

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Чистяков Дмитрий Викторович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Характеристика оксипиринов	14
1.2 Стабильность оксипиринов в различных биологических матрицах .	21
1.3 Особенности пробоподготовки и экстракции оксипиринов из различных биологических матриц	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1 Оборудование	35
2.2 Реактивы.....	35
2.3 Проведение экспериментов « <i>in vitro</i> » и « <i>in vivo</i> ».....	38
2.3.1 Первичная культура клеток астроцитов и нейронов.....	38
2.3.2 Определение ферментативной активности белка 5-LOX	39
2.3.3 Животная модель синдрома сухого глаза.....	40
2.3.4 Животная модель повреждения сетчатки под действием света.....	41
2.3.5 Отбор образцов плазмы человека	43
2.3.6 Сбор внутриглазной и слезной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и контрольных пациентов	44
2.4 Пробоподготовка образцов	45
2.5 Условия хроматографического разделения и масс- спектрометрического детектирования оксипиринов.....	46
2.6 Статистическая обработка.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ ...	49
3.1 Разработка оптимальной методики выделения оксипиринов из образцов плазмы крови, слезной жидкости, внутриглазной жидкости и клеточного супернатанта, и их детектирования	49
3.2 Валидация разработанных методик количественного определения оксипиринов.....	55
3.2.1 Селективность	55
3.2.2 Предел обнаружения.....	56

3.2.3	Нижний предел количественного определения	57
3.2.8	Стабильность	67
3.3	Апробация разработанного подхода	73
3.3.1	Изменения профиля оксипинов при болезни Вильсона-Коновалова.....	73
3.3.2	Изменения профиля оксипинов при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ).....	78
3.3.2.1	Изменения в содержании оксипинов во внутриглазной жидкости (ВГЖ), связанные с ПОУГ	80
3.3.2.2	Изменения в содержании оксипинов в слезной жидкости (СЖ), связанные с ПОУГ.....	81
3.3.3	Изучение профиля оксипинов в животной модели повреждения роговицы	84
3.3.4	Изучение профиля оксипинов в животной модели светоиндуцируемого повреждения сетчатки	87
3.3.5	Оценка противовоспалительных свойств агонистов ядерных рецепторов PPAR в модели нейровоспаления с помощью анализа профилей оксипинов.....	91
3.3.5.1	Сравнение лигандов PPAR α : агонист фенофибрат (Fen), антагонист GW6471 (GW6).....	92
3.3.5.2	Сравнение лигандов PPAR β : агонист GW501516 (GW5), антагонист и обратный агонист GSK0660 (GSK)	94
3.3.5.3	Сравнение лигандов PPAR γ : агонист розиглитазон (RG) и антагонист GW9662 (GW9).....	95
3.3.6	Оценка влияния селективных ингибиторов ферментов 12-LOX (ML355), 5-LOX (зилеутон) на нейрональную цитотоксичность	98
3.3.7	Исследование библиотеки дейтерированных соединений арахидоновой кислоты как потенциальных субстратов ферментов 5-LOX и 15-LOX-2.....	103
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108

ВЫВОДЫ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	113
ПРИЛОЖЕНИЕ	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одним из ключевых факторов патогенеза широкого спектра заболеваний, включая онкологические и неврологические, является воспаление [1]. Наряду с цитокинами, широко известными белковыми маркерами воспаления, особый интерес представляют низкомолекулярные соединения оксипирины – окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [2]. Изменения в концентрации и соотношении отдельных оксипиринов наблюдаются при различных заболеваниях и активно применяются для изучения их патогенеза [2]. Мишенью широко известных лекарственных средств (ЛС) противовоспалительного действия, таких как аспирин, ибупрофен, индометацин и др. является именно регуляция биосинтеза оксипиринов [3,4], при этом и новые препараты, разрабатываемые как регуляторы процессов воспаления при различных заболеваниях, также влияют на состав оксипиринов [5]. Количественный анализ как отдельных оксипиринов, так и их совокупности (профиля оксипиринов), долгое время был затруднен из-за низких концентраций этих соединений в биологических объектах [6]. Однако в последние годы развитие масс-спектрометрических подходов к анализу оксипиринов дали возможность изучать их биологическую активность как в контексте изучения механизмов действия ЛС [7,8], так и рассматривать их как потенциальные биомаркеры широкого спектра заболеваний, включая неврологические, онкологические патологии, болезни связанные с нарушением метаболизма и др. [9–11]. 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, методы концентрирования образцов, их стабилизации и прочие параметры, значимо влияющие на конечный результат эксперимента [6,12]. Таким образом, разработка подходов к анализу профиля оксипиринов в различных биологических образцах, углубленное и комплексное

исследование различных аспектов биосинтеза оксипинонов в модельных системах для изучения молекулярных механизмов развития различных социально-значимых заболеваний и изучение механизмов действия ЛС, воздействующих на профиль оксипинонов, на сегодняшний день является актуальной и перспективной задачей.

