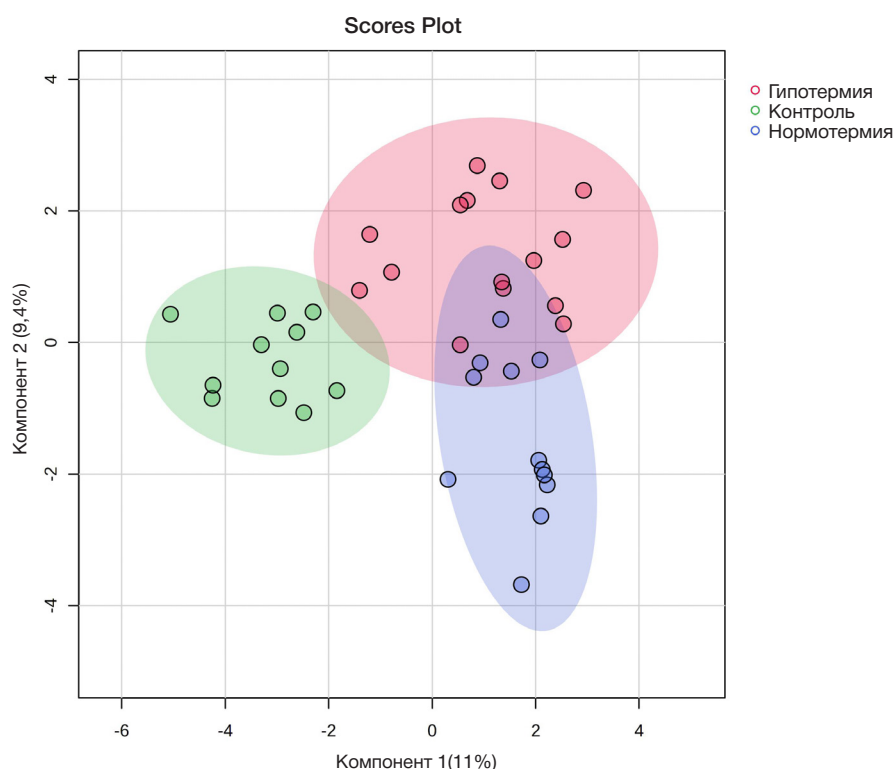


Рис. 1. Результаты многомерного статистического анализа трех исследованных групп животных методом sPLS-DA

Пятна считали также непригодными, если в образце присутствовали микросгустки, указывающие на то, что пятно было неоднородно распределено по бумаге.

Приготовление образцов для ВЭЖХ-МС-анализа

Метаболиты из сухих пятен крови экстрагировали методом Фолча [14]. К каждому образцу (три круглых фрагмента сухого пятна крови диаметром 5 мм каждый) добавляли 480 мкл смеси хлороформа и метанола (в соотношении 2 : 1) и 250 мкл воды. Экстракционную смесь вортексировали 10 мин, а затем центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин. Органическую фазу (150 мл) из нижней части эппендорфа переносили в отдельную пробирку. Этот этап экстракции повторяли с добавлением еще одной порции смеси хлороформ–метанол. 100 мкл органической фазы после второго центрифугирования смешивали с ранее собранной. Полученную смесь высушивали в струе азота при комнатной температуре, а затем повторно растворяли в 100 мл смеси ацетонитрила и изопропанола (в соотношении 1 : 1).

ВЭЖХ-МС-анализ и идентификация веществ

Последующий анализ проводили методом ВЭЖХ-МС. Для хроматографического разделения сложной смеси веществ использовали обратнофазную колонку Atlantis T3 C18 (зерно 3 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 1 мм; Waters, Милфорд, Массачусетс, США) и хроматограф Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Scientific; Уолтем, Массачусетс, США) [30–31]. Подвижная фаза «А» состояла из смеси ACN : H₂O (60 : 40), а подвижная фаза «В» — из IPA : ACN : H₂O (90 : 8 : 2). Обе фазы содержали модификаторы (0,1% муравьиной кислоты и 5 мм формиата аммония). Элюирование проводили с градиентом подвижной фазы «В» при скорости потока 40 мкл/мин: 0–0,5 мин при 10%, затем 20-минутный градиент от 10% до 99%. Затем проводили

10-минутную промывку 99%-й концентрацией фазы «В», после чего фазу возвращали к ее начальной концентрации (10% от фазы «В») в течение 1 мин и уравнивали колонку 3 мин. Общее время хроматографии для каждого образца составило 34,5 мин при скорости потока 40 мкл/мин и температуре колонки 50 °С. Метаболиты определяли с помощью гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics; Бремен, Германия), с двумя повторами на образец при следующих параметрах прибора: напряжение на капиллярах — 4500 В; давление небулайзера — 0,6 Па, расход осушающего газа — 5,0 л/мин при 200 °С. Масс-спектры были получены с разрешением 50 000 в диапазоне 50–1700 m/z при отрицательной полярности.

