



ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ СУТОК ЖИЗНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РАННИХ МАРКЕРОВ ПНЕВМОНИИ И СЕПСИСА

© 2019 г. Ч. М. Эльдаров*, И. В. Никитина*, А. Р. Киртбая*, В. В. Чаговец*,
О. В. Ионов*, М. Ю. Бобров*, **, #

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Россия, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

**ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

Поступила в редакцию 20.08.2018 г.

После доработки 21.09.2018 г.

Принята к публикации 01.10.2018 г.

Ранний период постнатального развития недоношенных детей часто осложняется бактериальными инфекциями, в частности инфекциями органов дыхания, которые при неблагоприятном течении могут трансформироваться в генерализованные формы (сепсис), приводящие к угрожающим жизни состояниям. Развитие данных осложнений может быть связано с несвоевременной постановкой диагноза и отложенным началом целенаправленной терапии. Таким образом, разработка новых подходов диагностики воспалительных патологических процессов, особенно в первые часы жизни новорожденного, является актуальным направлением исследований в современной неонатологии. В работе проведено профилирование липидов плазмы крови новорожденных недоношенных детей первых суток жизни для выявления потенциальных маркеров воспалительных процессов. К исследованию привлекли три группы пациентов, у которых в раннем постнатальном периоде была диагностирована пневмония, пневмония, осложненная сепсисом, или респираторный дистресс-синдром. В результате ВЭЖХ-МС-анализа липидных экстрактов плазмы крови были получены характерные молекулярные профили, позволившие выявить достоверные отличия между исследуемыми группами. Анализ молекулярного состава выявил дифференциальную представленность в соответствующих группах таких классов липидов, как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, ди- и триглицериды, сфинголипиды, лизофосфолипиды. Полученные нами результаты могут свидетельствовать о том, что воспалительный процесс на локальном и системном уровне влияет на обмен липидов и на их представленность в плазме крови. При этом, каждая патология – сепсис, пневмония или РДС – имеет свои особенности липидного профиля, исследование которых может позволить не только идентифицировать воспаление как таковое, но и дифференцировать связанные с ним заболевания между собой.

Ключевые слова: липиды, сепсис, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, недоношенность

DOI: 10.1134/S0132342319020039

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные инфекции у глубоко недоношенных детей имеют склонность к быстрой генерализации и тяжелому течению в силу недостаточного формирования компонентов врожденно-

го иммунитета на ранних сроках гестации. В частности, пневмония и сопутствующий ей сепсис являются одной из причин возникновения угрожающих жизни состояний при недоношенности. Развитие данных осложнений может быть вызвано отсроченной постановкой диагноза и, как следствие, поздним началом целенаправленной терапии [1].

Ранняя диагностика септического процесса у недоношенных новорожденных достаточно сложна ввиду неспецифического характера клинических симптомов, отсутствия надежных диагностических биомаркеров. Основными методами обследования новорожденных детей при подозрении

Сокращения: РДС – респираторный дистресс-синдром; HPLC – жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий; PCA – анализ методом главных компонент (Principal component analysis); DG, TG – ди- и триглицериды; PE – фосфатидилэтаноламины; PC – фосфатидилхолины; PC-O – алкилфосфатидилхолины; PC-P – алкенилфосфатидилхолины; SM – сфингомиелины; LPC – лизофосфатидилхолины; PE-P – плазмалогены.

Автор для связи (тел: +7 (903) 251-86-77, эл. почта: mbobr@mail.ru).

на развитие сепсиса в настоящее время являются микробиологические (посев крови на стерильность), клиничко-лабораторные (клинический анализ крови с определением количества лейкоцитов и нейтрофилов в периферической крови, подсчет нейтрофильного индекса, определение белков острой фазы воспаления) и инструментальные (рентгенологическое исследование органов грудной полости) [2]. Анализ гемокультуры, считающийся на сегодняшний день “золотым стандартом” в диагностике септических состояний, имеет низкую чувствительность и требует длительного времени для проведения исследования. Частота обнаружения возбудителя в крови у больных с сепсисом по данным различных авторов не превышает 45%, а отсутствие бактериемии не исключает развития сепсиса при наличии основных критериев этого заболевания [3, 4]. В случае выявления возбудителя сепсиса у новорожденных, как правило, требуется не менее 48 ч для идентификации вида и определения чувствительности к антибиотикам. Кроме этого, учитывая незначительное количество возбудителя в кровотоке у новорожденных, прямое определение микроорганизмов в крови может иметь недостаточную чувствительность для ранней диагностики [5, 6].

Таким образом, разработка альтернативных подходов диагностики развития воспалительных патологических процессов, особенно в первые часы жизни новорожденного, является актуальным направлением исследований в современной неонатологии.

