

На правах рукописи

Горяинов Сергей Владимирович

**Анализ профиля оксилипинов в биологических образцах как новый подход
к изучению механизмов действия лекарственных средств**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» в научно-образовательном ресурсном центре «Фармация».

Научный руководитель:

Чистяков Дмитрий Викторович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Шохин Игорь Евгеньевич, доктор фармацевтических наук, генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики»

Сливкин Алексей Иванович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 20 июня 2024 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6. Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «___» мая 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.021
кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одним из ключевых факторов патогенеза широкого спектра заболеваний, включая онкологические и неврологические, является воспаление (*Libby, 2007*). Наряду с цитокинами, широко известными белковыми маркерами воспаления, особый интерес представляют низкомолекулярные соединения оксипирины – окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (*Gabbs et.al., 2015*). Изменения в концентрации и соотношении отдельных оксипиринов наблюдаются при различных заболеваниях и активно применяются для изучения их патогенеза (*Gabbs et.al., 2015*). Мишенью широко известных лекарственных средств (ЛС) противовоспалительного действия, таких как аспирин, ибупрофен, индометацин и др. является именно регуляция биосинтеза оксипиринов (*Bindu et.al., 2020, Orafaie et.al., 2020*), при этом и новые препараты, разрабатываемые как регуляторы процессов воспаления при различных заболеваниях, также влияют на состав оксипиринов (*Gladine et.al., 2019*). Количественный анализ как отдельных оксипиринов, так и их совокупности (профиля оксипиринов), долгое время был затруднен из-за низких концентраций этих соединений в биологических объектах (*Burla et.al., 2018*). Однако в последние годы развитие масс-спектрометрических подходов к анализу оксипиринов открыло возможности для изучения их биологической активности как в контексте установления механизмов действия ЛС (*Song et.al., 2015, Mazaleuskaya et.al., 2016*), так и их рассмотрения в качестве потенциальных биомаркеров широкого спектра заболеваний, включая неврологические, онкологические патологии, болезни, связанные с нарушением метаболизма и др. (*Chistyakov et.al., 2018, Buckner et.al., 2021, Chistyakov et.al., 2023*). В то же время широкое внедрение в экспериментальную практику масс-спектрометрических методов детекции оксипиринов ограничено рядом факторов. На эффективность анализа влияет как тип биологического объекта, так и методы экстракции оксипиринов и концентрирования образцов, их стабилизации и прочие параметры (*Burla et.al., 2018, Liakh et.al., 2019*). Таким образом, разработка подходов к анализу профиля оксипиринов в различных биологических образцах, углубленное и комплексное исследование различных аспектов биосинтеза оксипиринов в модельных системах для изучения молекулярных механизмов развития различных социально-значимых заболеваний и изучение механизмов действия ЛС, воздействующих на профиль оксипиринов, на сегодняшний день является актуальной и перспективной задачей.

Степень разработанности темы исследования. Анализ профиля оксипиринов (более 100 соединений) с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) широко внедрен в общемировую практику изучения профиля оксипиринов и описан, например, в работах *Burla et.al., 2018, Mazaleuskaya et.al., 2016*. Одновременно с распространением данного подхода

были усовершенствованы отдельные аспекты детекции оксипинов, в том числе методы экстракции (*Liakh et.al., 2019*), а также изучено влияние внешних факторов на стабильность этих липидов (*Koch et.al., 2020*). Развитие метода анализа открыло возможности для решения новых практических задач, связанных с биофармацевтическим анализом. К таким задачам можно отнести поведение оксипинов в биологических жидкостях организма при разных заболеваниях с воспалительной компонентой и их влияние на механизмы действия ЛС. Возникла необходимость сформировать практические подходы к использованию анализа профиля оксипинов для решения указанных фундаментальных и прикладных задач.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пункту 4 направлений исследований «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

Объект и предмет исследования. В рамках диссертационной работы объектами исследования являлись плазма крови, слезная жидкость, внутриглазная жидкость, клеточные супернатанты. *Предмет* диссертационного исследования – исследование количественного профиля оксипинов с помощью масс-спектрометрического метода для изучения механизмов действия противовоспалительных ЛС.

Цель работы: разработать методологию количественного определения оксипинов в различных биологических образцах методом ВЭЖХ-МС/МС для последующего изучения механизмов действия противовоспалительных ЛС.

Задачи исследования:

1. Разработать оптимальную методику пробоподготовки различных исследуемых биологических образцов для совместного изолирования оксипинов.
2. Провести валидацию разработанной методики количественного определения оксипинов в различных биологических образцах методом ВЭЖХ-МС/МС.
3. Оценить возможность использования разработанного подхода количественного определения оксипинов в исследованиях различных патологий.
4. Исследовать возможность применения разработанной методики для оценки эффективности противовоспалительного действия ЛС различных классов.

Научная новизна работы. Разработаны условия пробоподготовки клеточных культур и биожидкостей для количественного определения оксипинов. Разработана и валидирована методика количественного определения оксипинов в различных матрицах методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработана и апробирована новая технология, позволяющая исследовать механизмы

действия новых ЛС и молекулярные механизмы возникновения и развития различных социально-значимых заболеваний, ассоциированных с воспалением. В работе **впервые** проведен сравнительный анализ профиля оксипинов внутриглазной жидкости и слезной жидкости человека при глаукоме. **Впервые** исследованы профили оксипинов в моделях повреждения роговицы и увеита на модельных животных. **Впервые** детально охарактеризовано изменение профиля оксипинов при обработке клеточных культур ЛС – агонистами ядерных рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR): PPAR α (фенофибрат, GW6471); PPAR β (GW501516, GSK0660); PPAR γ (росиглитазон, GW9662). **Впервые** исследованы молекулярные механизмы действия перспективных ЛС на основе дейтерированных аналогов ПНЖК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны теоретические подходы к использованию методик количественного определения оксипинов в изучении объектов различного генезиса, что позволило детализировать механизмы действия и оценивать противовоспалительную активность ЛС на молекулярном уровне. Результаты диссертационного исследования имеют практическое значение для разработки новых ЛС противовоспалительного действия и изучения молекулярных механизмов их действия. Разработанный подход возможно использовать в лабораториях фармакокинетики, клинической фармакологии и метаболомного анализа для исследования различных патологий и оценки эффективности действия лекарственных веществ различных классов, а также для установления механизмов возникновения и развития социально-значимых заболеваний, ассоциированных с воспалительным процессом. В дальнейшем возможно расширение списка изучаемых биофлюидов (моча, цереброспинальная жидкость и др.), а также расширение профиля оксипинов, возможных к определению при проведении одного анализа. Исследование проводили в рамках выполнения программы «Приоритет-2020» (№№ гос. рег.: АААА-А19-119031190050-8, АААА-А19-119121090100-9, АААА-А20-120062390086-5).

Методология и методы исследования. Методология исследования заключалась в изучении литературных данных по теме исследования, оценке актуальности темы и степени ее разработки, постановке соответствующих целей и задач исследования, обработке полученных результатов статистическими методами, обобщении результатов в плане их биофармацевтической значимости. Валидацию методик проводили согласно отечественным и зарубежным руководствам «Руководству по экспертизе лекарственных средств. Том 1» под редакцией А.Н. Миронова, 2013 г., а также руководствам FDA («Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation»), EMA («Guideline on bioanalytical method validation») и Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №85 («Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных

препаратов в рамках Евразийского экономического союза»). Статистическая обработка полученных результатов измерений проводилась с использованием программ IBM SPSS Statistics 23.0.0.0 и Microsoft Excel 2016.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные подходы к пробоподготовке биологических образцов, позволяющие изолировать исследуемые соединения – низкомолекулярные метаболиты ПНЖК (оксипирины);
2. Разработанная аналитическая методика количественного определения аналитов в плазме крови, слезной жидкости, внутриглазной жидкости, клеточных супернатантах методом ВЭЖХ-МС/МС;
3. Результаты валидации аналитической методики количественного определения аналитов в плазме крови, слезной жидкости, внутриглазной жидкости, клеточных супернатантах методом ВЭЖХ-МС/МС по основным параметрам: селективность, линейность, предел обнаружения, нижний предел количественного определения, точность (правильность и прецизионность), эффект матрицы, степень извлечения, перенос пробы и стабильность;
4. Результаты оценки возможности использования разработанной методики для исследования различных патологий в клинических исследованиях и для оценки эффективности действия ЛС различных классов в модельных экспериментах.

Степень достоверности полученных результатов. Диссертационная работа выполнена с учетом современных научно-методических требований, что делает приведенные выводы обоснованными. Достоверность результатов обеспечена спланированным дизайном исследования. Результаты, полученные с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС, являются достоверными, поскольку разработанная методика удовлетворяет критериям приемлемости параметров валидации. В работе использовались сертифицированные референсные материалы определяемых соединений. Использованное в работе оборудование надлежащим образом зарегистрировано в государственном реестре средств измерений (СИ) и имеет соответствующие свидетельства о поверке СИ. Результаты обработаны в соответствии с актуальной методологией статистического анализа с помощью современного лицензионного программного обеспечения. Диссертация включает в себя ссылки на 187 отечественных и иностранных работ, выполненных по той же теме.

Апробация результатов исследования по диссертации проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (протокол № 0300-35-01/10 от 14.03.2024). Основные результаты исследования представлены в 7 публикациях, среди которых 7 статей в журналах, индексируемых в международных базах цитирования

(Scopus), а также в тезисах и устных докладах: VII Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2017), VII Европейский семинар по липидным медиаторам (Брюссель, 2018), XI Международная конференция-выставка по метаболизму и системной биологии (Токио, 2018), 44-ый Международный конгресс FEBS (Краков, 2019), X международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2019), III Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2020), 45-ый Международный онлайн-конгресс FEBS (Любляна, 2021), 63-ья Всероссийская научная конференция МФТИ (Долгопрудный, 2021).