Обнаружение пиков, группировка и коррекция времени удерживания были выполнены с использованием программного пакета xcms. Алгоритм Centwave был использован для детекции пиков с определенными параметрами: максимальное отклонение m/z составляет 15 ppm, а ширина пика — 10–45 с. Группировку пиков выполняли методом Peak Density с параметрами по умолчанию [15–16]. Идентификацию метаболитов проводили на основе базы данных Human Metabolome (<https://www.hmdb.ca>).

Статистические методы

Для выявления и визуализации различий между группами был проведен многомерный статистический анализ с использованием метода наименьших квадратов (sPLS-DA) для нескольких групп и ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA) для парного сравнения в составе пакета Metaboanalyst 6.0.0 (<https://metaboanalyst.ca>). Статистическую значимость различий в относительных концентрациях (средних интегральных площадях пиков) конкретных метаболитов между группами оценивали с помощью *t*-критерия, при этом значение *p*

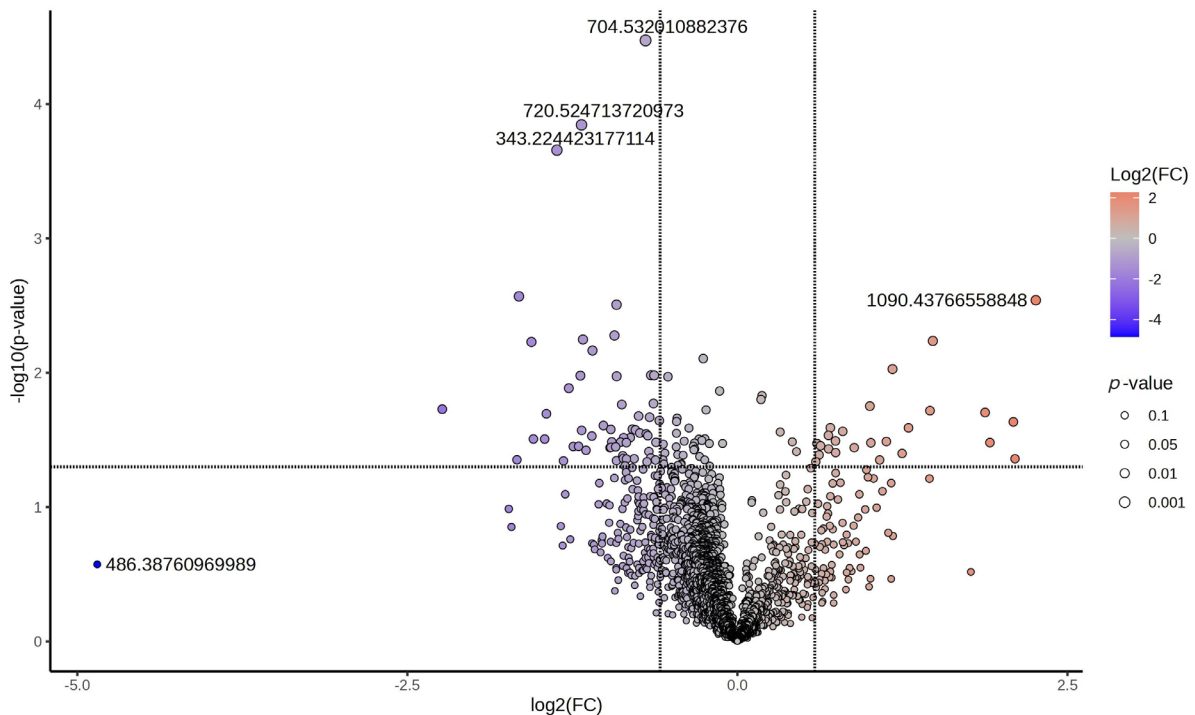


Рис. 2. Результаты парного одномерного статистического анализа метаболома сухих пятен крови группы гипотермичных и нормотермичных животных