В последние годы значительный интерес проявляется к профилированию белков и метаболитов в плазме крови человека с целью поиска диагностических и прогностических маркеров патологических процессов. Высокопроизводительный анализ молекулярного состава компонентов биологических сред стал возможен благодаря совершенствованию и доступности оборудования для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС). В ряде работ с использованием методов ВЭЖХ-МС было показано значительное изменение состава липидов плазмы крови у взрослых пациентов при развитии системного воспаления [7, 8]. При этом, изменение липидного состава плазмы крови при воспалительных процессах у недоношенных детей остается малоизученным. В данной работе мы провели профилирование липидов плазмы крови у новорожденных детей первых суток жизни, имеющих очень низкую и экстремально низкую массу тела. В исследовании был осуществлен мониторинг изменения профилей липидов при развитии пневмонии, а также при осложнении пневмонии сепсисом. В качестве группы сравнения исследовались пациенты с респираторным дистресс-синдромом, являющимся неинфекционной патологией органов дыхания у новорожден-

ных. Анализ полученных данных выявил характерные изменения профилей липидов у исследуемых групп пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании был проведен анализ образцов плазмы крови недоношенных детей первых суток жизни, у которых впоследствии были диагностированы респираторный дистресс-синдром (РДС), пневмония и пневмония, осложнившаяся сепсисом. С использованием метода ВЭЖХ-МС были получены данные о молекулярном составе экстрактов исследуемых образцов плазмы крови. Экстракция плазмы крови органическими растворителями приводит к преимущественному выделению гидрофобных метаболитов, в том числе различных классов липидов и их производных. Важной особенностью жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, используемой в данной работе, является разделение смесей липидов на отдельные классы и подклассы, с характерными интервалами времен удерживания [9]. Для установления соответствия интервалов времен удерживания различным классам липидов использовался анализ с помощью тандемной масс-спектрометрии, позволяющей идентифицировать липид по точной массе иона и пикам в его тандемных масс-спектрах, которые характерны для того или иного класса [10]. После установления диапазонов времен удерживания различных классов липидов, их идентификацию проводили на основании точной массы и времени удерживания. Репрезентативные хроматограммы и масс-спектры экстрактов плазмы крови представлены на рис. 1.

После выравнивания хроматограмм, детектирования пиков и удаления шумовых сигналов при помощи программного пакета Progenesis, с учетом примененных параметров было обнаружено 64884 иона в диапазоне m/z от 100 до 1500, в том числе 20260 однозарядных ионов, которые были отобраны для дальнейшего анализа. С использованием встроенных в программное обеспечение методов были также проведены сравнения площадей хроматографических пиков для исследуемых групп и статистическая оценка достоверности их отличий.

Для уменьшения размерности многокомпонентных наборов данных и для визуализации кластеризации групп образцов по профилям метаболитов был применен анализ методом главных компонент (Principal component analysis – PCA) [11]. Как показано на рис. 2, анализ профилей метаболитов у недоношенных детей с РДС или пневмонией позволил выявить четкую кластеризацию точек данных, соответствующих группам с разными патологиями, что свидетельствует о существенных различиях между этими группами по