Личный вклад автора состоит в непосредственном проведении экспериментальных исследований по масс-спектрометрическому изучению профиля оксипинов, анализе и обобщении полученных результатов. Автором проведена разработка, валидация методики количественного определения оксипинов методом ВЭЖХ-МС/МС, статистическая обработка результатов исследования. Автор непосредственно участвовал во всех этапах исследования: от постановки задач и их экспериментально–теоретической реализации до обсуждения результатов и подготовки научных публикаций. Работы по характеристике профиля оксипинов пациентов с первичной открытоугольной глаукомой были проведены совместно с Зернием Е.Ю. Работы по выделению клеточных культур астроцитов и нейронов были проведены совместно с Лопачевым А.В. и Чистяковым Д.В.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, библиографический список (187 источников) и приложение (13 страниц). Результаты проиллюстрированы в 15 таблицах и 23 рисунках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 диссертации посвящена обзору литературы по теме диссертации. В ней обобщены данные по физико-химическим свойствам оксипинов, их стабильности в различных биологических матрицах и особенностям пробоподготовки, экстракции и детектирования оксипинов из различных биологических матриц.

В **Главе 2** диссертации представлены данные об используемом в работе оборудовании, стандартных образцах и реактивах, описано проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo*, условия пробоподготовки образцов, хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования оксипинов, описана статистическая обработка полученных результатов.

Глава 3 диссертации посвящена результатам исследования и их обсуждению:

Материалы и методы исследования. Экстракцию ПНЖК и оксипиринов из различных биологических образцов проводили методом твердофазной экстракции на колонках Oasis HLB 3cc в вакуумном экстракторе VacElut Cartridge Manifold (Agilent, США), концентрирование проб проводили с помощью испарительного концентратора в токе азота NDK200 (Miulab, Китай). Использование готового продукта – программного метода управления ВЭЖХ-МС/МС системой, а также сбора и обработки данных значительно упростило задачу. Это позволило пропустить обязательный в разработке аналитических методик шаг установления оптимальных хроматографических и масс-спектрометрических характеристик большей части определяемых соединений. При этом обеспечивались их приемлемое разделение и высокая чувствительность определения в сложных биологических матрицах. Настройки программного продукта корректировали для использования в количественных расчетах собранной панели дейтерированных стандартных образцов (СО) и добавленных молекул оксипиринов. Настройки программного продукта в отдельных экспериментах корректировали под детектирование оксипиринов, образующихся при использовании в качестве субстратов дейтерированных ПНЖК с разной степенью изомерспецифичного дейтерозамещения.

Для идентификации оксипиринов образцы анализировали с использованием квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040 (Shimadzu Corp., Япония), оборудованного системой ВЭЖХ Nexera X2 (колонка Phenomenex C8, 2,1мм*150мм*2,6мкм). Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Температура автосэмплера и термостата колонки - 5 °С и 40 °С, соответственно. Объем закола - 20 мкл. В качестве подвижных фаз использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В), режим градиентного элюирования (В): 10% (0 мин) - 25% (5 мин) - 35% (10 мин) - 75% (20 мин) - 95% (20,1 мин) - 95% (25 мин) - 10% (25,1 мин) - 10% (30 мин). Параметры работы масс-спектрометра: расход газа-распылителя - 3 л/мин; расход осушающего газа - 10 л/мин; температура источника 400 °С; температура линии десольватации 250 °С. Регистрацию оксипиринов осуществляли методом регистрации выбранных реакций (MRM), как в положительном, так и в отрицательном режимах. Исследуемые вещества были идентифицированы, основываясь на результатах анализа дейтерированных СО и соответствующих им оксипиринов, сравнении параметров MRM-реакций и времен удерживания. Для количественного определения содержания веществ площади пиков соединений нормировались на площади пика стандартного образца соответствующего класса с помощью программного пакета «Lipid Mediator Version 2» (Shimadzu Corp., Япония).

Валидацию методик проводили согласно отечественным и зарубежным руководствам. Полученные результаты обрабатывали с помощью метода однофакторного дисперсионного

анализа (ANOVA), критерия Стьюдента, метода дискриминантного анализа на основе частичных наименьших квадратов (PLS-DA) с использованием программ IBM SPSS Statistics 23.0.0.0 и Microsoft Excel 2016.

1. Разработка оптимальной методики выделения оксипинов из образцов плазмы крови, слезной жидкости, внутриглазной жидкости и клеточного супернатанта и их детектирования.

На первом этапе работы была разработана схема выделения оксипинов из различных биологических объектов, включающая следующие этапы: 1) сбор образцов (после сбора и до момента анализа хранили при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в присутствии 0,05% антиоксиданта бутилгидрокситолуола (БГТ), добавленного в пробы сразу после сбора биологического материала; 2) твердофазная экстракция (ТФЭ) на колонках OASIS HLB с последующим элюированием целевых соединений и упариванием пробы в токе азота; 3) ВЭЖХ-МС/МС анализ проб; 4) статистическая обработка полученных данных.

В случае необходимости транспортировки проб из клинического центра ее проводили с использованием жидкого азота для предотвращения нарушения температурного режима. Перед анализом к аликвоте образца добавляли смесь дейтерированных соединений, 0,05% раствор БГТ, пробу перемешивали с помощью вортекса 30 сек. Далее в зависимости от объема и типа биологического объекта к образцу добавляли эквивалентный объем предварительно охлажденного метанола (95%) для осаждения белковой фракции, после чего центрифугировали в течение 5 мин (14000 об/мин). Затем отбирали аликвоту супернатанта и смешивали ее с 6 мл 0,1% водного раствора муравьиной кислоты, перемешивали 30 сек. Картридж для ТФЭ-экстракции Oasis HLB кондиционировали последовательным нанесением 2 мл метанола и 2 мл 0,1% водного раствора муравьиной кислоты, далее на картридж наносили испытуемый образец. Далее картридж промывали 2 мл 15% метанола. Оксипины элюировали с картриджа последовательным нанесением 500 мкл метанола и 500 мкл ацетонитрила в пробирку типа эппендорф, затем проводили концентрирование образца в токе азота без нагревания. После концентрирования образец в объеме 100 мкл метанола переносился в хроматографическую вials для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

Оптимизировали условия масс-спектрометрического детектирования оксипинов, информация о которых отсутствовала в программном пакете. Оптимизация включала выбор напряжений на префильтрах первого и третьего квадруполей и настройку режима работы соударительной ячейки для достижения наилучшей чувствительности для изучаемых аналитов. Многие оксипины являются структурно схожими между собой соединениями, в некоторых случаях - изомерами, которые имеют одинаковую молекулярную массу и сходные пути фрагментации в условиях ионизации электрораспылением. Это часто приводит к

использованию одинаковых MRM-переходов для детектирования этих метаболитов. Структурные изомеры часто обнаруживаются при одном и том же MRM-переходе и проявляются несколькими пиками на соответствующих MRM-хроматограммах. Лучшая чувствительность достигается при анализе подавляющего большинства молекул оксипинов в режиме ионизации электрораспылением при регистрации отрицательных ионов за счет образования псевдомолекулярных ионов состава $[M-H]^-$. В спектрах МС/МС (рис. 1) наиболее интенсивные дочерние ионы образуются в результате процесса последовательного элиминирования таких нейтральных частиц, как H_2O и CO_2 , но для повышения специфичности детектирования предпочтительно выбирать дочерние ионы с более низкими значениями m/z , интенсивность которых, как правило, увеличивается с повышением напряжения в соударительной ячейке масс-спектрометра. Времена удерживания оксипинов и параметры регистрации спектров МС/МС представлены в таблице 1. Масс-хроматограмма MRM-переходов, соответствующих используемым в работе дейтеросоединениям, представлена на рис. 2.

Таблица 1. Дескрипторы для идентификации и количественного анализа оксипинов

| №№ | Название | Время удерживания, мин | MRM-переход | Полярность | Q1, В | Q2, В | CE |
|----|---|------------------------|-----------------------------|------------|-------|-------|-------|
| 1 | tetranor-PGEM-d ₆ / tetranor-PGEM | 3,02 / 3,06 | 333,2→315,2 / 327,2→309,2 | «-» | 22,0 | 20,0 | 15,0 |
| 2 | 6-keto-PGF _{1a} -d ₄ / 6-keto-PGF _{1a} | 7,67 / 7,69 | 373,2→249,1 / 369,2→245,1 | «-» | 13,0 | 24,0 | 27,0 |
| 3 | TXB ₂ -d ₄ / TXB ₂ | 9,49 / 9,52 | 373,2→199,1 / 373,2→199,1 | «-» | 13,0 | 20,0 | 15,0 |
| 4 | PGF _{2a} -d ₄ / PGF _{2a} | 10,29 / 10,31 | 357,2→197,2 / 353,1→194,1 / | «-» | 24,0 | 19,0 | 26,0 |
| 5 | PGE ₂ -d ₄ / PGE ₂ | 10,71 / 10,74 | 355,2→275,2 / 351,2→271,2 | «-» | 24,0 | 18,0 | 19,0 |
| 6 | PGD ₂ -d ₄ / PGD ₂ | 11,11 / 11,14 | 355,2→275,2 / 351,2→271,2 | «-» | 13,0 | 30,0 | 18,0 |
| 7 | Resolvin D ₁ -d ₅ / Resolvin D ₁ | 11,91 / 11,95 | 380,2→141,1 / 375,2→141,1 | «-» | 17,0 | 23,0 | 15,0 |
| 8 | LTC ₄ -d ₅ / LTC ₄ | 12,63 / 12,68 | 631,4→308,2 / 626,4→308,2 | «+» | -30,0 | -20,0 | -17,0 |
| 9 | PGA ₂ -d ₄ / PGA ₂ | 13,01 / 13,04 | 337,2→275,2 / 333,2→271,2 | «-» | 23,0 | 27,0 | 17,0 |
| 10 | LTB ₄ -d ₄ / LTB ₄ | 14,11 / 14,14 | 339,2→197,1 / 335,2→195,1 | «-» | 24,0 | 12,0 | 16,0 |
| 11 | 15-deoxy-Δ ^{12,14} -PGJ ₂ -d ₄ / 15-deoxy-Δ ^{12,14} -PGJ ₂ | 15,96 / 15,99 | 319,2→275,2 / 315,2→271,2 | «-» | 15,0 | 26,0 | 13,0 |