менее 0,05 считали статистически значимым. В качестве дополнительного критерия для идентификации потенциальных биомаркеров кратность изменения была ограничена значением 1,5. Анализ путей обогащения проводили с использованием функции анализа избыточной репрезентативности пакета Metaboanalyst 6.0.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ масс-спектров, выполненный в режиме регистрации отрицательных ионов, позволил выявить 3425 молекулярных ионов. Для оценки различий между группами животных был применен многомерный статистический метод частичных наименьших квадратов (sPLS-DA). На основании результатов, представленных на рис. 1, наблюдается четкое разделение групп, что указывает на значимые метаболические изменения, характерные для каждой из них. Это подчеркивает наличие специфических молекулярных различий, лежащих в основе разделяющих факторов (рис. 2).

Для поиска потенциальных метаболических биомаркеров нами был проведен парный одномерный статистический анализ пары нормотермия-гипотермия (рис. 2). Всего обнаружено 55 молекулярных ионов, из которых 27 демонстрировали повышение концентрации в образцах животных, подвергшихся гипотермии, по сравнению с группой нормотермии. В то же время концентрация 28 молекулярных ионов была снижена. Учитывали только статистически значимые изменения уровней концентрации (не менее чем в 1,5 раза, при уровне значимости $p < 0,05$). Идентификацию выявленных соединений производили с использованием баз данных LIPID MAPS и HMDB, результаты представлены в табл. 1. Полученные данные указывают на существенные изменения в метаболизме фосфоэтанолламинов и фосфатидных кислот при гипотермии в сравнении с нормотермией, тогда как уровни жирных кислот остались относительно стабильными. Для расширенного анализа был применен метод многомерной

статистики — ортогональные частичные наименьшие квадраты (OPLS), что позволило выявить четкое разделение групп нормотермии и гипотермии. Результаты подтверждают наличие значимых метаболических различий между этими физиологическими состояниями (рис. 3). По результатам анализа были отобраны (топ-200) молекулярные ионы, которые внесли наибольший вклад в разделение групп (VIP score >1), для них были проведены идентификация и поиск наиболее вовлеченных метаболических путей по базе данных SMPDB. При гипотермии были идентифицированы изменения активности путей биосинтеза желчных кислот, убихинона и плазмалогенов, а также метаболизма ряда жирных кислот, эстрогенов и андрогенов (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГИЭ является одной из главных причин неврологических отклонений, а также неонатальной смертности. Ишемия с последующей гипоксией приводит к гибели нейронов в течение 12–36 ч, что делает своевременную диагностику ГИЭ и оценку тяжести повреждений одним из важных факторов для успешного прогнозирования исхода и подбора адекватной терапии. Стандартными методами диагностики ГИЭ являются МРТ и аЭЭГ головного мозга, которые позволяют в некоторой степени оценить физические и функциональные повреждения мозга. Однако информативность этих методов ограничена: так, МРТ зачастую невозможна при тяжелых состояниях новорожденного, сопряжена с необходимостью седации и проводится спустя сутки и более после рождения, а аЭЭГ не обладает достаточной чувствительностью для ранней диагностики. Кроме того, данные методы не содержат количественных маркеров, позволяющих достоверно оценить степень тяжести ГИЭ, соответственно, прогнозирование исходов остается нетривиальной задачей.

В то же время одним из основных методов терапии ГИЭ является терапевтическая гипотермия, при которой

Таблица 1. Список потенциальных биомаркеров, статистически значимо отличающихся между группами терапевтической гипотермии и контроля