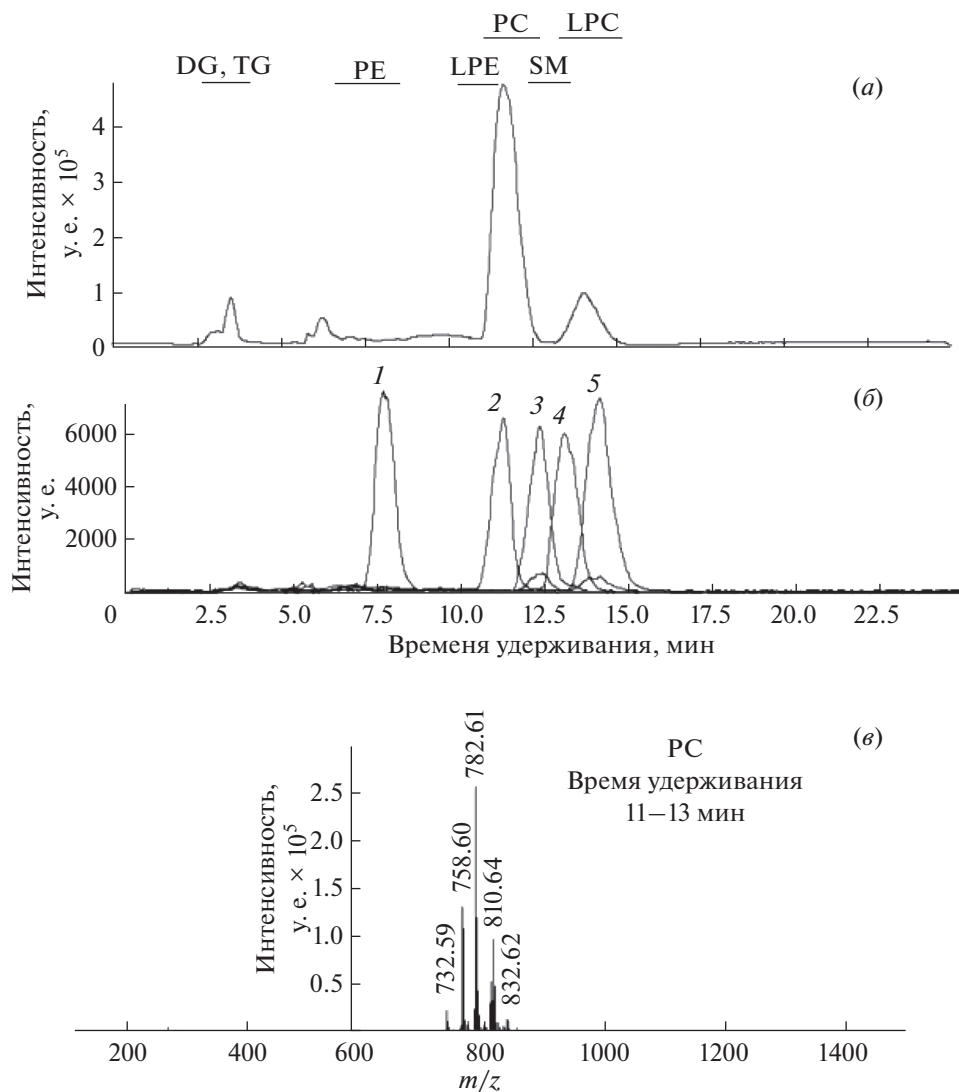


Рис. 1. Характерные хроматограммы и масс-спектр экстрактов липидов плазмы крови, зарегистрированные в режиме положительных ионов: (а) — хроматограмма полного ионного тока с указанными примерными диапазонами времен выхода идентифицированных классов липидов; (б) — хроматограммы экстрагированных токов ионов, представляющих отдельные классы липидов: 1 — PE 34:6; 2 — LPE 20:4; 3 — PC 30:0; 4 — SM 34:1; 5 — LPC 20:4; (в) — масс-спектр, усредненный по диапазону времен удерживания фосфатидилхолинов.

уровням метаболитов. Также были показаны (рис. 3) разделение и кластеризация образцов, соответствующих группам пациентов с пневмонией и пневмонией, осложненной сепсисом.

Для выявления липидов, обеспечивающих кластеризацию образцов в группах сравнения, был проведен сравнительный анализ кратности и достоверности изменений площадей хроматографических пиков между группами. Для дальнейшей идентификации выбирали те пики, у которых усредненные по группе площади отличались более, чем в два раза с достоверностью на уровне $p < 0.05$. Аннотацию дифференциально представ-

ленных ионов проводили по выявленным характерным временам удерживания для отнесения к тому или иному классу и по их массе, используя базу данных липидов Lipidmaps, с допустимой ошибкой определения массы не более 10 м.д. В качестве возможных способов образования ионов липидов рассматривали протонирование $[M + H]^+$, а также присоединение катионов натрия $[M + Na]^+$ или аммония $[M + NH_4]^+$. Результаты идентификации липидов приведены в табл. 1. Анализ уровней липидов при попарном сравнении между группами “Пневмония” и “РДС”, а также “Пневмония” и “Пневмония + Сепсис”

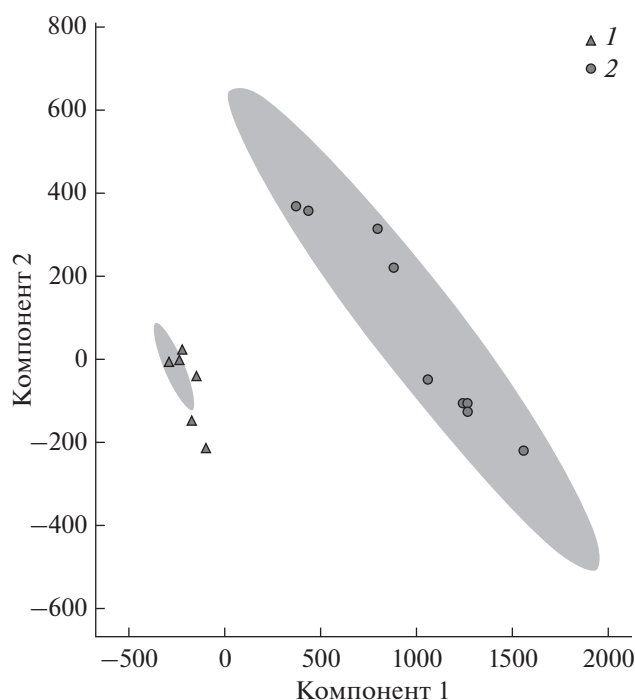


Рис. 2. График счетов, построенный по результатам применения метода главных компонент для ВЭЖХ-МС профилей метаболитов для групп недоношенных детей с пневмонией (1) и РДС (2).