| | | | | | | | |
|----|-------------------------------------|---------------|------------------------------|-----|-------|-------|-------|
| 12 | 15-HETE-d ₈ / 15-HETE | 16,89 / 16,92 | 327,2→226,2 / 319,2→219,2 | «←» | 22,0 | 14,0 | 14,0 |
| 13 | 12-HETE-d ₈ / 12-HETE | 17,28 / 17,32 | 327,2→184,3 / 327,2→184,3 | «←» | 22,0 | 12,0 | 15,0 |
| 14 | 5-HETE-d ₈ / 5-HETE | 17,31 / 17,34 | 327,2→116,1 / 319,2→115,1 | «←» | 22,0 | 23,0 | 14,0 |
| 15 | OEA-d ₄ / OEA | 19,15 / 19,18 | 330,2→66,1 / 326,2→62,1 | «+» | -15,0 | -25,0 | -19,0 |
| 16 | EPA-d ₅ / EPA | 19,43 / 19,46 | 306,2→262,2 / 301,2→257,2 | «←» | 17,0 | 28,0 | 11,0 |
| 17 | DHA-d ₅ / DHA | 20,16 / 20,19 | 332,2→288,2 / 327,2→283,2 | «←» | 19,0 | 19,0 | 11,0 |
| 18 | AA-d ₈ / AA | 20,29 / 20,32 | 311,2→311,2 / 303,2→303,2 | «←» | 17,0 | 21,0 | 7,0 |

2. Валидация разработанной методики количественного определения оксилипинов.

В процессе валидации методики были доказаны селективность и отсутствие эффекта переноса путем визуального анализа MRM-хроматограмм. Результаты валидации аналитической методики для плазмы крови по показателям предел обнаружения, нижний предел количественного определения, линейность, степень извлечения и эффект матрицы приведены в таблице 2. Результаты валидации по показателю точность (правильность и прецизионность), а также результаты валидации методики для других биожидкостей в полном объеме приведены в тексте диссертации.

Таблица 2. Результаты валидации методики количественного определения оксилипинов

| №№ | Название | Линейность, R ² | ПО, пг/вкол | НПКО, пг/вкол | Степень извлечения, % | Эффект матрицы, % |
|----|--|----------------------------|-------------|---------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | tetranor-PGEM-d ₆ | 0,997 | 10,5 | 16,1 | 75,6±3,6 | 74,1±3,4 |
| 2 | 6-keto-PGF _{1α} -d ₄ | 0,9987 | 4,2 | 13,0 | 93,2±2,3 | 91,4±4,3 |
| 3 | TXB ₂ -d ₄ | 0,995 | 4,3 | 12,4 | 77,1±3,4 | 63,2±3,1 |
| 4 | PGF _{2α} -d ₄ | 0,998 | 12,5 | 26,3 | 92,5±6,2 | 70,7±0,9 |
| 5 | PGE ₂ -d ₄ | 0,9955 | 4,6 | 13,4 | 84,6±15,2 | 72,2±6,2 |
| 6 | PGD ₂ -d ₄ | 0,9984 | 4,0 | 13,9 | 82,0±3,9 | 85,9±5,1 |
| 7 | Resolvin D ₁ -d ₅ | 0,9976 | 5,9 | 15,2 | 96,0±3,5 | 74,7±6,3 |
| 8 | LTC ₄ -d ₅ | 0,9951 | 8,3 | 19,9 | 88,3±1,3 | 67,3±6,6 |
| 9 | PGA ₂ -d ₄ | 0,9985 | 3,9 | 13,8 | 80,5±7,1 | 85,7±6,8 |
| 10 | LTB ₄ -d ₄ | 0,9995 | 7,6 | 18,6 | 78,2±6,5 | 64,7±3,8 |

| | | | | | | |
|----|--|--------|------|-------|-----------|-----------|
| 11 | 15-deoxy- Δ -12,14-PGJ ₂ -d ₄ | 0,9988 | 7,2 | 19,6 | 86,3±5,1 | 71,4±9,5 |
| 12 | 15-НЕТЕ-d ₈ | 0,9956 | 25,4 | 46,5 | 93,3±10,1 | 63,6±5,7 |
| 13 | 12-НЕТЕ-d ₈ | 0,9992 | 21,0 | 43,7 | 85,0±13,4 | 71,1±4,6 |
| 14 | 5-НЕТЕ-d ₈ | 0,9995 | 15,3 | 25,0 | 88,2±7,6 | 72,4±5,1 |
| 15 | ОЕА-d ₄ | 0,9979 | 3,0 | 9,0 | 80,0±5,4 | 85,9±3,6 |
| 16 | ЕРА-d ₅ | 0,9976 | 52,2 | 113,5 | 88,3±6,1 | 74,6±11,5 |
| 17 | ДНА-d ₅ | 0,9966 | 48,6 | 107,2 | 90,4±5,2 | 67,2±7,6 |
| 18 | АА-d ₈ | 0,9968 | 83,2 | 117,8 | 79,1±1,4 | 85,7±7,5 |

3. Апробация разработанного метода ВЭЖХ-МС/МС детекции оксипинов.

Разработанные подходы к анализу профилей оксипинов позволили апробировать использование метода для решения широкого круга задач, который включал в себя изучение патологических процессов при различных заболеваниях человека, исследование животных моделей патологии и оценку противовоспалительных свойств перспективных ЛС.

3.1. Изменения профиля оксипинов при болезни Вильсона-Коновалова. Нами было исследовано изменение профиля оксипинов при болезни Вильсона-Коновалова (БВ). Это редкое аутосомно-рецессивное нарушение обмена веществ, возникающее в результате мутаций в гене АТР7В, кодирующем белок, транспортирующий медь, однако влияние эпигенетических, экологических, возрастных и половых факторов на фенотип БВ влияют на клинические проявления данного заболевания. Нами была исследована плазма 39 пациентов с различными клиническими проявлениями БВ в сравнение с 16 здоровыми людьми из контрольной группы (КГ), в крови которых детектировали 43 соединения. Анализ матрицы сходства профилей оксипинов позволил объединить пациентов в три группы. Анализ данных с помощью VolcanoPlot (Рис. 3А) и частичного дискриминантного анализа наименьших квадратов (PLS-DA) (Рис. 3Б) показал, что восемь соединений отражают разницу между БВ и КГ: 12-ННТ, ЕРА, 14,15-ДНЕТ, ОЕА, 9-НОДЕ, 9-КОДЕ, РGD₂, и РGE₂. Соединения указывают на участие в заболевании окислительного стресса, воспалительных процессов и сигнальных путей рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR).

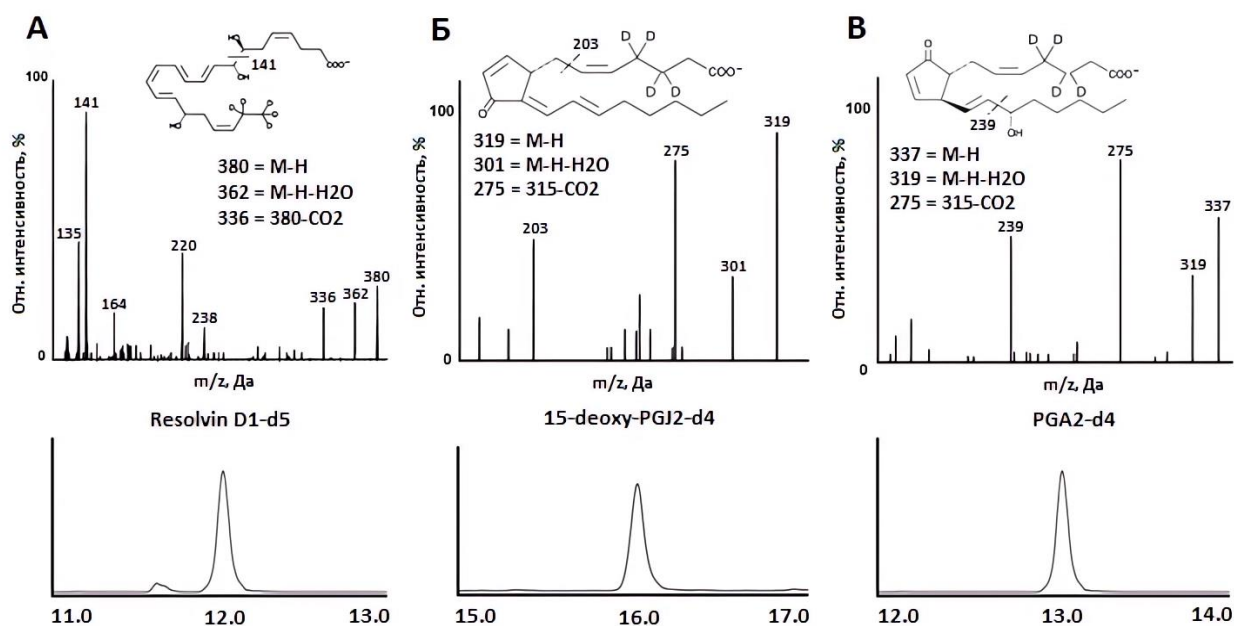


Рисунок 1. Спектры МС/МС и МRM-хроматограммы соединений Resolvin D₁-d₅ (А), 15-деoxy-Δ-12,14-PGJ₂-d₄ (Б) и PGA₂-d₄ (В).