m/z	Название	Кратность изменений	Аддукт
294,157	CAR 6:0	2,32	[M+Cl]-
343,224	17-HDoHE	-2,34	M-H
353,308	FA 22:1;O	-4,58	[M-H]-
611,385	PA 30:4	-2,78	[M-H]-
677,386	PA 32:3	-2,09	[M+Cl]-
720,524	PS O-32:0	-1,9	[M-H]-
750,475	PE 36:6-OH	-2,42	M-H
802,503	PE 40:8-OH	2,26	M-H
812,523	PE 42:9	2,13	M-H
826,501	PE 42:10-OH	2,4	M-H
829,52	PG 38:4-2OH	3,09	M-H
833,478	PA 40:5-3OH	-1,6	M+Cl
841,577	PG 38:0	-2,64	[M+Cl]-
856,601	PE 42:3-2OH	-3,16	M-H
873,621	PA 46:3	-2,14	M+Cl
878,53	PE 40:4-3OH	4,01	M+Cl
883,471	PGP 36:3-2OH	3,68	M-H
885,485	PI 16:2-2OH	1,7	M-H
933,672	TG 56:5	-2,32	M+Cl
952,447	MIPC 29:2;O5	-2,55	M+Cl
953,468	PGP 40:6-OH	1,71	M+Cl
1021,451	PIP 36:4-3OH	1,68	M+Cl
627,343	LysoPI 20:0	0,63325	M-H
704,532	PE-Nme 32:0	0,66455	M-H
803,506	PA 40:3-O	1,9181	M+Cl
838,536	PE 44:10	3,5626	M-H
854,53	PE 44:10-OH	2,1599	M-H
902,476	PS 42:10-3OH	0,59297	M-H

голова новорожденного охлаждается до 32–35 °C на 48–72 ч. Для достижения нейропротекторного эффекта процедуру необходимо начинать в первые 6 ч жизни новорожденного. Один из методов ранней диагностики ГИЭ — исследование биомаркеров крови, поскольку ГИЭ сопряжено с повреждениями не только мозга, но и сердца, печени и других органов, что вызывает изменения их метаболизма. Изучая изменения биомаркеров крови в динамике, возможно соотнести изменения с развивающимися повреждениями и ответом организма, адаптируя в дальнейшем получаемую пациентом терапию под эти изменения. Ранее было показано использование изменений провоспалительных и иных маркеров в крови для диагностики ГИЭ. В то время как взятие венозной крови для последующего исследования является золотым стандартом в медицине, этот метод сопряжен с рядом неудобств в силу его инвазивности, необходимости обучения персонала и сложности обеспечения условий хранения и транспортировки собранных образцов. Особенно это актуально в случае работы с новорожденными с тяжелыми патологиями. В нашей работе для исследования метаболома мы использовали сухие пятна крови. Данный метод, являющийся одним из способов микросемплирования (отбора малых доз) крови, получает все большее распространение в силу малой инвазивности, простоты протокола и удобства хранения коллекций собранного материала. Для использования метода важно оценить, насколько эффективно его использование для выявления ранних биомаркеров крови.

Использование методов многомерного статистического анализа выявило заметные различия не только по сравнению с интактной группой, но и между группами нормотермии и гипотермии (рис. 2), что отражает изменения метаболизма при ГИЭ и при ГИЭ в условиях нормотермии. Парный статистический анализ с последующей идентификацией позволил выявить изменения в классах фосфатидных кислот (PA), фосфатидинозитолов (PI) и фосфатидилэтаноламинов (PE), которые относятся к глицерофосфолипидам, а также триглицеридам и ацилкарнитинам. При этом выявлено повышение концентрации PI. Согласно литературным данным, ишемия мозга приводит к деградации PI и диацилглицеролов. Таким образом, увеличение пула PI и фосфатидмилинозитолфосфата в группе с терапевтической гипотермией может свидетельствовать об ингибировании процессов его деградации при гипотермии, что оказывает нейропротекторный эффект. В группе гипотермии наблюдалось также повышение концентрации короткоцепочечных ацилкарнитинов (C6). Ранее на клеточной модели было показано, что короткоцепочечные ацилкарнитины усиливают экспрессию генов, связанных с антиоксидантной активностью в условиях окислительного стресса [17]. Что касается фосфатидных кислот, то они являются мессенджерами и интермедиатами других глицеролипидов, таких как PE и фосфатидилсерина (PS) [18]. В группе нормотермии можно видеть снижение концентрации интермедиатов в виде фосфатидных кислот и повышение PE и PS. В свою очередь, PE