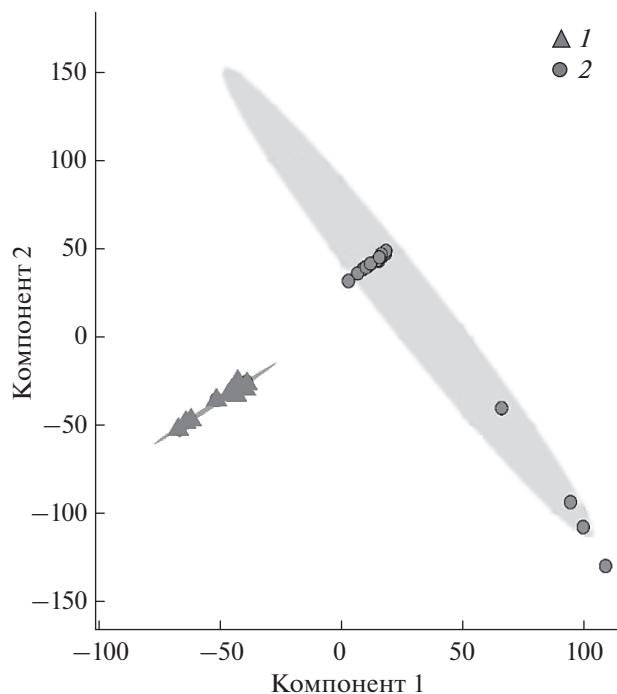


Рис. 3. График счетов, построенный по результатам применения метода главных компонент для анализа ВЭЖХ-МС профилей метаболитов для групп недоношенных детей с пневмонией (1) и пневмонией, осложненной сепсисом (2).

выявил соединения, относящиеся к основным классам липидов, с разнонаправленными изменениями в сравниваемых группах. Так, при сравнении профилей липидов в группах пациентов с пневмонией и пневмонией, осложненной сепсисом, большая часть дифференциально представленных липидов относится к ди- и триглицеридам. Обращает на себя внимание преимущественное снижение содержания ряда диглицеридов и повышение уровня триглицеридов у пациентов группы “Пневмония + Сепсис”.

Заметные изменения наблюдались также в содержании фосфатидилхолинов и выражались в преимущественном снижении содержания представителей данного класса липидов в группе “Пневмония + Сепсис” по сравнению с группой “Пневмония”. При сравнении образцов групп пациентов с пневмонией и РДС в основном наблюдалось заметное увеличение содержания диглицеридов, а также фосфатидилэтаноламинов.

Повышение уровня триглицеридов при различных инфекционных процессах и при сепсисе у детей и взрослых было показано ранее в ряде работ [12, 13]. Также, в работе [14] была выявлена корреляция между повышением уровня триглицеридов в сыворотке и снижением смертности пациентов с сепсисом.

Повышение уровня триглицеридов может быть связано с замедлением их гидролиза (о чем

может свидетельствовать наблюдаемое нами понижение уровня диглицеридов) и повышением их биосинтеза. В моделях на животных было показано повышение уровня триглицеридов при участии провоспалительных цитокинов, образующихся при развитии воспалительного процесса [15].

В частности, TNF- α способен стимулировать накопление жирных кислот и синтез триглицеридов клетками печени, а также тормозить распад липопротеинов очень низкой плотности, которые обеспечивают транспорт триглицеридов [16]. Липопротеины, в свою очередь, способны оказывать иммуномодулирующее действие за счет связывания гидрофобных бактериальных токсинов и ингибирования их взаимодействия с рецепторами активации острого иммунного ответа, чем, возможно, объясняется неблагоприятный прогноз у пациентов с генерализованным инфекционным процессом при пониженном уровне липопротеинов в крови [17, 18].

Важно отметить, что во всех работах по исследованию уровня липидов и липопротеинов плазмы крови при инфекционных процессах и сепсисе анализ проводился у пациентов с выраженными проявлениями осложнений и установленным диагнозом. Таким образом, регистрируемые изменения соответствовали наступившей острой фазе воспалительного процесса. В нашем исследовании был проведен анализ состава липидов до

манифестации выраженных симптомов и развития осложнений. Поскольку одним из критериев успешной терапии сепсиса является ранняя диагностика и быстрое начало адекватного лечения, идентификация специфичных маркеров, способных дифференцировать сепсис от других воспалительных процессов, необходима для контроля за угрожающими состояниями у недоношенных детей раннего срока гестации.