Степень разработки темы исследования. Масс-спектрометрический анализ профиля (более 100 соединений) оксипинонов с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) недавно вошел в широкую практику и описан, например, в работах [6,8]. Одновременно с распространением данного подхода были усовершенствованы отдельные аспекты детекции оксипинонов, в том числе методы экстракции [12], а также изучено влияние внешних факторов на стабильность этих липидов [13]. Развитие метода анализа открыло возможности для решения новых практических задач, связанных с биофармацевтическим анализом. К таким задачам можно отнести поведение оксипинонов в биологических жидкостях организма при разных заболеваниях с воспалительной компонентой и их влияние на исследование механизмов действия ЛС. Возникла необходимость сформировать практические подходы к использованию анализа профиля оксипинонов 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 в различных биологических образцах 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. **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 оксипиринов 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 оксипиринов 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 оксипиринов, 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. [14], а также руководствам FDA («Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation») [15], EMA («Guideline on bioanalytical method validation») [16] 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») [17]. 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 (оксилипины);
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.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**Международные базы цитирования:**

1. Azbukina, N. Oxylin Profiles in Plasma of Patients with Wilson's Disease / N. Azbukina, A. Lopachev, D. Chistyakov, **S. Goriainov**, A. Astakhova, V. Poleshuk, R. Kazanskaya, T. Fedorova, M. Sergeeva // *Metabolites*. – 2020. – V.10(6). – P.222. doi: 10.3390/metabo10060222
2. Chistyakov, D. Comparative Lipidomic Analysis of Inflammatory Mediators in the Aqueous Humor and Tear Fluid of Humans and Rabbits // D. Chistyakov, N. Azbukina, A. Astakhova, **S. Goriainov**, V. Chistyakov, V. Tiulina, V. Baksheeva, V. Kotelin, E. Fedoseeva, A. Zamyatnin, P. Philippov, O. Kiseleva, A. Bessmertny, S. Ivan, E. Iomdina, M. Sergeeva, E. Zernii // *Metabolomics*. – 2020. – V.16. – P.27. doi: 10.1007/s11306-020-1650-y
3. Chistyakov, D. Mechanisms and treatment of light-induced retinal degeneration-associated inflammation: Insights from biochemical profiling of the aqueous humor / D. Chistyakov, V. Baksheeva, V. Tiulina, **S. Goriainov**, N. Azbukina, O. Gancharova, E. Arifulin, S. Komarov, V. Chistyakov, N. Tikhomirova, A. Zamyatnin, P. Philippov, I. Senin, M. Sergeeva, E. 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 Oxylin-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 Oxylin 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' Oxylin 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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика оксилипинов

Липиды представляют собой большое семейство различных молекул, насчитывающее до 180000 органических соединений. Они выполняют множество разнообразных физиологических функций в организме, при этом различаются своими физико-химическими свойствами. Наряду со сфинголипидами, глицеролипидами, эндоканнабиноидами и N-ацилэтаноламинами оксилипины составляют сложную биохимическую сеть и играют ключевую роль в механизмах, лежащих в основе патофизиологических процессов многих заболеваний [18,19]. Оксилипины – это обширное семейство биологически активных веществ, которые образуются при оксигенировании полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [11], преимущественно, относящихся к омега-3 и омега-6 семействам. ПНЖК в основном находятся в положении sn-2 фосфолипидов клеточных мембран (внутренних и внешних), при воздействии на клетки различных стимулов ПНЖК высвобождаются с помощью ферментов семейства фосфолипаз A2 и далее метаболизируются по различным полиферментным каскадам, которые обозначают по ключевым ферментам: циклооксигеназная ветвь (COX), липоксигеназная ветвь (LOX), эпоксигеназная ветвь (CYP) метаболизма оксилипинов. Также выделяют превращение ПНЖК по анандамидному пути (ферменты эндоканнабиноидной системы) и неферментативный путь окисления [11,20,21]. Разнообразие ПНЖК и их метаболических путей преобразования приводит к появлению широкого спектра оксилипинов. Химические структуры некоторых оксилипинов представлены на Рисунок 1. Постоянно открываются новые низкомолекулярные медиаторы липидного обмена, предназначение и биологическую активность которых еще предстоит изучить в будущем.