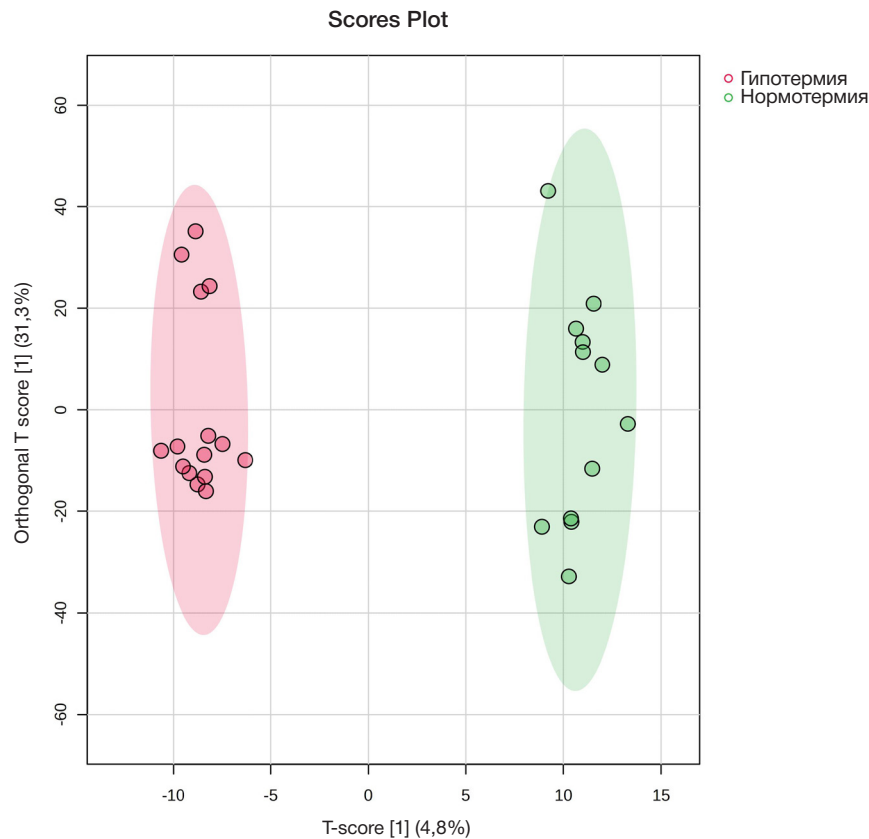


Рис. 3. Разделение групп при многомерном статистическом анализе методом ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA)

являются предшественниками ряда эндоканнабиноидов, нейропротекторная роль которых хорошо известна [19–22]. Таким образом, применение терапевтической гипотермии привело к повышению концентрации ряда метаболитов, ассоциированных со снижением окислительного стресса от ишемии-реперфузии и нейропротекторами, а также их предшественниками, что определенно может снижать общий уровень повреждений от ГИЭ.

В рамках исследования были также проанализированы основные метаболические пути, изменяющиеся при гипотермии по сравнению с группой нормотермии. Для этого были идентифицированы молекулярные ионы, внесшие наибольший вклад в различие между группами в модели многомерного статистического анализа OPLS-DA (VIP, 200 наиболее «весомых» молекулярных ионов), и выявлены метаболические пути, к которым они относятся. В число наиболее вовлеченных путей вошли синтез убихинона, желчных кислот, ненасыщенных жирных кислот и плазмалогенов (табл. 2). Наличие в списке желчных кислот может показаться необычным, однако в ряде работ ранее уже было показано, что желчные кислоты могут проходить гематоэнцефалический барьер, выполняя важные функции мессенджеров и нейромодуляторов [23–24]. Желчные кислоты обладают

нейропротекторными свойствами, attenuируя воспаление и последствия окислительного стресса, такие как апоптоз [23–24], что особенно интересно в контексте обширного окислительного стресса от ишемии-реперфузии при ГИЭ [25–27]. То же можно сказать и о ненасыщенных жирных кислотах — как линолевая, так и альфа-линоленовая жирные кислоты играют важную роль в реагировании и адаптации организма к острой ишемии путем регуляции нейронных сигнальных путей с помощью оксипинов — окисленных производных [28], проявляют выраженные нейропротекторные и даже антидепрессантные свойства [29]. Что же касается убихинона, то его роль в защите от окислительного стресса широко известна ([30] и др.).