Источник: составлено автором

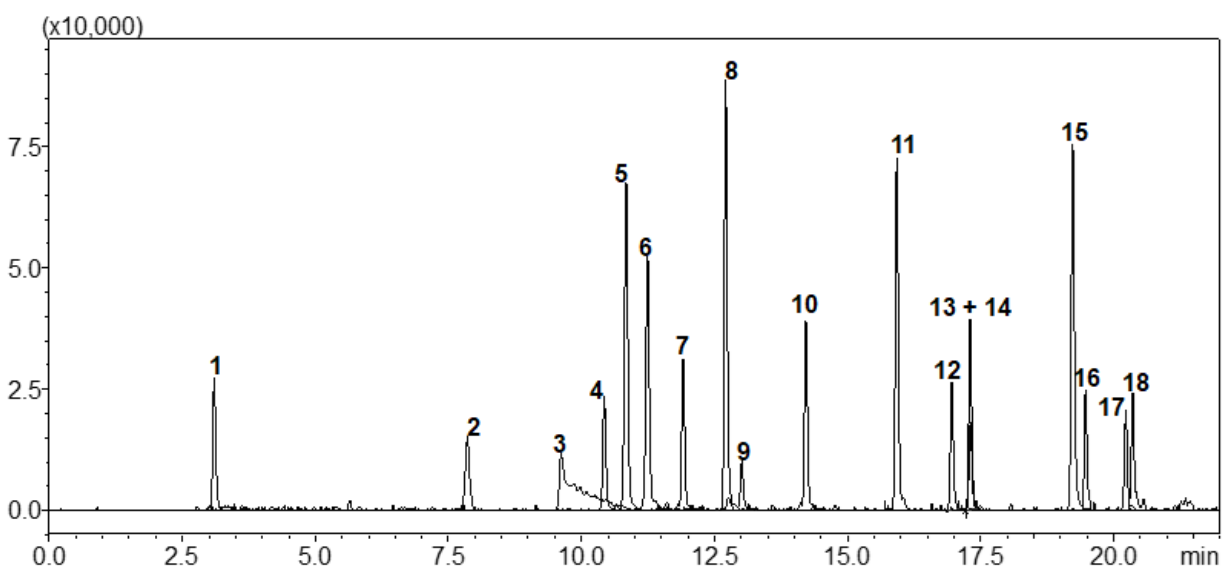


Рисунок 2. Масс-хроматограмма МRM-переходов, соответствующих используемым дейтеростандартам (С = 100 нг/мл): 1 – tetranor-PGEM-d₆, 2 – 6-keto-PGF_{1α}-d₄, 3 – TXB₂-d₄, 4 – PGF_{2α}-d₄, 5 – PGE₂-d₄, 6 – PGD₂-d₄, 7 – Resolvin D₁-d₅, 8 – LTC₄-d₅, 9 – PGA₂-d₄, 10 – LTB₄-d₄, 11 – 15-деoxy-Δ-12,14-PGJ₂-d₄, 12 – 15-НЕТЕ-d₈, 13 – 12-НЕТЕ-d₈, 14 – 5-НЕТЕ-d₈, 15 – ОЕА-d₄, 16 – ЕРА-d₅, 17 – ДНА-d₅, 18 – АА-d₈.

Источник: составлено автором

3.2. Изменения профиля оксипинов при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ). ПОУГ характеризуется дегенерацией ганглиозных клеток сетчатки, связанной с повышением внутриглазного давления (ВГД) вследствие затрудненного оттока водянистой влаги (ВВ) через трабекулярную сеть и увеосклеральный путь. ПНЖК и оксипиновы являются

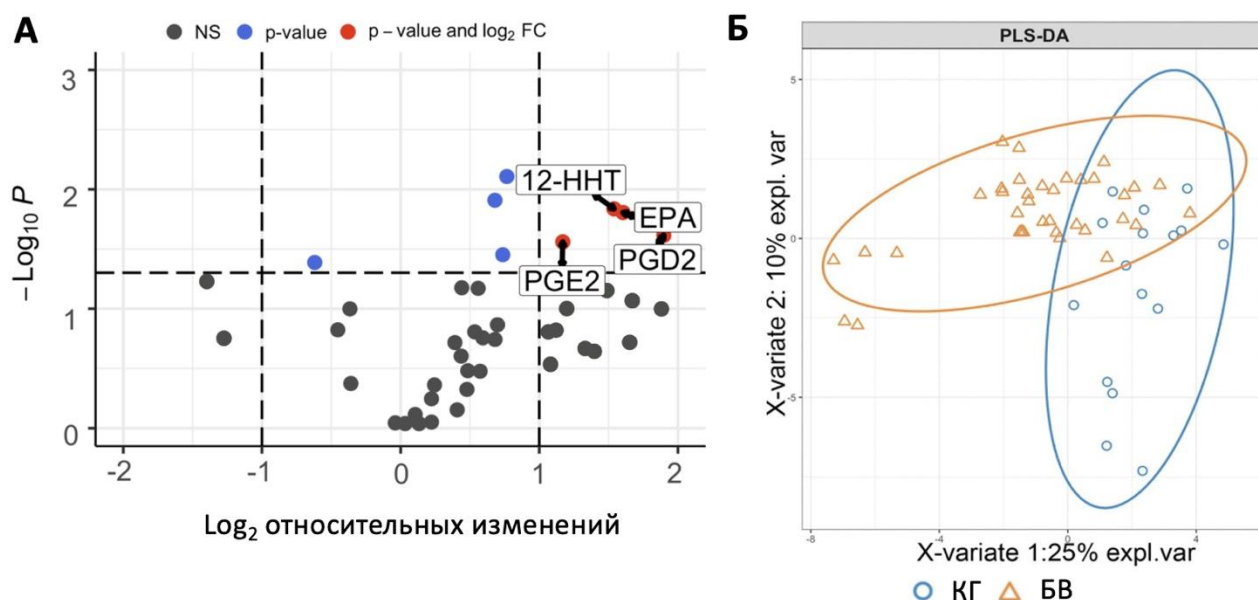


Рисунок 3. Различия в концентрации оксилипинов у пациентов с БВ и КГ. (А) Красным цветом выделены соединения, концентрация которых изменилась более чем в два раза, $p < 0,05$, с поправкой на множественное тестирование, синим цветом соединения, которые статистически достоверно отличались менее чем в 2 раза, черным цветом отмечены соединения статистически не отличающиеся; НЗ – $p < 0,05$; (Б) Результаты PLS-DA анализа сравнения пациентов с БВ и КГ.

Источник: составлено автором

сигнальными липидами, регулирующими нейровоспаление, выживаемость нейронов и отток ВВ. Известно, что метаболизм простагландинов связывают с глаукомой и их синтетические аналоги используют для ее терапии. Были проанализированы изменения профилюоксилипинов у пациентов с ПОУГ в зависимости от стадии заболевания. В качестве контроля использовали пациентов с катарактой без глаукомы. Соединения, различающие группы глаукомы, были распознаны с использованием статистических подходов ANOVA и PLS-DA. Среди 22 соединений, идентифицированных при ПОУГ, изменения при глаукоме были обеспечены небольшим набором медиаторов: 12,13-DiHOME, 9- и 13-HODE/KODE, арахидоновая кислота (AA) и lyso-PAF. Слезная жидкость (СЖ) показала сходные изменения липидов при ПОУГ. В целом, патогенез ПОУГ может включать пути, зависимые от AA/PAF и окислительного стресса, о чем свидетельствует увеличение его маркеров (KODE и 12,13-DiHOME).

3.3. Изучение профиля оксилипинов в животных моделях офтальмологических заболеваний – повреждение роговицы и светоиндуцируемого повреждения сетчатки. Повреждение роговицы (ПР) – распространенная патология, характеризуется снижением выработки и стабильности СЖ, что приводит к высыханию, воспалению и развитию повреждения роговицы. Лечение ПР может включать воздействие на воспалительные процессы, опосредованные ПНЖК и оксилипинами. Используя животную модель ПР, вызванного общей анестезией, были охарактеризованы воспалительные изменения в