Необходимо отметить, что в большинстве опубликованных работ изменения уровня липидов оценивались по результатам измерения общего содержания триглицеридов, холестерина и липопротеинов, тогда как профилирование отдельных соединений из основных классов липидов практически не проводилась. Недавно, Мескати (Mecatti G.C.) с соавторами [19] в своей работе провели профилирование липидов при изучении сепсиса у пациентов старше 35 лет. Авторы показали снижение содержания фосфофинголипидов и лизофосфатидихолинов, а также повышение фосфатидилхолинов в плазме крови пациентов, страдающих сепсисом. В наших исследованиях наблюдалось преимущественное снижение уровня фосфатидилхолинов в группе “Пневмония + Сепсис” по сравнению с группой “Пневмония”, тогда как в группе “Пневмония” отмечалось преимущественное повышение уровня представителей фосфатидилэтанолламинов и сфингомиелинов по сравнению с группой РДС.

Некоторые расхождения в направлении изменений содержания липидов, в частности фосфатидилхолинов, могут быть связаны с возрастными особенностями, стадией развития процесса, а также отсутствием “нормального контроля” без патологий в условиях недоношенности у исследуемых групп детей. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о том, что сам по себе воспалительный процесс и ассоциированные с ним патологии в значительной степени изменяют обмен липидов в пораженных органах и их представленность в крови. Эти изменения отличаются при различных патологиях, таких как сепсис, пневмония или РДС, что позволяет с помощью исследования липидного профиля не только идентифицировать воспаление как таковое, но и дифференцировать связанные с ним заболевания.

Выявленные нами различия в составе плазмы крови при указанных заболеваниях свидетельствуют о необходимости дальнейшего прицельного поиска, структурной и количественной идентификации отдельных соединений в качестве потенциальных липидных маркеров. Кроме этого, необходима оценка динамики изменений липидов плазмы в сопоставлении с динамикой развития заболевания и его тяжестью, что позволит оценить диагностическую и прогностиче-

скую ценность липидных маркеров, а также их роль в патогенезе ассоциированных заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы. Для исследования были взяты образцы крови (500 мкл) в первые часы жизни у недоношенных новорожденных детей со сроком гестации от 24 до 31 недель. Образцы крови получали до начала терапевтических мероприятий по поводу осложнений. Образцы крови с признаками гемолиза не использовали в исследовании. Плазму крови выделяли сразу после забора. Для ее получения образцы центрифугировали 20 мин при 300 g и 4°C, супернатант отбирали и центрифугировали при 14000 g 10 мин и комнатной температуре. Полученную плазму крови хранили до анализа при –80°C.

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России. От представителей пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования.

На основании установленного диагноза для анализа было отобрано 22 образца из группы пациентов с пневмонией, 11 образцов из группы пациентов с пневмонией, осложненной сепсисом, и 4 образца из группы пациентов с респираторным дистресс-синдромом. В исследование не вошли образцы пациентов, у которых развились другие патологии одновременно с указанными выше.

Экстракция и ВЭЖХ-анализ. Экстракцию липидов и других гидрофобных метаболитов из плазмы крови проводили смесью метанола, хлороформа и метил-*трет*-бутилового эфира в соотношении 4 : 3 : 3 [20]. Для этого к 100 мкл плазмы добавляли 1900 мкл смеси растворителей, перемешивали 25 мин, и центрифугировали 10 мин при 10000 g и комнатной температуре. Супернатант отбирали и высушивали в струе азота. Полученный экстракт перерастворяли в 50 мкл смеси ацетонитрила и изопропанола (1 : 1).

ВЭЖХ-МС-анализ проводили в хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Scientific, США), подключенной к масс-спектрометру с гибридным квадруполь-время-пролетным масс-анализатором и источником ионов с ионизацией электрораспылением Maxis Impact (Bruker Daltonics, Германия). Хроматографическое разделение образца выполняли на колонке Spherisorb HILIC длиной 25 см, с внутренним диаметром 1 мм и зерном сорбента 5 мкм (Элсико, Россия). Элюирование компонентов образцов проводили в градиенте подвижной фазы, состав которой менялся от 5 до 30% элюента “В” (5 мМ раствор ацетата аммония в воде) в элюенте “А” (ацетонитрил) в течение 21.5 мин при скорости потока 50 мкл/мин, затем колонку про-

Таблица 1. Изменение содержания липидов в плазме крови недоношенных детей первых суток жизни, у которых впоследствии развились: пневмония, сепсис и РДС