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе нашего исследования был выявлен ряд изменений метаболома при применении метода терапевтической гипотермии, который указывает на смягчение повреждений мозга, вызванных ГИЭ, одновременно с включением путей, отвечающих за синтез различных нейропротекторов и нейромодуляторов. Эти результаты подтверждают представление о терапевтической

Таблица 2. Метаболические пути, в наибольшей степени обуславливающие различия между группами нормотермии и терапевтической гипотермии, согласно данным OPLS-DA

Название	Совпадений	P-value
Биосинтез желчных кислот	4	0,0016
Биосинтез убихинона	2	0,0125
Метаболизм альфа-линоленовой и линолевой кислот	1	0,143
Синтез Плазмалогенов	1	0,211
Метаболизм эстрогенов и андрогенов	1	0,261

гипотермии, как об эффективном методе терапии последствий ГИЭ. Использование масс-спектрометрии позволяет получить информацию об изменениях метаболизма уже в первые несколько часов после родов. В то же время таргетные количественные исследования

выявленных метаболитов — глицерофосфолипидов, желчных кислот и других — у пациентов с различной степенью тяжести ГИЭ может позволить выработать эффективную систему ранней классификации тяжести ГИЭ и прогнозирования исходов.

Литература

1. Törn AE, Hesselman S, Johansen K, Ågren J, Wikström A-K, Jonsson M. Outcomes in Children after Mild Neonatal Hypoxic Ischaemic Encephalopathy: A Population-Based Cohort Study. *BJOG Int. J Obstet Gynaecol.* 2023.
2. Caramelo I, Coelho M, Rosado M, Cardoso CMP, Dinis A, Duarte CB, et al. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *World J Pediatr.* 2023; 19: 505–48.
3. Abate BB, Bimerew M, Gebremichael B, Mengesha Kassie A, Kassaw M, Gebremeskel T, et al. Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *PLoS One.* 2021; 16 (2); e0247229.
4. Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY. Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci.* 2019; 13: 586.
5. Korf JM, McCullough LD, Caretti V. A narrative review on treatment strategies for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Transl Pediatr.* 2023; 12: 1552–71.
6. DuPont TL, Chalak LF, Morriss MC, Burchfield PJ, Christie L, Sánchez PJ. Short-Term Outcomes of Newborns with Perinatal Acidemia Who Are Not Eligible for Systemic Hypothermia Therapy. *J Pediatr.* 2013; 162: 35–41.
7. Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective Research on Infants with Mild Encephalopathy: The PRIME Study. *J Perinatol.* 2018; 38: 80–85.
8. She HQ, Sun YF, Chen L, Xiao QX, Luo BY, Zhou HS, et al. Current analysis of hypoxic-ischemic encephalopathy research issues and future treatment modalities. *Front Neurosci.* 2023; 17: 1136500.
9. Landucci E, Pellegrini-Giampietro DE, Facchinetti F. Experimental Models for Testing the Efficacy of Pharmacological Treatments for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Biomedicines.* 2022; 10 (5): 937.
10. Tokareva A, Starodubtseva N, Frankevich V, Silachev D. Minimizing Cohort Discrepancies: A Comparative Analysis of Data Normalization Approaches in Biomarker Research. *Computation.* 2024; 12: 137.
11. Eldarov C, Starodubtseva N, Shevtsova Y, Goryunov K, Ionov O, Frankevich V, et al. Dried Blood Spot Metabolome Features of Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: A Neonatal Rat Model *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 8903.
12. Shevtsova Y, Starodubtseva N, Tokareva A, Goryunov K, Sadekova A, Vedikhina I, et al. Metabolite Biomarkers for Early Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: An Experimental Study Using the NeoBase 2 MSMS Kit in a Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 2035.