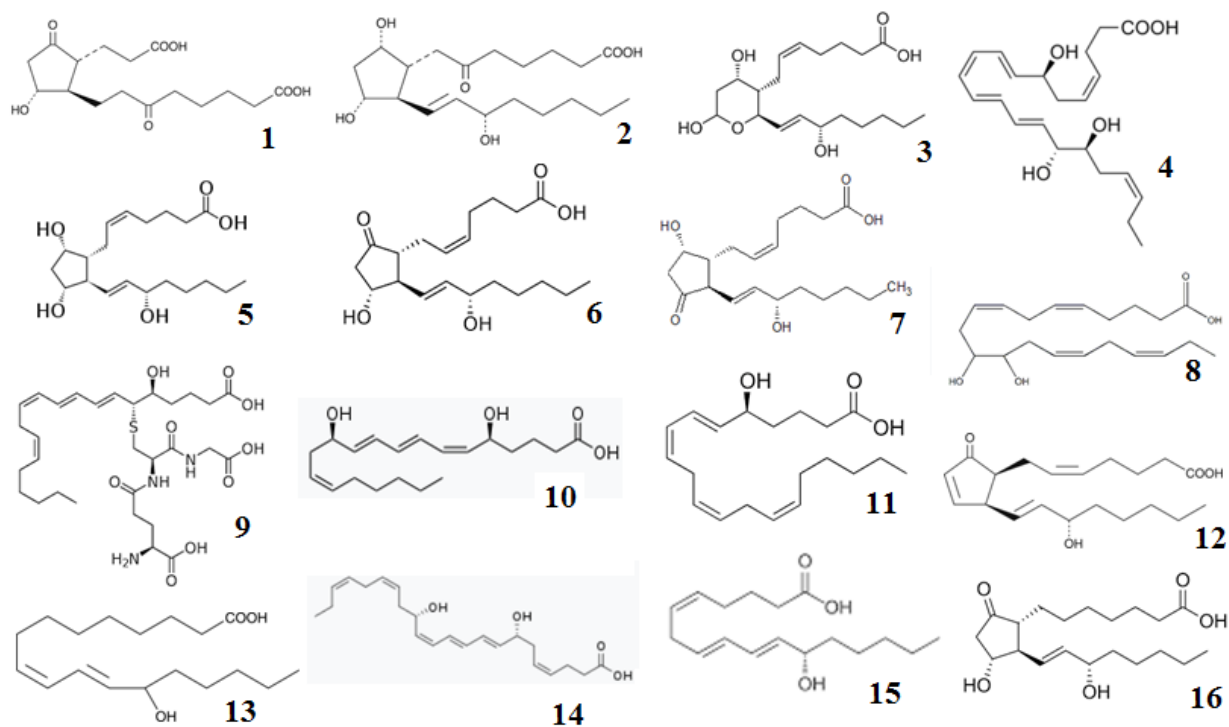


Рисунок 1. Химические структуры некоторых оксипинов: 1 – tetranor-PGEM; 2 – 6-keto-PGF_{1a}; 3 – TXB₂; 4 – Resolvin D₂; 5 – PGF_{2a}; 6 – PGE₂; 7 – PGD₂; 8 – 11,12-DiHETE; 9 – LTC₄; 10 – LTB₄; 11 – 5-HETE; 12 – PGA₂; 13 – 13-HODE; 14 – Maresin 1; 15 – 12-HHT; 16 – PGE₁.

Одной из наиболее широко изученных групп оксипинов являются эйкозаноиды (более 100 соединений), образующиеся из арахидоновой кислоты [22]. Простагландины (PG) и тромбоксаны (TX) образуются под действием ферментов семейства циклооксигеназ (COX) из таких ПНЖК как АА, ЕРА и DGLA. Гидроксиэйкозатетраеновые кислоты (HETE), лейкотриены 4-серии (LT) и липоксины 4-серии (LX) образуются, в основном, из АА с помощью фермента липоксигеназы (LOX), тогда как ЕРА является предшественником гидроксиейкозопентаеновых кислот (HEPE), лейкотриенов 5-серии (LT), липоксинов 5-серии (LX) и резольвинов E-серии (RvE). В дополнение к эйкозаноидам необходимо учитывать две другие группы оксипинов – докозаноиды и октадеканойды. Докозаноиды являются LOX-производными метаболитами докозагексаеновой кислоты (DHA) и включают