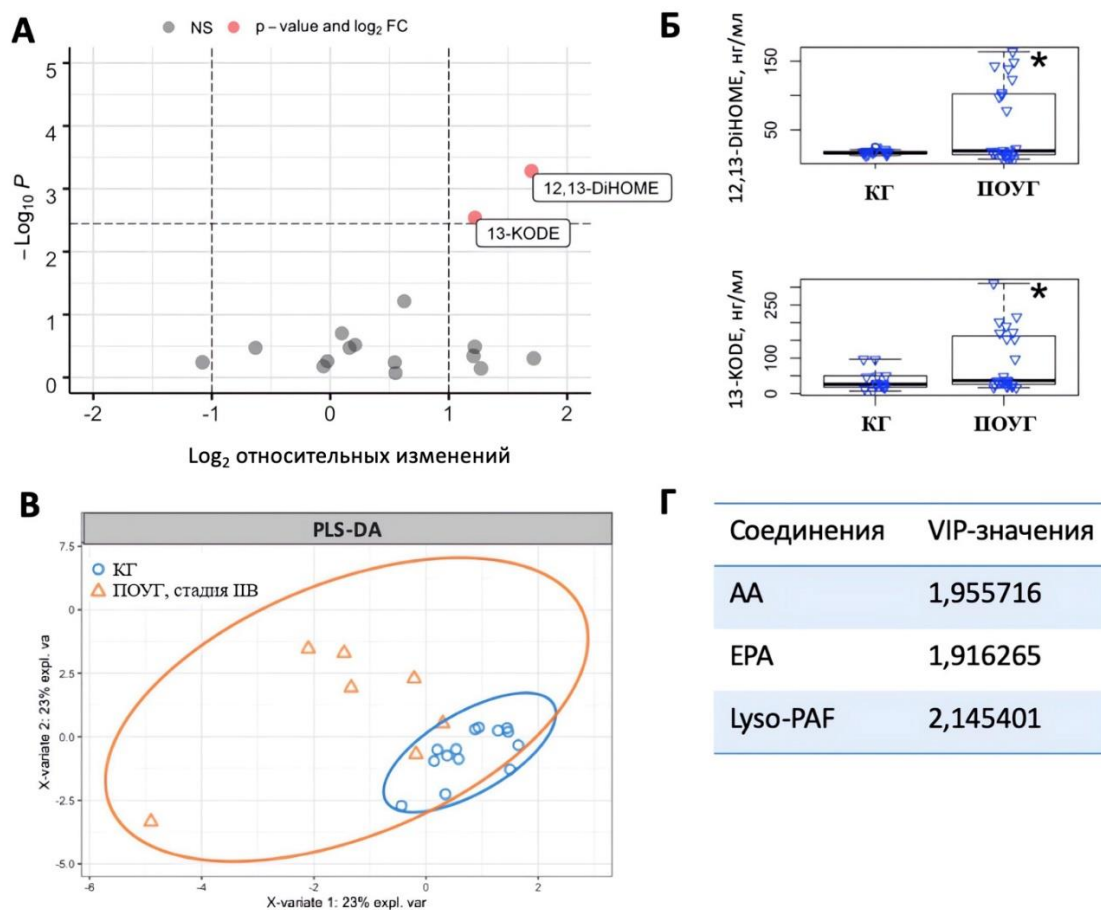


Рисунок 4. Сравнение профилей оксипинов у пациентов с ПОУГ и КГ. (А) Красным цветом выделены соединения, которые изменились более чем в два раза, $p < 0,05$, с поправкой на множественное тестирование. (Б) Отображение изменившихся соединений приведенное в нг/мл, $*p < 0,05$. (В) Результаты PLS-DA, показывающие соединения, отличающие ПОУГ ПВ стадии от КГ, (Г) отображение VIP-значений после применения PLS-DA анализа.

Источник: составлено автором

липидоме СЖ. Воспалительный ответ проявлялся в СЖ в виде кратковременного повышения уровня оксипинов, производных линолевой (LA) и α -линоленовой (ALA) кислот, с последующим повышением уровня AA и ее производных: LTB₄ (5-LOX), 12-НЕТЕ (12-LOX), PGD₂, PGE₂ и PGF_{2 α} (продукты COX), наблюдавшихся до 7 дней. На основе анализа этих данных был предложен оригинальный подход к терапии ПР с использованием диметилсульфоксида (ДМСО). Терапия заметно улучшила состояние роговицы при ПР за счет ослабления цитокин- и оксипин-опосредованных воспалительных реакций, не влияя на скорость слезопродукции.

На следующем этапе мы оценили, как профиль оксипинов меняется при воспалении, связанном с дегенерацией сетчатки, вызванной ярким видимым светом (LIRD), используя кроликов в качестве модельных животных. Анализ профиля оксипинов ВВ выявил повышение концентрации AA, DHA и lyso-PAF, наряду с выраженными окислительными и воспалительными изменениями уровней содержания оксипинов. Эти изменения включают

длительное повышение уровня простагландинов, которые синтезируются из АА через COX пути, а также кратковременный всплеск производных LA, которые могут продуцироваться как ферментативными, так и неферментативными механизмами, зависимыми от свободных радикалов. Активация всех оксилипинов ингибируется премедикацией глаз при использовании митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1, тогда как накопление простагландинов и lypo-PAF может быть специфически подавлено местным лечением ингибитором COX непафенаком. Наиболее заметные антиоксидантные и противовоспалительные, а также общие защитные эффекты сетчатки достигаются при одновременном введении обоих препаратов, что свидетельствует об их синергическом действии. В совокупности эти результаты дают обоснование для использования комбинации митохондриально-направленного антиоксиданта и ингибитора COX для лечения воспалительных компонентов дегенеративных заболеваний сетчатки.

3.4. Оценка противовоспалительных свойств агонистов ядерных рецепторов PPAR в модели нейровоспаления с помощью анализа профилей оксилипинов. Нейровоспаление является ключевым процессом многих нейродегенеративных заболеваний и других нарушений головного мозга, и астроциты играют существенную роль в нейровоспалении. Регуляция ответов астроцитов на воспалительные стимулы с помощью малых молекул является потенциальной терапевтической стратегией. Исследовали противовоспалительные эффекты шести лигандов рецепторов, активируемого PPAR, для модуляции стимулирующего эффекта липополисахарида (LPS) в первичных астроцитах крыс на синтез производных ПНЖК (оксилипинов). Астроциты подвергали воздействию LPS отдельно или в комбинации с лигандами PPAR: PPAR α (фенофибрат, GW6471); PPAR β (GW501516, GSK0660); PPAR γ (росиглитазон, GW9662). Проведенный анализ позволил обнаружить 28 оксилипинов, классифицированных в соответствии с их метаболическими путями (Рис. 7). Все протестированные лиганды PPAR снижают уровень оксилипинов, производных COX, при этом оба лиганда PPAR β обладали наиболее сильным эффектом, агонист PPAR β (GW501516), является сильным индуктором про-разрешающих веществ, производных DHA: 4-HDOHE, 11-HDOHE, 17-HDOHE (Рис. 7Б). Таким образом, было показано, что лиганды PPAR β являются потенциальными про-разрешающими и противовоспалительными препаратами для воздействия на опосредованное глией нейровоспаление.

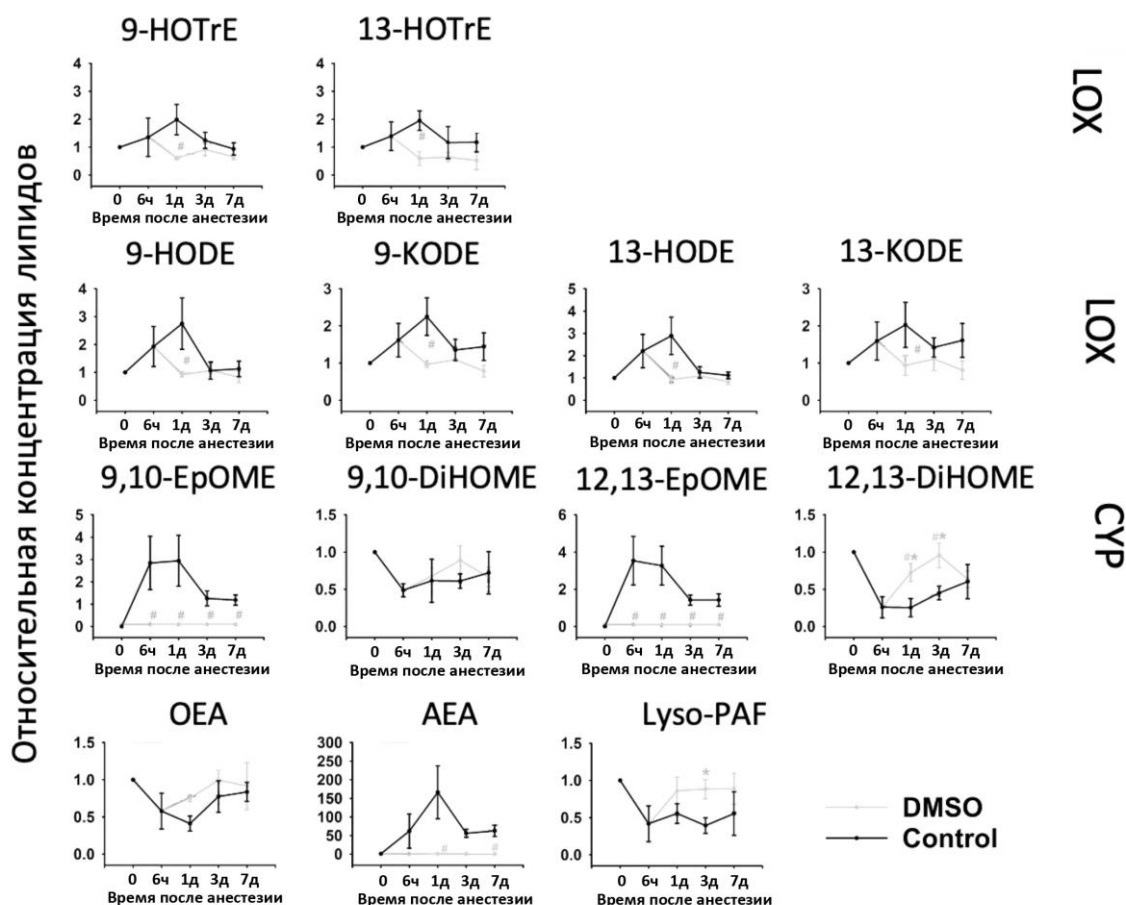


Рисунок 5. Динамические изменения содержания оксилипинов в СЖ при ПР на фоне противовоспалительной терапии. # $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией оксилипинов в СЖ животных без лечения (черный). * $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией оксилипинов в СЖ животных из группы ДМСО (серая линия).