Пневмония + сепсис/Пневмония						Пневмония/РДС					
понижение			повышение			понижение			повышение		
m/z	липид*	ион	m/z	липид*	ион	m/z	липид*	ион	m/z	липид*	ион
Ди- и триглицериды											
556.503	DG 30:1	[M + NH ₄] ⁺	628.496	DG 36:7	[M + NH ₄] ⁺	632.547	DG 36:5	[M + NH ₄] ⁺	896.758	TG 54:6	[M + NH ₄] ⁺
568.532	DG P-32:1	[M + NH ₄] ⁺	652.519	DG 38:9	[M + NH ₄] ⁺				573.474	DG P-32:1	[M + Na] ⁺
603.530	DG 0-34:1	[M + Na] ⁺	671.543	DG 38:2	[M + Na] ⁺				617.536	DG 34:1	[M + Na] ⁺
607.452	DG 34:6	[M + Na] ⁺	715.513	DG 42:8	[M + Na] ⁺				636.547	DG 36:3	[M + NH ₄] ⁺
612.570	DG 34:1	[M + NH ₄] ⁺	818.715	TG 48:3	[M + NH ₄] ⁺				638.562	DG 36:2	[M + NH ₄] ⁺
614.547	DG 34:0	[M + NH ₄] ⁺	820.730	TG 48:2	[M + NH ₄] ⁺				641.506	DG 36:3	[M + Na] ⁺
632.520	DG 36:5	[M + NH ₄] ⁺	822.745	TG 48:1	[M + NH ₄] ⁺				647.547	DG 36:0	[M + Na] ⁺
638.587	DG 36:2	[M + NH ₄] ⁺	852.783	TG 48:0	[M + NH ₄] ⁺				658.562	DG 38:6	[M + NH ₄] ⁺
663.520	DG 38:6	[M + Na] ⁺	868.732	TG 52:6	[M + NH ₄] ⁺				661.496	DG 38:7	[M + Na] ⁺
667.534	DG 38:4	[M + Na] ⁺	870.747	TG 52:5	[M + NH ₄] ⁺				669.568	DG 38:3	[M + Na] ⁺
678.506	DG 40:10	[M + NH ₄] ⁺	905.750	TG 54:4	[M + Na] ⁺				709.510	DG 42:11	[M + Na] ⁺
684.619	TG 38:0	[M + NH ₄] ⁺	918.746	TG 56:9	[M + NH ₄] ⁺				721.584	DG 42:5	[M + Na] ⁺
695.639	DG 40:4	[M + NH ₄] ⁺	922.777	TG 56:7	[M + NH ₄] ⁺						
704.521	DG 42:11	[M + NH ₄] ⁺	928.821	TG 56:4	[M + NH ₄] ⁺						
892.731	TG 54:8	[M + NH ₄] ⁺	944.761	TG 58:10	[M + NH ₄] ⁺						
			946.777	TG 58:9	[M + NH ₄] ⁺						
			948.792	TG 58:8	[M + NH ₄] ⁺						
Глицерофосфоэтанолламины											
762.584	PE-NME 36	[M + H] ⁺	786.492	PE 38:6	[M + Na] ⁺	796.548	PEP-40:7	[M + H] ⁺	744.494	PE P-36:5	[M + H] ⁺
770.585	PE 36:0	[M + Na] ⁺	786.492	PE 40:9	[M + H] ⁺				746.551	PE 36:1	[M + Na] ⁺
	PE 38:3	[M + H] ⁺	796.579	PE 38:1	[M + Na] ⁺				770.544	PE 36:0	[M + Na] ⁺
772.597	PE 38:2	[M + H] ⁺	796.579	PE 40:4	[M + H] ⁺				776.547	PE O-38:4	[M + H] ⁺
774.619	PE 38:1	[M + H] ⁺							792.547	PE P-40:6	[M + Na] ⁺
776.634	PE 38:0	[M + H] ⁺							PE 38:3	PE 38:3	[M + H] ⁺
									PE 40:6	PE 40:6	[M + Na] ⁺
									PE 42:10	PE 42:10	[M + Na] ⁺
									PE 40:7	PE 40:7	[M + Na] ⁺
Глицерофосфохолины											