гидроксидокозагексаеновые кислоты (HDHA), марезины (MaR) и резольвины серии D (RvD), участвующие в процессах воспаления [23]. Октадеканойды являются LOX- и CYP-производными метаболитами из линолевой кислоты и включают гидроксидокозагексаеновые кислоты (HODE) [24]. Образование некоторых оксилипинов из ПНЖК представлено на Рисунке 2. По анандамидному пути образуются такие соединения, как анандамид (этаноламид арахидоновой кислоты, AEA) и 2-арахидоноилглицерин (2-AG) [25]. Перекисное окисление липидов является дегенеративным процессом, влияющим на патогенез заболеваний, участвующим в процессе разрешения заболеваний путем продукции сигнальных молекул или липидных медиаторов. Процесс неферментативного перекисного окисления ПНЖК, который усугубляется в условиях окислительного стресса, приводит к появлению большого числа окисленных соединений ПНЖК. Следует добавить, что исследования профилей оксилипинов затруднены не только разнообразием полиферментных путей метаболизма и сигналинга, но и коротким временем жизни этих метаболитов, а также их низкой концентрацией в биологических объектах. Остается неясным ответ на вопрос, как именно определяется результат ответа организма на сигнал, если одновременно в относительно небольших количествах синтезируются широкий спектр соединений разнонаправленного действия [11].

Оксилипины играют как положительную, так и отрицательную роль в ряде важных физиологических и патофизиологических процессов. Они включают регуляцию эндотелиальной функции, гомеостаза, лихорадки, боли, астмы, атеросклероза, диабета, метаболического синдрома, рака, являясь про- и противовоспалительными агентами [26–31]. Эпоксидэйкозатриеновые кислоты (EET) и некоторые HETE представляют собой продукты цитохрома P450 (CYP), полученные из АА. EET могут метаболизироваться эпоксидгидролазой до дигидроксиэйкозатетраеновых кислот (DHET) [22]. Все большее число работ подчеркивает их роль в инициации и развитии сердечно-сосудистых и респираторных заболеваний, гипертонии [32,33].

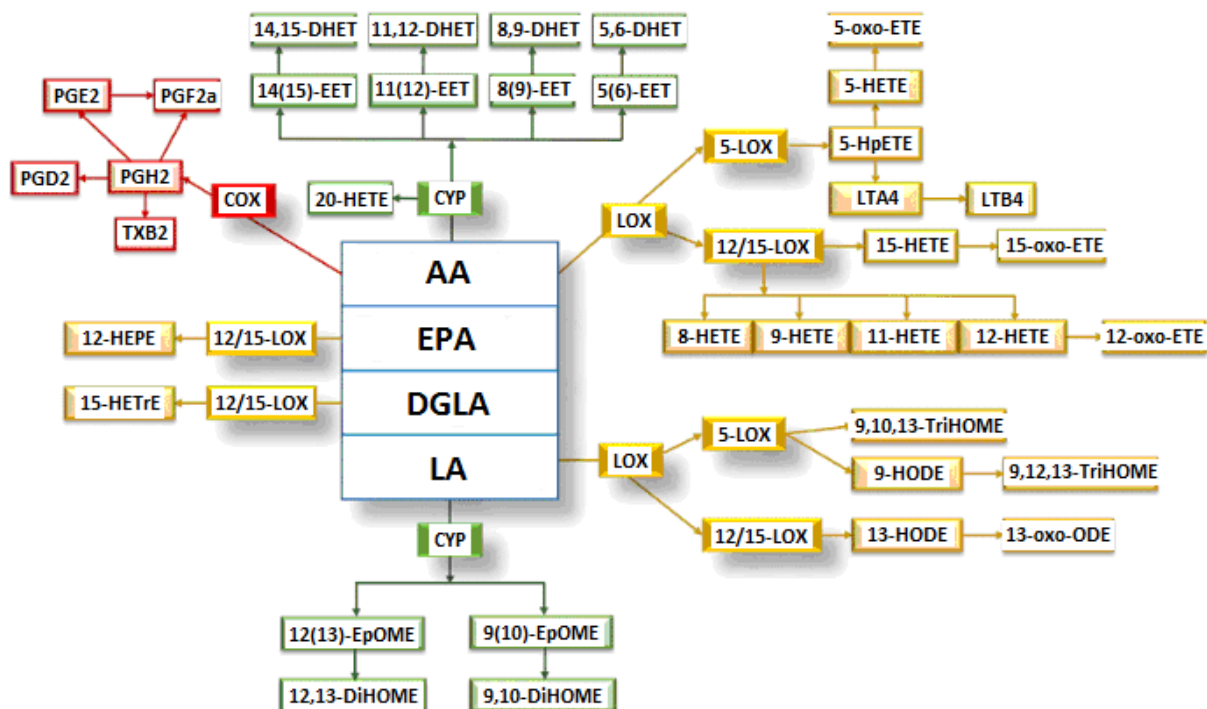


Рисунок 2. Образование некоторых оксипинов из основных ПНЖК.