Источник: составлено автором

3.5. Оценка влияния селективных ингибиторов ферментов 12-LOX (ML355), 5-LOX (зилеутон) на нейрональную цитотоксичность. В последнее время манипуляции с реактивными астроцитами рассматриваются как новый терапевтический подход, который позволит разработать методы лечения острых повреждений головного мозга и нейродегенеративных заболеваний. Астроциты могут выделять вещества, оказывающие нейротоксическое или нейропротекторное действие, но природа этих веществ до сих пор в значительной степени неизвестна. Была проверена гипотеза, что эти эффекты могут быть связаны с оксилипинами, которые синтезируются из ПНЖК. Установлено, что липидные фракции, секретируемые LPS-стимулированными культурами, обогащенными первичными астроцитами крыс, обладали нейротоксической активностью в первичных культурах нейронов крыс. Предложен подход для регулирования состава профилей оксилипинов, синтезируемых астроцитами, с использованием селективных ингибиторов 5-LOX (зилеутон) и 12-LOX (ML355) (Рисунок 8А). Сравнение токсичных и нетоксичных фракций липидов показало, что использование именно ML355 снижает нейротоксичность липидной фракции астроцитов, при

этом липидный профиль астроцитов обработанных ML355 был обогащен веществами способствующими разрешению воспаления - метаболитами ДНА 4-HDoHE и 17-HDoHE, что свидетельствует о перспективной роли ML355 в качестве нейропротекторного ЛС (Рисунок 8B,C).

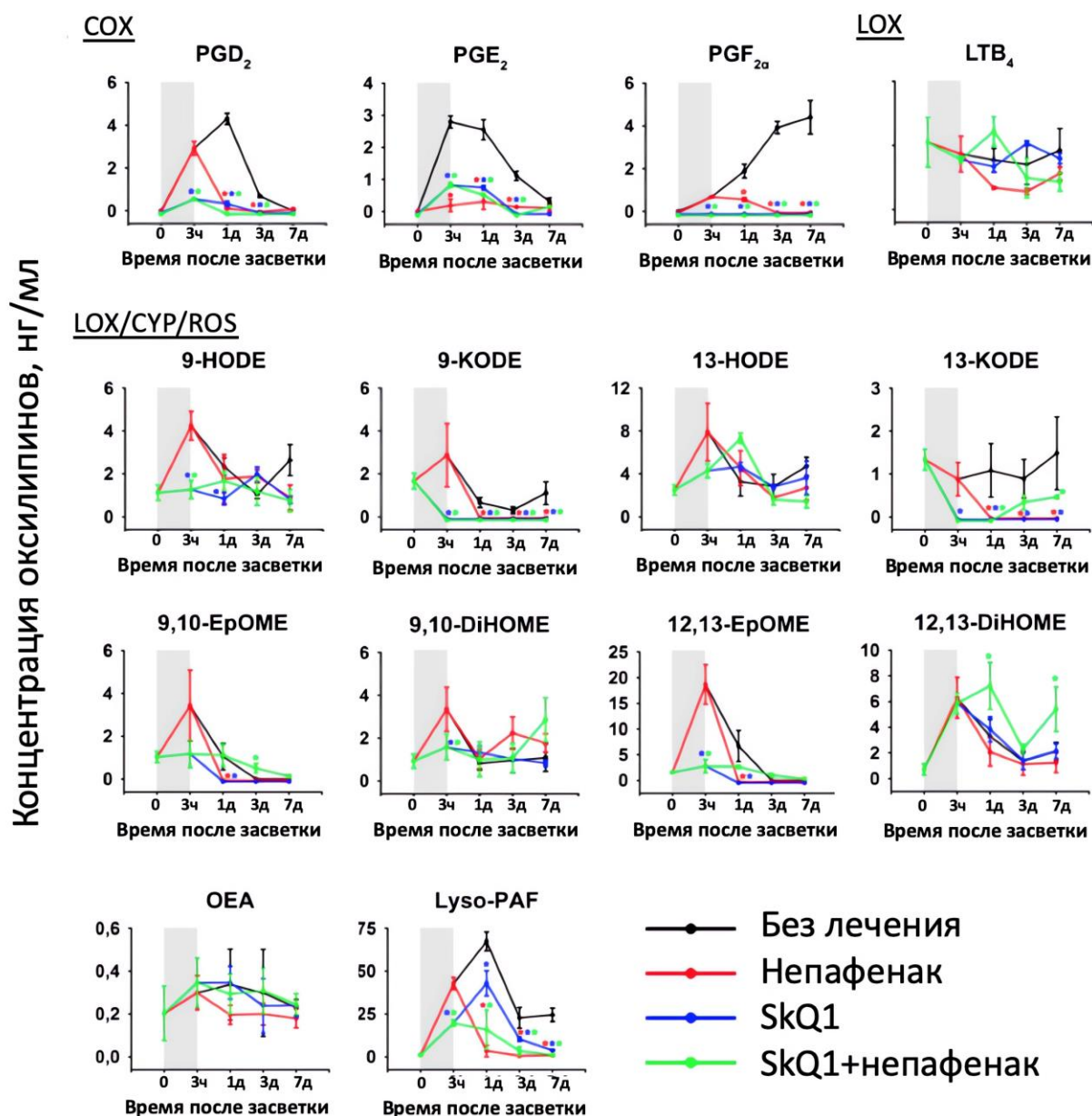


Рисунок 6. Динамические изменения содержания оксипинов во ВВ в условиях LIRD без лечения (черный), на фоне лечения непафенаком (красный), после премедикации SkQ1 (синий) и на фоне терапии комбинацией двух препаратов (зеленый). Глаза животных освещали интенсивным видимым светом (30000 лк) в течение 3 ч (время освещения показано серым прямоугольником). Образцы ВВ отбирали до (норма) и сразу после (3 ч) освещения, а также через 1, 3 и 7 дней после воздействия. * $p < 0,05$ по сравнению с показателями ВВ нелеченных облученных животных.

Источник: составлено автором

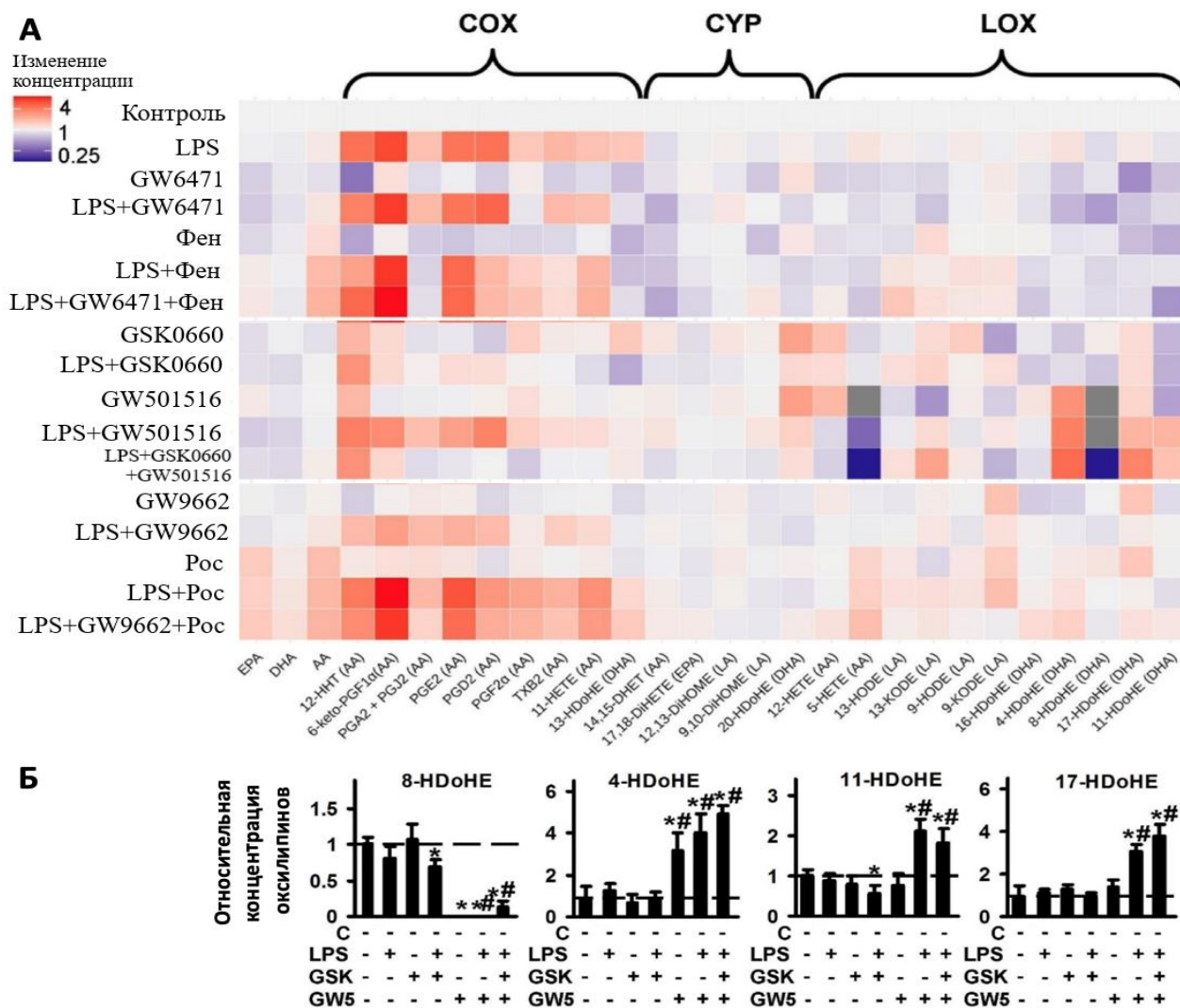


Рисунок 7. Влияние агонистов ядерных рецепторов PPAR на профиль оксипинов при стимуляции первичных астроцитов LPS. Исследовалось влияние следующих соединений - агонист PPAR α фенофибрат и антагонист GW6471, агонист PPAR β GW501516 и антагонист GSK0660, агонист PPAR γ росиглитазон и антагонист GW9662 на высвобождение оксипинов в астроцитах, стимулированных LPS. Во всех случаях первичные астроциты крыс предварительно обрабатывали в течение 30 мин лигандами PPAR по отдельности и в комбинации, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. (А) – Тепловая карта иллюстрирует изменение концентраций при обработке клеток исследуемыми соединениями по отдельности или в комбинации. (Б) – относительное изменение концентрации DHA-производных при стимуляции клеток лигандами PPAR β . * $p < 0.05$, по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0.05$, по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Источник: составлено автором

3.6. Исследование библиотеки дейтерированных соединений арахидоновой кислоты как потенциальных субстратов ферментов 5-LOX и 15-LOX-2. Дейтерирование незаменимых ПНЖК в бис-аллильных положениях предлагается как новый терапевтический подход в регуляции метаболических путей, связанных с биосинтезом оксипинов. Инкорпорирование атомов дейтерия в исходную молекулу AA приводит к инкременту молекулярной массы субстратов согласно числу присутствующих в молекулах атомов

дейтерия. Этот факт в совокупности с обстоятельством наличия атомов дейтерия при разных атомах углерода приводит к необходимости внимательного изучения МС/МС спектров образующихся под действием ферментов 5-LOX и 15-LOX-2 основных продуктов реакций (5-НЕТЕ, 8-НЕТЕ, 15-НрЕТЕ и 15-НЕТЕ) для подбора соответствующих MRM-переходов для их корректного детектирования. Иные параметры MRM-переходов (напряжения на префильтрах, времена регистрации и т.д.), кроме массовых чисел родительских и дочерних ионов, оставляли неизменными.