Таблица 1. Окончание

Пневмония + сепсис/Пневмония						Пневмония/РДС					
понижение			повышение			понижение			повышение		
m/z	липид*	ион	m/z	липид*	ион	m/z	липид*	ион	m/z	липид*	ион
782.566	PC 34:1	[M + Na] ⁺	746.593	PC O-34:1	[M + H] ⁺	766.574	PC O-34:2	[M + Na] ⁺	752.509	PC 34:5	[M + H] ⁺
	PC 36:4	[M + H] ⁺	782.534	PC 34:1	[M + Na] ⁺		PC O-36:5	[M + H] ⁺		PC 32:2	[M + H] ⁺
788.636	PC 36:1	[M + H] ⁺		PC 36:4	[M + H] ⁺	848.556	PC 38:4	[M + Na] ⁺	802.662	PC O-38:1	[M + Na] ⁺
790.652	PC 36:0	[M + H] ⁺							878.698	PC 38:4	[M + H] ⁺
814.653	PC 38:2	[M + H] ⁺								PC O-42:2	[M + Na] ⁺
816.669	PC 38:1	[M + H] ⁺									
818.685	PC 38:0	[M + H] ⁺									
840.667	PC 38:0	[M + Na] ⁺									
	PC 40:3	[M + H] ⁺									
842.675	PC 40:2	[M + H] ⁺									
844.607	PC O-40:5	[M + Na] ⁺									
844.701	PC 40:1	[M + H] ⁺									
846.621	PC O-40:4	[M + Na] ⁺									
	PC P-42:6	[M + H] ⁺									
846.719	PC 40:0	[M + H] ⁺									
872.640	PC P-42:4	[M + Na] ⁺									
872.738	PC 42:1	[M + H] ⁺									
874.754	PC 42:0	[M + H] ⁺									
898.756	PC 44:2	[M + H] ⁺									
900.772	PC 44:1	[M + H] ⁺									
902.786	PC 44:0	[M + H] ⁺									
Сфингомиелины											
841.710	SM(44:1)	[M + H] ⁺	787.630	SM (40:1)	[M + Na] ⁺				673.527	SM(32:2)	[M + H] ⁺
									675.545	SM(32:1)	[M + H] ⁺
									697.526	SM(32:1)	[M + Na] ⁺
									725.558	SM(34:1)	[M + H] ⁺
									837.653	SM(42:1)	[M + Na] ⁺
Лизофосфатидилхолины											
566.322	LPC 20:4	[M + Na] ⁺	606.449	LPC 24:1	[M + H] ⁺				570.342	LPC 22:5	[M + H] ⁺
600.400	LPC 22:1	[M + Na] ⁺									

* Первая цифра в аббревиатуре липидов соответствует общему количеству атомов углерода в цепочках остатков жирных кислот, вторая – общему числу двойных связей. Аннотация липидов проводилась по характерным временам удерживания и массам, с использованием базы данных липидов Lipidmaps.

мывали и уравнивали 3.5 мин 5% раствором фазы "В". Общее время хроматографического анализа одного образца составляло 25 мин, температура колонки 40°C, объем вводимого образца 3 мкл. Каждый образец анализировали три раза. Масс-спектры получали при разрешении 50000 в диапазоне m/z 100–1500, в режиме положительно заряженных ионов. Параметры источника ионов были следующие: напряжение на игле 4.5 кВ, давление распыляющего газа 0.3 бар, поток осушающего газа 4 л/мин, температура осушающего газа 180°C.

Для определения характерных для каждого класса времен удерживания использовали соответствующие стандарты (любезно предоставлены лабораторией химии липидов ИБХ РАН). Также для идентификации масс-спектрометрических пиков ряд анализов был выполнен с применением метода тандемной масс-спектрометрии с окном изоляции ионов, равным m/z 5 и энергией столкновений 25 эВ.

Обработку и анализ полученных масс-спектрометрических данных проводили программным пакетом Progenesis Q1 2.0 (Waters, Milford, США). В качестве характеристических отбирали пики, соответствующие однозарядным ионам и достоверно отличающиеся между исследуемыми группами минимум в 2 раза. Достоверность отличия проверяли с помощью теста ANOVA статистическим модулем, входящим в программный пакет, с порогом достоверности p -value < 0.05. Для выбранных пиков было проведено сравнительное исследование различных групп эмбриональных сред методом анализа главных компонент (PCA) [11]. Для первичной идентификации отличающихся пиков использовали базу данных LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>).

БЛАГОДАРНОСТИ

Сотрудникам лаборатории химии липидов ИБХ РАН: д. х. н. Е.Л. Водовозовой и к. х. н. И.А. Болдыреву за предоставленные стандарты липидов.

Заведующей биобанка НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, С.М. Муллабаевой.