Считается, что изопростаны являются неферментативными метаболитами АА. Они связаны с окислительным стрессом и участвуют в ряде заболеваний, таких как астма [34] и муковисцидоз [35].

Оксипины выполняют роль сигнальных молекул, которые регулируют самые разные физиологические и патологические процессы, такие как воспаление, боль, развитие аллергических реакций и иммунного ответа, деление клеток и их секреторную активность, модулируют состояние микроциркуляции, регенерацию тканей и т.д. [36]. Эффекты, опосредованные оксипинами, относят к числу главных факторов, способных влиять на возникновение и прогрессию злокачественных новообразований [37–39].

Изменение работы полиферментных систем, образующих оксипины, обнаруживают при вялотекущем воспалении в жировой ткани, что дает основания включать эти нарушения в число ключевых звеньев патогенеза злокачественных опухолей, ассоциированных с ожирением [40,41]. При этом, метаболические сигналы, источником которых является жировая ткань, не

ограничиваются микроокружением опухоли и могут оказывать системное влияние, как на рост, так и на метастазирование опухоли [42]. При раке молочной железы и раке толстой кишки ферменты COX-1 и COX-2, входящие в систему метаболизма оксипинонов, рассматривают как потенциальную мишень для терапевтического воздействия, а селективное подавление активности циклооксигеназ считается перспективным направлением поиска средств для лекарственной профилактики развития неопластических нарушений [43,44]. Оценку роли эйкозаноидов при различных болезненных состояниях и в патогенезе многих заболеваний проводили в работе [45]. Устанавливали профиль оксипинонов в целях потенциального использования в кардиохирургии [46], в процессах изучения выделения адипоцитами цитокинов, которые участвуют в ожирении и метаболическом синдроме [47], а также в окислительном стрессе/воспалении печени [48]. Другие примеры работ, проведенных за последнее десятилетие и связанных с изучением количественного содержания оксипинонов при различных заболеваниях и изменение их концентраций, представлены в Таблице 1.

В медицине в качестве ЛС уже применяются и активно разрабатываются как различные ферментативные ингибиторы биосинтеза оксипинонов, такие как НПВП аспирин/ибупрофен и др. (ингибиторы COX ветви биосинтеза оксипинонов [49]), zileuton, препарат против астмы (ингибитор 5-LOX [50]), так и синтетические аналоги самих оксипинонов, в первую очередь простагландинов, используемых например для терапии глаукомы [51]. Разрабатываются и новые модифицированные НПВП, которые оказывают различное влияние на процессы образования оксипинонов из ПНЖК. Так, в работе [52] были разработаны специфические ингибиторы простагландина E синтазы-1, а в работе [53] сообщили о новой форме аспирина, которая выделяет как оксид азота (NO), так и сероводород (H₂S). Некоторые эйкозаноиды используются в качестве лекарственных средств. Примерами таких препаратов являются альпростадил и мизопропростол (синтетические аналоги естественного простагландина E₁, PGE₁).

Таблица 1. Изменение профиля оксипинов крови при различных заболеваниях

№№	Заболевание	Оксипин	Прекурсор	Изменение концентрации	Ссылка
1	Ожирение	5-, 11-, 15-, 20-НЕТЕ	АА	↑	[54,55]
		12,13-DiНОМЕ, 12,13-ЕрОМЕ	LА	↓	
		15-НЕТrЕ	DGLA	↑	
		5-, 8-, 12-НЕТЕ	АА	↑	[56]
		PGD ₂	АА	↑	[57]
2	Болезнь Вильсона-Коновалова	12-ННТ, PGE ₂ , PGD ₂	АА	↑	[25]
		EPA	-	↑	
3	Болезнь Паркинсона	LTE ₄ , AEA	АА	↓	[58]
		АА	-	↓	
		12-НЕТЕ, 19-НЕТЕ	АА	↑	[59], [60]
		20-carboxy-АА, 14,15-DHET	АА	↓	
		AEA	АА	↓	
4	Болезнь Альцгеймера	Сумма НОДЕ	LА	↑	[62]
		14,15-DiНЕТrЕ	АLА	↑	[63]
		5,6-DiНЕТrЕ, 8,9-DiНЕТrЕ, 11,12-DiНЕТrЕ	АА	↑	
		8-iso-15(R)-PGF ₂ α, 4(RS)-F4t-NeuroP, Нейропростаны, Изопростаны	АА	↑	[64]
		PGF ₂ α	АА	↓	
5	Метаболический синдром	LXA ₄	АА	↓	[65]
6	Диабет II типа	11,12-, 14,15-DiНЕТrЕ, 11(12)-, 14(15)-ЕрЕТrЕ	АА	↑	[66]
		9(10)-ЕрОМЕ, 12(13)-ЕрОМЕ	LА	↑	
		9(10)-ЕрОДЕ	АLА	↑	
7	Рак молочной железы	9-,13-НОДЕ; 9-,13-НОTrЕ	LА	↑	[67,68]
		12-ННТ	АА	↑	
		PGA ₂ +PGJ ₂ , 12-НЕТЕ, 11-НЕТЕ, LXA ₅ , PGE ₂	АА	↑	[69]
		RvD ₁	DHA	↓	
		16-HDoHE, 20-HDoHE	EPA	↑	
		9,10-ЕрОМЕ, 12,13-ЕрОМЕ	LА	↓	