В ряде экспериментов по изучению ферментативных реакций 5-LOX с использованием дейтерированной АА по различным связям было установлено, что наличие атомов дейтерия при углеродных атомах C10 или C13 мало влияет на скорость образования 5-НЕТЕ. При этом наличие атомов дейтерия при углероде в позиции C10 резко снижает скорость образования 8-НЕТЕ. Такая блокировка синтеза 8-НЕТЕ связана с фактом увеличения барьера активации и приводит к сильному ингибированию этого процесса. Дейтерирование в позиции C13 вызывает значительное (почти в два раза) увеличение скорости образования 8-НЕТЕ (для субстратов 13,13-АА-d2 и 7,7,13,13-АА-d4).

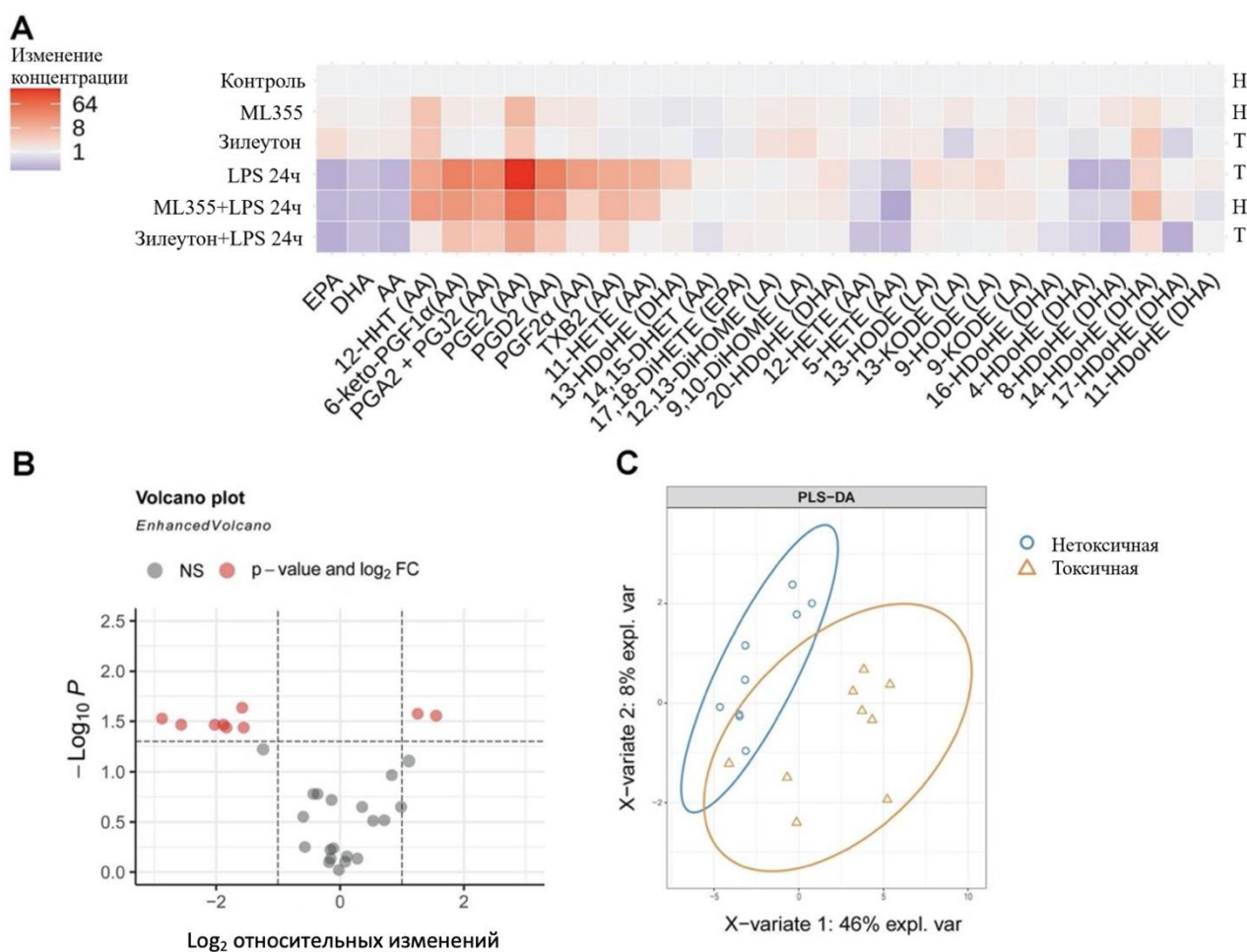


Рисунок 8. ML355 и зилеутон модулируют профили оксилипинов астроцитов, стимулированных LPS. Первичные культуры астроцитов крыс предварительно обрабатывали зилеутоном (10 мкМ) или ML355 (10 мкМ) в течение 30 минут, а затем стимулировали LPS

(100 нг/мл) в течение 24 часов. (А) Тепловая карта, показывающая относительное количество каждого соединения по сравнению с контролем, Н – нетоксичная фракция и Т – токсичная; (В) VolcanoPlot, отображающий количество соединений с наиболее значительно изменившейся концентрацией при сравнении токсичной и нетоксичной фракций. (С) Результаты PLS-DA анализа при сравнении токсичных (Т) и нетоксичных (Н) для нейронов фракций липидов.

Источник: составлено автором

Таблица 3. Кинетические параметры реакций образования 5-НЕТЕ и 8-НЕТЕ при взаимодействии АА и дейтерированных АА с ферментом 5-LOX.

| №№ | Субстрат | 5-НЕТЕ | | | 8-НЕТЕ | | | Соотношение продуктов реакции, % (5-НЕТЕ / 8-НЕТЕ) |
|----|-----------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|--|
| | | V _{max} (μМ/мин) | K _m (μМ) | Изотопный эффект Hkcat/Dkcat | V _{max} (μМ/мин) | K _m (μМ) | Изотопный эффект Hkcat/Dkcat | |
| 1 | АА | 1,151±0,21 | 17,3±3,5 | - | 0,025±0,008 | 22,9±4,6 | - | 98/2 |
| 2 | 7,7-АА-d2 | 0,020±0,01 | 22,4±4,5 | 58 | 0,023±0,007 | 21,7±4,3 | 1,0 | 51/49 |
| 3 | 10,10-АА-d2 | 0,933±0,15 | 15,9±3,2 | 1 | - | - | - | 100/0 |
| 4 | 13,13-АА-d2 | 1,154±0,12 | 19,8±4,0 | 1 | 0,043±0,004 | 25,2±5,0 | 0,5 | 98/2 |
| 5 | 7,7,10,10-АА-d4 | 0,037±0,015 | 16,6±3,3 | 31 | - | - | - | 100/0 |
| 6 | 7,7,13,13-АА-d4 | 0,093±0,015 | 25,6±5,1 | 12 | 0,054±0,015 | 20,4±4,1 | 0,5 | 60/40 |
| 7 | 10,10,13,13-АА-d4 | 0,665±0,09 | 21,7±4,3 | 2 | - | - | - | 100/0 |
| 8 | 7,7,10,10,13,13-АА-d6 | 0,040±0,02 | 23,5±4,7 | 29 | - | - | - | 100/0 |

Фермент 15-LOX-2 метаболизирует АА до 15-НрЕТЕ, которая затем превращается в 15-НЕТЕ, являющуюся предшественником семейства производных, участвующих в разрешении процесса воспаления, поэтому его чувствительность к различным дейтерированным модификациям АА важна для синтеза этих веществ. Активность 15-LOX-2 при замещении водорода на дейтерий в положении С10 (10,10-АА-d2, 7,7,10,10-АА-d4) практически не оказывает эффекта на синтез производных АА. При замещении водорода на дейтерий в положении С13 наблюдается прекращение синтеза производных (13,13-АА-d2, 7,7,13,13-АА-d4, 10,10,13,13-АА-d4, 7,7,10,10,13,13-АА-d6). Таким образом, чтобы контролировать этот путь синтеза эйкозаноидов в клетках, необходимо либо исключить использование АА, дейтерированной в С10 и С13 положениях (потенциальное усиление синтеза факторов разрешения воспаления), либо использовать такие дейтерированные формы АА для подавления образования целевых продуктов. Таким образом, *in vitro* показано потенциальное применение ЛС на основе дейтерированных АА в качестве регуляторов синтеза эйкозаноидов и перспективного способа борьбы с воспалительными процессами.