Разработка метода ВЭЖХ-МС-анализа образцов и анализ данных выполнены при финансовой поддержке РФФ (Соглашение № 16-14-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голубцова Ю. М., Дегтярев Д. Н. // Неонатология: новости, мнения, обучение. 2014. Т. 2. С. 15–25.
2. Ионов О.В., Никитина И.В., Зубков В.В., Митрохин С.Д., Крохина К.Н., Киртбая А.Р., Левадная И.И., Любасовская А.В., Рюмина Л.А., Дегтярев Д.Н., Крючко Д.С. // Неонатология: новости, мнения, обучение. 2014. Т. 1. С. 95–106.
3. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Бойчук С.В. // Вестник современной клинической медицины. 2014. Т. 6. № 7. С. 97–104.
4. Baltimore R.S. // Semin. Perinatol. 2007. V. 31. № 1. P. 33–38.
5. Никитина И.В., Ненша О.С., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю., Милая О.В., Дегтярева А.В., Ионов О.В., Зубков В.В., Дегтярев Д.Н. // Акушерство и гинекология. 2016. Т. 12. С. 106–113.
6. Delanghe J.R., Speeckaert M.M. // Clin. Chim. Acta. 2015. V. 451. Pt A. P. 46–64.
7. Kamisoglu K., Sleight K. E., Calvano S. E., Coyle S.M., Corbett S.A., Androulakis I.P. // Shock. 2013. V. 40. № 6. P. 519–526.
8. Kelvin K.W., Lee K.C., Wong S.S.Y., Lo K.C., Lui Y.M., Jahan A.S., Wu A.L., Ke Y.H., Law C.Y., Sze K.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Lam C.W., Yuen K.Y. // J. Infect. 2015. V. 70. № 5. P. 433–444.
9. Cífková E., Hájek R., Líska M., HolLapek M. // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1439. P. 65–73.
10. Hsu F.-F., Turk J. // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877. № 26. P. 2673–2695.
11. Abdi H., Williams L.J. // Wiley Interdisci. Rev. Comput. Stat. 2010. V. 2. № 4. P. 433–459.
12. Muramoto G., Figueiredo Delgado A., Correa de Souza E., Elias Gilio A., Brunow de Carvalho W., Cavalcante Maranhão R. // Ann. Med. 2016. V. 48. № 5. P. 323–329.
13. Pirillo A., Catapano A.L., Norata G.D. // Handb. ExC. Pharmacol. 2015. V. 224. P. 483–508.
14. Lee S.H., Park M.S., Park B.H., Jung W.J., Lee I.S., Kim S.Y., Kim E.Y., Jung J.Y., Kang Y.A., Kim Y.S., Kim S.K., Chang J., Chung K.S. // Biomed. Res. Int. 2015. V. 2015. P. 789298.
15. Feingold K.R., Stapanian I., Memon R.A., Moser A.H., Shigenaga J.K., Doerrler W., Dinarello C.A., Grunfeld C. // J. Lipid Res. 1992. V. 33. № 12. P. 1765–1776.
16. Filippas-Ntekouan S., Liberopoulos E., Elisaf M. // Infection. 2017. V. 45. № 5. P. 575–588.
17. Guo L., Ai J., Zheng Z., Howatt D. A., Daugherty A., Huang B., Li X.A. // J. Biol. Chem. 2013. T. 288. № 25. P. 17947–17953.
18. De Nardo D., Labzin L.I., Kono H., Seki R., Schmidt S.V., Beyer M., Xu D., Zimmer S., Lahrman C., Schildberg F.A., Vogelhuber J., Kraut M., Ulas T., Kerksiek A., Krebs W., Bode N., Grebe A., Fitzgerald M.L., Hernandez N.J., Williams B.R.G., Knolle P., Kneilling M., Röcken M., Lütjohann D., Wright S.D., Schultze J.L., Latz E. // Nat. Immunol. 2014. V. 15. № 2. P. 152–160.
19. Mecatti G.C., Fernandes Messias M.C., Sant'Anna Paioia R.M., Figueiredo Angolini C.F., Da Silva Cunha I.B., Eberlin M.N., De Oliveira Carvalho P. // Biomark. Insights. 2018. V. 13. P. 1177271918765137.
20. Pellegrino R.M., Di Veroli A., Valeri A., Goracci L., Cruciani G. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 30. P. 7937–7948.

Blood Lipids Profiling of Preterm Neonates in the First Day of Life for Identification of Early Biomarkers of Sepsis and Pneumonia

Ch. M. Eldarov*, I. V. Nikitina*, A. R. Kirtbaya*, V. V. Chagovets*,
O. V. Ionov*, and M. Yu. Bobrov*, **, #

Phone: +7 903 251-86-77, e-mail: mbobr@mail.ru

*Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997, Russia

The early postnatal development of prematurely born infants is often complicated by bacterial infections of different organs and systems, including respiratory organs. In case of unfavorable course, they can be transformed into generalized infection forms such as sepsis, leading to life-threatening events. Such transformations are possible due to untimely diagnosis followed by specific therapy delay. Thus, the development of new methods in diagnostics of inflammatory pathological processes, especially in the first few hours of life, is essential for modern neonatology. In this study, we collected blood serum of preterm infants of the first day of life and made profiling of blood plasma lipids to identify potential biomarkers of inflammatory processes. The study involved three groups of patients who had either pneumonia, pneumonia complicated by sepsis, or respiratory distress syndrome diagnosed in the early postnatal period. Lipid extracts were analyzed using HPLC-qToF MS to find potential infection-specific molecular profiles. The analysis revealed significant differences between studied groups in composition of phosphatidylcholines, phosphatidylethanolamines, di- and triglycerides, sphingolipids and lysophospholipids. The results indicate that the inflammatory process affects global lipid exchange and alters blood plasma lipid composition significantly. Moreover, each pathology – sepsis, pneumonia or RDS – has its own specific lipid profile, which may be useful not only to detect inflammation but also to differentiate inflammation-associated diseases from each other.

Keywords: lipids, sepsis, HPLC, mass-spectrometry, prematurity