13. Shevtsova Y, Eldarov C, Starodubtseva N, Goryunov K, Chagovets V, Ionov O, et al. Identification of Metabolomic Signatures for Ischemic Hypoxic Encephalopathy Using a Neonatal Rat Model. *Children.* 2023; 10: 1693.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497–509.
15. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization Methods for Reducing Interbatch Effect without Quality Control Samples in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Studies. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413: 3479–86.
16. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Comparison of the Effectiveness of Variable Selection Method for Creating a Diagnostic Panel of Biomarkers for Mass Spectrometric Lipidome Analysis. *J Mass Spectrom.* 2021; 56: e4702.
17. Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, et al. Antioxidant effect of l-carnitine and its short chain esters: Relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *International Journal of Cardiology.* 2006; 54–60.
18. Fantini J, Yahi N. Chapter 3 — Lipid Metabolism and Oxidation in Neurons and Glial Cells. In: Jacques Fantini, Nouara Yahi, editors. *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease.* Academic Press, 2015; p. 53–85.
19. Hahnefeld L, Vogel A, Gurke R, Geisslinger G, Schäfer MKE, Tegeder I. Phosphatidylethanolamine Deficiency and Triglyceride Overload in Perilesional Cortex Contribute to Non-Goal-Directed Hyperactivity after Traumatic Brain Injury in Mice. *Biomedicines.* 2022; 10: 914.
20. Duranti A, Beldarrain G, Álvarez A, Sbriscia M, Carloni S, Balduini W. et al. The Endocannabinoid System as a Target for Neuroprotection/Neuroregeneration in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biomedicines.* 2022; 11 (1): 28.
21. Sagredo O, Palazuelos J, Gutierrez-Rodríguez A, Satta V, Galve-Roperh I, Martínez-Orgado J. Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochem Pharmacol.* 2018; 157: 85–96.
22. Fernández-Ruiz J, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: From preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics.* 2015; 12: 793–806.
23. Xing C, Huang X, Wang D, et al. Roles of bile acids signaling in neuromodulation under physiological and pathological conditions. *Cell Biosci.* 2023; 13: 106.
24. Yeo Xin Yi, Tan Li Yang, Chae Woo Ri, Lee Dong-Yup, Lee Yong-An, Wuestefeld Torsten. Liver's influence on the brain through the action of bile acids. *Frontiers in Neuroscience.* 2023; 17.
25. Kletkiewicz H., Wojciechowski MS., Rogalska J. Cannabidiol effectively prevents oxidative stress and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1α) in an animal model of global hypoxia. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 15952.
26. Kong W, Lu C. Role of mitochondria in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Histol Histopathol.* 2024; 39 (8): 991–1000.
27. Baldari B, De Simone S, Cipolloni L, Frisoni P, Alfieri L, D'Errico S, et al. Oxidative Stress Markers in Human Brain and Placenta May Reveal the Timing of Hypoxic-Ischemic Injury: Evidence from an Immunohistochemical Study. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (15): 12221.
28. Hennebelle M, Zhang Z, Metherel AH, et al. Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission. *Sci Rep.* 2017; 7: 4342.
29. Blondeau N, Lipsky RH, Bourourou M, Duncan MW, Gorelick PB, Marini AM, Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties — Ready for Use in the Stroke Clinic? *BioMed Research International.* 2015; 519830.
30. Obolenskaia ON, Gorodetskaia EA, Kalenikova EI, Belousova MA, Gulyaev MV, Makarov VG, et al. Intravenous Administration of Coenzyme Q10 in Acute Period of Cerebral Ischemia Decreases Mortality by Reducing Brain Necrosis and Limiting Its Increase within 4 Days in Rat Stroke Model. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (12): 1240.