		5-HETE, 20-carboxy-AA, AEA	AA	↓	
		9-HODE	LA	↑	
		AA	-	↑	
		11-HDoHE	EPA	↓	
		15-HETrE	DGLA	↓	
8	Рак толстой кишки	2,3-dinor-PGF _{2α} , 19-HETE, 12-keto-LTB ₄	AA	↑	[70]
		9-HODE, 13-HODE	LA	↓	[71]
		13-HOTrE, 9-HOTrE	ALA	↓	
		5-iPF _{2α} -VI	AA	↑	
		11-HETE, 8-HETE, 15-HETE, 12-HHT	AA	↓	
		9-HODE, 13-HODE, 12,13-diHOME	LA	↓	
		DHA	-	↓	[72], [73]
		TXB ₂ , 12-HETE, 8-HETE	AA	↑	
		12,13-DiHOME, 13-HODE, 9-HODE, 9,12,13-TriHOME	LA	↑	
9	Гипотиреоз	PGI ₂	AA	↑	[74]
		PGE ₂ , 12-HETE	AA	↓	
10	Гипертиреоз	12-HETE, 20-HETE	AA	↑	[74]

Альпростадил используется для постоянного лечения эректильной дисфункции и обладает сосудорасширяющими свойствами. Мизопростол используется для предотвращения язвы желудка при приёме на постоянной основе, для лечения пропущенного выкидыша, для стимулирования родов и аборта. Он был показан для лечения пептидных язв, а затем был принят в 1990-х годах для использования в качестве утеротоников при лечении послеродового кровотечения [75].

Таким образом, сложность ферментативных и неферментативных превращений в ПНЖК в оксипирины, обилие соединений со схожей химической структурой, но разными физиологическими свойствами ставит задачу по глубокому изучению возможностей определения количественного содержания оксипиринов в стандартизированных моделях клеточных культур

и биообразцов, что открывает особые перспективы для широкого круга прикладных исследований, ассоциированных с воспалительным процессом.

1.2 Стабильность оксилипинов в различных биологических матрицах

Оксилипины являются нестабильными соединениями, это обстоятельство необходимо учитывать при сборе образцов для исследований. Поскольку деградация тканей и свободнорадикальное окисление могут происходить в течение минут и даже секунд, образцы тканей должны быть быстро заморожены в жидком азоте, биофлюиды должны храниться на льду до обработки, а клеточные культуры должны обрабатываться охлажденными растворителями. Учитывая, что неферментативное перекисное окисление липидов может происходить даже при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (деградация и потеря аналитов были обнаружены для некоторых резольвинов и простаноидов, образующихся из DHA и EPA), все образцы должны храниться при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и следует избегать циклов заморозки/разморозки образцов [76].

Для предотвращения этой проблемы можно использовать антиоксиданты. Даже непродолжительное хранение крови при комнатной температуре перед дальнейшей обработкой оказывает огромное влияние на концентрацию оксилипинов в плазме. После хранения цельной крови в течение 60 минут уровни нескольких оксилипинов значительно снижаются (например, 15-НЕТЕ и 14(15)-ЕрЕТрЕ), тогда как другие аналиты образуются «*ex vivo*» (например, PGE₂) [77]. Выдерживание образцов в центрифуге в течение нескольких минут после центрифугирования и до сбора и замораживания также может привести к значительному снижению уровня некоторых оксилипинов [77]. В работе [78] наблюдали, что хранение порошка мозговой ткани при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение примерно четырех недель приводило к