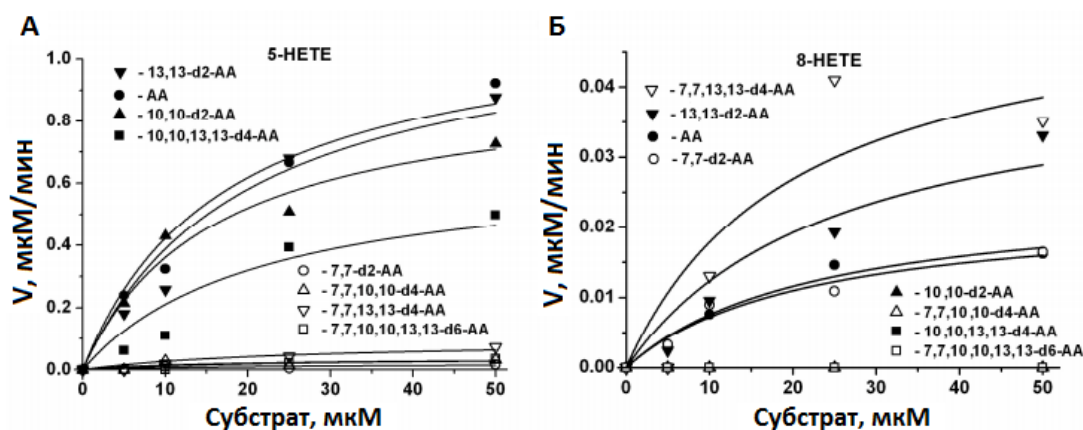


Рисунок 9. Кинетика образования 5-НЕТЕ (А) и 8-НЕТЕ (Б) под действием фермента 5-ЛОХ.

Источник: составлено автором

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный подход возможно использовать в лабораториях фармакокинетики, клинической фармакологии и метаболомного анализа для исследования различных патологий и оценки эффективности действия лекарственных веществ различных классов, а также для установления механизмов возникновения и развития социально-значимых заболеваний, ассоциированных с воспалительным процессом. В последующих исследованиях возможно расширение списка изучаемых биофлюидов (моча, цереброспинальная жидкость и т.д.) на количественное содержание оксипинов, а также увеличение числа целевых аналитов – оксипинов, возможных к определению при проведении одного анализа.

ВЫВОДЫ

1. Разработан оптимальный протокол пробоподготовки исследуемых биологических образцов (плазма крови, слезная жидкость, внутриглазная жидкость, клеточные супернатанты) для совместного изолирования оксипинов.
2. Проведена валидация разработанной методики количественного определения оксипинов в различных биологических образцах методом ВЭЖХ-МС/МС.
3. Показана возможность использования разработанной методики количественного определения оксипинов в экспериментах *in vivo* для исследования различных патологий на примере таких заболеваний как болезнь Вильсона-Коновалова, глаукома, модели повреждения роговицы.
4. Показана возможность применения разработанной методики для оценки эффективности действия лекарственных веществ различных классов на примере таких соединений как зилеутон, непафенак, SkQ1, ML355, фенофибрат, GW6471, GW501516,

GSK0660, росиглитазон, GW9662 в модельных экспериментах на первичных клеточных культурах и животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н. Чистякову Д.В. за всестороннюю помощь в ее выполнении. Автор выражает глубокую признательность своим Учителям, **д.х.н., проф. Г.А. Калабину** и **д.фарм.н., проф. В.В. Чистякову** за то, что были рядом много лет, поддерживали, делились опытом и помогали советами, а также семье и друзьям за поддержку в процессе проведения исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ЛС – лекарственное средство

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия с тандемным детектированием

MRM – мониторинг множественных реакций

ТФЭ – твердофазная экстракция

БГТ – бутилгидрокситолуол

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

ЕМА – Европейское медицинское агентство

СИ – средство измерения

СО – стандартный образец

ANOVA – метод однофакторного дисперсионного анализа

PLS-DA – метод дискриминантного анализа на основе частичных наименьших квадратов

AA – арахидоновая кислота (C20:4)

DHA – докозагексаеновая кислота (C22:6)

EPA – эйкозапентаеновая кислота (C20:5)

ALA – α -линоленовая кислота (C18:3)

LA – линолевая кислота (C18:2)

COX – циклооксигеназа

LOX – липоксигеназа

LPS – липополисахарид

КГ – контрольная группа

PPAR – рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором

БВ – болезнь Вильсона-Коновалова

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

ВГД – внутриглазное давление

ПР – повреждение роговицы

LIRD – дегенерация сетчатки, вызванная ярким видимым светом

ВВ – водянистая влага

СЖ – слезная жидкость

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

Международные базы цитирования:

1. Azbukina, N.V. Oxylipin Profiles in Plasma of Patients with Wilson's Disease / N.V. Azbukina, A.V. Lopachev, D.V. Chistyakov, **S.V. Goriainov**, A.A. Astakhova, V.V. Poleshuk, R. Kazanskaya, T.N. Fedorova, M.G. Sergeeva // *Metabolites*. – 2020. – V.10(6). – P.222. DOI: 10.3390/metabo10060222

2. Chistyakov, D.V. Comparative Lipidomic Analysis of Inflammatory Mediators in the Aqueous Humor and Tear Fluid of Humans and Rabbits // D.V. Chistyakov, N.V. Azbukina, A.A. Astakhova, **S.V. Goriainov**, V.V. Chistyakov, V.V. Tiulina, V.E. Baksheeva, V.I. Kotelin, E.V. Fedoseeva, A.A. Zamyatnin, P.P. Philippov, O.A. Kiseleva, A.M. Bessmertny, I.I. Senin, E.N. Iomdina, M.G. Sergeeva, E.Yu. Zernii // *Metabolomics*. – 2020. – V.16. – P.27. DOI: 10.1007/s11306-020-1650-y

3. Chistyakov, D.V. Mechanisms and treatment of light-induced retinal degeneration-associated inflammation: Insights from biochemical profiling of the aqueous humor / D.V.

Chistyakov, V.E. Baksheeva, V.V. Tiulina, **S.V. Goriainov**, N.V. Azbukina, O.S. Gancharova, E.A. Arifulin, S.V. Komarov, V.V. Chistyakov, N.K. Tikhomirova, A.A. Zamyatnin, P.P. Philippov, I.I. Senin, M.G. Sergeeva, E.Yu. Zernii // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V.21(3). – P.704. DOI: 10.3390/ijms21030704

4. Chistyakov, D.V. Inflammation in Dry Eye Syndrome: Identification and Targeting of Oxylipin-Mediated Mechanisms / D.V. Chistyakov, O.S. Gancharova, V.E. Baksheeva, V.V. Tiulina, **S.V. Goriainov**, N.V. Azbukina, M.S. Tsarkova, A.A. Zamyatnin, Jr., P.P. Philippov, M.G. Sergeeva, I.I. Senin, E.Yu. Zernii // Biomedicines. – 2020. – V.8(9). – P.344. DOI: 10.3390/biomedicines8090344

5. Chistyakov, D.V. Comparison of PPAR Ligands as Modulators of Resolution of Inflammation, via Their Influence on Cytokines and Oxylipins Release in Astrocytes / D.V. Chistyakov, **S.V. Goriainov**, A.A. Astakhova, M.G. Sergeeva // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V.21(24). – P.9577. DOI: 10.3390/ijms21249577

6. Guryleva, M.V. Modulation of the Primary Astrocyte-Enriched Cultures' Oxylipin Profiles Reduces Neurotoxicity / M.V. Guryleva, D.V. Chistyakov, A.V. Lopachev, **S.V. Goriainov**, A.A. Astakhova, Yu.A. Timoshina, A.V. Khutorova, T.N. Fedorova, M.G. Sergeeva // Metabolites. – 2021. – V.11(8). – P.498. DOI: 10.3390/metabo11080498

7. Azbukina, N.V. Targeted Lipidomic Analysis of Aqueous Humor Reveals Signaling Lipid-Mediated Pathways in Primary Open-Angle Glaucoma / N.V. Azbukina, D.V. Chistyakov, **S.V. Goriainov**, V.I. Kotelin, E.V. Fedoseeva, S.Yu. Petrov, M.G. Sergeeva, E.N. Iomdina, E.Yu. Zernii // Biology. – 2021. – V.10(7). – P.658. DOI: 10.3390/biology10070658

Горяинов Сергей Владимирович
(Российская Федерация)

**АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ОКСИЛИПИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ
КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Диссертационная работа посвящена разработке методики количественного определения оксилипинов в различных биологических матрицах. Разработан оптимальный протокол пробоподготовки исследуемых биологических образцов (плазма крови, слезная жидкость, внутриглазная жидкость, клеточный супернатант) для изолирования оксилипинов. Проведена валидация разработанной методики количественного определения оксилипинов в различных биологических образцах. Оценена возможность использования разработанной методики количественного определения оксилипинов в экспериментах *in vivo* для исследования различных патологий и для оценки эффективности действия ЛС различных классов в модельных экспериментах на первичных клеточных культурах и животных.

Goriainov Sergey Vladimirovich
(Russian Federation)

**OXYLIPINES PROFILE ANALYSIS IN BIOLOGICAL SAMPLES AS A NEW
APPROACH TO THE STUDY OF THE MECHANISMS OF DRUG ACTION**

The dissertation work is devoted to the development of a method for the quantitative determination of oxylipins content in various biological matrices. An optimal protocol has been developed for sample preparation of the studied biological samples (blood plasma, lacrimal fluid, intraocular fluid, cell supernatant) for the isolation of oxylipins. The developed method for the quantitative determination of oxylipins in various biological samples has been validated. The possibility of using this method for the quantitative determination of oxylipins *in vivo* experiments for the study of various pathologies and for evaluating the effectiveness of drugs of various classes in model experiments on primary cell cultures and animals has been evaluated.