References

- Törn AE, Hesselman S, Johansen K, Ågren J, Wikström A-K, Jonsson M. Outcomes in Children after Mild Neonatal Hypoxic Ischaemic Encephalopathy: A Population-Based Cohort Study. *BJOG Int. J Obstet Gynaecol.* 2023.
- Caramelo I, Coelho M, Rosado M, Cardoso CMP, Dinis A, Duarte CB, et al. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *World J Pediatr.* 2023; 19: 505–48.
- Abate BB, Bimerew M, Gebremichael B, Mengesha Kassie A, Kassaw M, Gebremeskel T, et al. Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *PLoS One.* 2021; 16 (2): e0247229.
- Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY. Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci.* 2019; 13: 586.
- Korf JM, McCullough LD, Caretti V. A narrative review on treatment strategies for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Transl Pediatr.* 2023; 12: 1552–71.
- DuPont TL, Chalak LF, Morriss MC, Burchfield PJ, Christie L, Sánchez PJ. Short-Term Outcomes of Newborns with Perinatal Acidemia Who Are Not Eligible for Systemic Hypothermia Therapy. *J Pediatr.* 2013; 162: 35–41.
- Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective Research on Infants with Mild Encephalopathy: The PRIME Study. *J Perinatol.* 2018; 38: 80–85.
- She HQ, Sun YF, Chen L, Xiao QX, Luo BY, Zhou HS, et al. Current analysis of hypoxic-ischemic encephalopathy research issues and future treatment modalities. *Front Neurosci.* 2023; 17: 1136500.
- Landucci E, Pellegrini-Giampietro DE, Facchinetti F. Experimental Models for Testing the Efficacy of Pharmacological Treatments for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Biomedicines.* 2022; 10 (5): 937.
- Tokareva A, Starodubtseva N, Frankevich V, Silachev D. Minimizing Cohort Discrepancies: A Comparative Analysis of Data Normalization Approaches in Biomarker Research. *Computation.* 2024; 12: 137.
- Eldarov C, Starodubtseva N, Shevtsova Y, Goryunov K, Ionov O, Frankevich V, et al. Dried Blood Spot Metabolome Features of Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: A Neonatal Rat Model *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 8903.
- Shevtsova Y, Starodubtseva N, Tokareva A, Goryunov K, Sadekova A, Vedikhina I, et al. Metabolite Biomarkers for Early Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: An Experimental Study Using the NeoBase 2 MSMS Kit in a Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 2035.
- Shevtsova Y, Eldarov C, Starodubtseva N, Goryunov K, Chagovets V, Ionov O, et al. Identification of Metabolomic Signatures for Ischemic Hypoxic Encephalopathy Using a Neonatal Rat Model. *Children.* 2023; 10: 1693.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497–509.
- Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization Methods for Reducing Interbatch Effect without Quality Control Samples in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Studies. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413: 3479–86.
- Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Comparison of the Effectiveness of Variable Selection Method for Creating a Diagnostic Panel of Biomarkers for Mass Spectrometric Lipidome Analysis. *J Mass Spectrom.* 2021; 56: e4702.
- Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: Relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *International Journal of Cardiology.* 2006; 54–60.
- Fantini J, Yahi N. Chapter 3 — Lipid Metabolism and Oxidation in Neurons and Glial Cells. In: Jacques Fantini, Nouara Yahi, editors. *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease.* Academic Press, 2015; p. 53–85.
- Hahnefeld L, Vogel A, Gurke R, Geisslinger G, Schäfer MKE, Tegeder I. Phosphatidylethanolamine Deficiency and Triglyceride Overload in Perilesional Cortex Contribute to Non-Goal-Directed Hyperactivity after Traumatic Brain Injury in Mice. *Biomedicines.* 2022; 10: 914.
- Duranti A, Beldarrain G, Álvarez A, Sbriscia M, Carloni S, Balduini W, et al. The Endocannabinoid System as a Target for Neuroprotection/Neuroregeneration in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biomedicines.* 2022; 11 (1): 28.
- Sagredo O, Palazuelos J, Gutierrez-Rodriguez A, Satta V, Galve-Roperh I, Martínez-Orgado J. Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochem Pharmacol.* 2018; 157: 85–96.
- Fernández-Ruiz J, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: From preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics.* 2015; 12: 793–806.
- Xing C, Huang X, Wang D, et al. Roles of bile acids signaling in neuromodulation under physiological and pathological conditions. *Cell Biosci.* 2023; 13: 106.
- Yeo Xin Yi, Tan Li Yang, Chae Woo Ri, Lee Dong-Yup, Lee Yong-An, Wuestefeld Torsten. Liver's influence on the brain through the action of bile acids. *Frontiers in Neuroscience.* 2023; 17.
- Kletkiewicz H., Wojciechowski MS., Rogalska J. Cannabidiol effectively prevents oxidative stress and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in an animal model of global hypoxia. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 15952.
- Kong W, Lu C. Role of mitochondria in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Histol Histopathol.* 2024; 39 (8): 991–1000.
- Baldari B, De Simone S, Cipolloni L, Frisoni P, Alfieri L, D'Errico S, et al. Oxidative Stress Markers in Human Brain and Placenta May Reveal the Timing of Hypoxic-Ischemic Injury: Evidence from an Immunohistochemical Study. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (15): 12221.
- Hennebelle M, Zhang Z, Metherell AH, et al. Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission. *Sci Rep.* 2017; 7: 4342.
- Blondeau N, Lipsky RH, Bourourou M, Duncan MW, Gorelick PB, Marini AM, Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties — Ready for Use in the Stroke Clinic? *BioMed Research International.* 2015; 519830.
- Obolenskaia ON, Gorodetskaya EA, Kalenikova EI, Belousova MA, Gulyaev MV, Makarov VG, et al. Intravenous Administration of Coenzyme Q10 in Acute Period of Cerebral Ischemia Decreases Mortality by Reducing Brain Necrosis and Limiting Its Increase within 4 Days in Rat Stroke Model. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (12): 1240.