снижению массы PG в 2-4 раза. Несмотря на то, что нестабильность растворов некоторых простагландинов при хранении была показана еще в 1983 году [79], мало данных собрано по стабильности оксипинов в водных растворах, несмотря на их широкое использование в экспериментах «*in vitro*». В работе [80] обнаружено, что при комнатной температуре растворы простагландинов в смеси метанола, воды и муравьиной кислоты были стабильны. Однако не была исследована их стабильность в биологических жидкостях или клеточных культурах. В работе [81] показано, что различные классы оксипинов - PG, LT, HETE, HODE и EET демонстрируют различную скорость деградации, что связано с их химической структурой. Известно, что эйкозаноиды значительно стабилизируются в присутствии альбумина в питательных средах, в работе [82] установлено, что PGE₂ не меняет концентрацию в среде для культивирования клеток после хранения в течение 24 часов при температуре +4 °C или в течение 4 недель при -20 °C. При этом следует отметить, что такие метаболиты, как LTD₄ или те, что образуются из EPA, и имеют большее число двойных связей, изначально менее стабильны, чем PGE₂.

При использовании клинического материала следует обращать внимание на такой фактор, как использование гепарина при лечении пациентов, поскольку он приводит к индуцированной гепарином активности фосфолипазы A₂ и повышению уровня оксипинов [46]. Кроме того, рекомендуется собирать образцы в одно и то же время в течение дня, чтобы уменьшить потенциальное влияние циркадного ритма, который может влиять на некоторые оксипины, концентрации которых уменьшаются в течение дня после утреннего пика [83]. В сыворотке коагуляция частично опосредуется каскадом AA и вызывает массивное «*ex vivo*» образование таких оксипинов, как TXB₂ и 12-HETE, а обнаруживаемость липидных медиаторов низкой концентрации (например, резольвинов) в сыворотке выше по сравнению с плазмой [77].

Другая проблема, связанная с потерей при переносе образцов, возникает при использовании в качестве суррогатной матрицы смеси фосфатно-солевого

буфера и метанола, содержащего бутилгидрокситолуол (БГТ) / этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Из-за липофильной природы оксипинонов и отсутствия белка в матрице может происходить неспецифическое связывание, которое приводит к потере аналитов из-за адсорбции на гидрофобной поверхности полипропиленовых материалов при переносе. Обычно эти потери при подготовке образца компенсируются калибровочной кривой, однако при изначально низком уровне оксипинонов в пробе и/или длительном времени переноса может происходить значительная потеря аналитов [84]. В пробирках для сбора крови, присутствующих на рынке, могут обнаруживаться различные нежелательные компоненты, например силиконы, могут использоваться в качестве смазок для пробок или в качестве внутренних покрытий. Кроме того, могут влиять различные активаторы/ингибиторы коагуляции, полимеры и пластификаторы, присутствующие на стенках пластиковых трубок и резиновых пробках [85]. Все описанные химические соединения, экстрагируемые из пластиковых контейнеров и искажающие результаты анализа, могут быть обнаружены методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) [85]. Некоторые вещества, такие как УФ-стабилизаторы из стандартных поливинилхлоридных пробирок или пластификаторы из стандартных полипропиленовых микроцентрифужных пробирок могут мешать анализу методами ВЭЖХ-МС [86,87] и ГХ-МС [88].

Использующийся для восстановления пероксидов до их одноатомных эквивалентов трифенилфосфин (TRP) и ингибитор свободно-радикальных реакций БГТ могут быть добавлены к образцам во время сбора образцов [89,90]. Оба реагента предотвращают превращение ПНЖК в пероксильные радикалы [89] и деградацию/образование оксипинонов (например, 11-НЕТЕ, 9-НЕТЕ, изопростаны) путем свободно-радикального окисления во время приготовления образцов [77]. Используются различные концентрации БГТ (от 0,005% до 0,2%) [54,89,91,92].

1.3 Особенности пробоподготовки и экстракции оксипинов из различных биологических матриц

Выбор стратегии очистки образцов и выделения оксипинов зависит от происхождения образца. Образцы клеточных культур, например, клеточные супернатанты и лизаты, являются более «чистыми», с точки зрения комплексности матрицы, чем образцы сыворотки, плазмы крови или гомогенаты тканей. Используются различные процедуры очистки образцов, в том числе, осаждение белков, жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), иммуноаффинная хроматография (ИАХ) и твердофазная экстракция (ТФЭ). Осаждение белков – наименее трудозатратный вариант пробоподготовки, осуществляется путем добавления к пробе двух объемов смешивающихся с водой органических растворителей, таких как метанол, что обычно обеспечивает высокую эффективность экстракции (>90%). Поскольку оксипины могут быть осаждены вместе с белками, с которыми они неспецифически связываются, этот метод экстракции не очень подходит для анализа метаболитов, присутствующих в образцах в очень низких концентрациях. ЖЖЭ, выполняемая с использованием несмешивающихся с водой органических растворителей (часто используют этилацетат, дихлорметан и смесь гексан-этилацетат), показывает достоверные результаты для РG, НЕТЕ и ЕЕТ, но не для более гидрофильных соединений, таких как, например, цистеиниллейкотриены[93]. ИАХ широко используется в качестве этапа подготовки образца для количественного анализа аутокоидов, лекарств и токсинов. Более высокая специфичность этого метода обусловлена использованием одного или нескольких химически иммобилизованных антител. Иммуноаффинная очистка может рассматриваться как «золотой стандарт» для экстракции и выделения эндогенных соединений[93]. Однако, колонки и сорбенты ИАХ коммерчески доступны лишь для очень небольшого числа оксипинов [94]. Это ограничивает применимость этого метода

экстракции для более широкого спектра соединений в биологических образцах.

В настоящее время наиболее часто используемым методом для пробоподготовки при анализе оксипинонов является твердофазная экстракция (ТФЭ). Осаждение белков часто предшествует выполнению процедуры ТФЭ [95,96]. Для количественного выделения эйкозаноидов используют несколько видов сорбентов. Наиболее часто используемые материалы представляют собой липофильные сорбенты с обращенной фазой, например, октадецилоксид кремния, материалы со смешанной фазой или гидрофильные материалы с нормальной фазой, такие как диоксид кремния. Сравнение показало, что картриджи DSC-C8 обеспечивают относительно лучшее извлечение целевых аналитов, чем картриджи типа Superclean LC-8, Sep-Pack C18 или Oasis HLB [97]. Особая осторожность необходима для предотвращения совместного извлечения с целевыми аналитами соединений, которые могут вызвать подавление ионов, в частности фосфолипидов [98]. ИАХ или ТФЭ применяются и для концентрирования целевых соединений перед анализом. Как правило, ТФЭ позволяет достичь уровня извлечения аналитов выше 90%. Выход при экстракции варьируется от 35 до 100% в зависимости от различных факторов, таких как физико-химические свойства оксипинонов, марка и тип сорбента, а также от используемого протокола извлечения целевых аналитов. Примеры применяемых аналитических стратегий определения количественного содержания оксипинонов в образцах различного генезиса представлены в Таблице 2. После испарения растворителя, использованного для элюирования оксипинонов из картриджей ТФЭ или ИАХ, сухой остаток перерастворяют в 100-200 мкл подходящего органического растворителя или смеси растворителей. Добавление небольшого количества воды может быть полезным для улучшения хроматографического разрешения более полярных аналитов. Приборный анализ желательно выполнять как можно быстрее после проведения

пробоподготовки, в ином случае экстракты предпочтительно хранить в замороженном виде при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в темном месте.

1.4 Физико-химические методы анализа оксипинов

Всестороннее понимание того, как оксипиновы влияют на здоровье человека и установление их роли в патофизиологических процессах требует понимания их биосинтеза и метаболизма. Для этого необходимо их надежное количественное определение в различных биологических матрицах. Поскольку оксипиновы и родственные соединения присутствуют в очень низких концентрациях в биофлюидах, тканях и клеточных системах, их измерение подразумевает использование высокочувствительных и специфических аналитических методов (как правило, их содержание в биологических системах при физиологически значимых концентрациях выявляется на уровне нано- и пикомолей). Однозначная идентификация и надежное количественное определение оксипинов могут быть осуществлены при использовании аналитических подходов, сочетающих уникальную селективность и специфичность с высокой чувствительностью. Многим из широко используемых в практике аналитических методов часто не хватает специфичности для решения этой задачи, что позволяет в лучшем случае проводить полуколичественный анализ отдельных оксипинов в биологических образцах [99]. Часто для этих целей используются радиоиммунологический и иммуноферментный (ИФА) анализ [100–105]. Ограничением подхода является возможность измерения лишь одного метаболита за анализ. Иммунологические методы не всегда обладают необходимой для решения задачи селективностью, антитела могут подвергаться перекрестным реакциям, а стандартные образцы доступны в настоящее время только для определенных оксипинов [106,107].

Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) или тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) успешно применяется в анализе оксилипинов [88,94,108–113]. ГХ-МС и ГХ-МС/МС требуют проведения процедур дериватизации для повышения летучести и термической стабильности анализируемых соединений. Термолабильные соединения, такие как ЕЕТ, не могут быть определены с необходимой чувствительностью методом ГХ-МС или ГХ-МС/МС, а содержащие в составе остатки аминокислот эйкозаноиды, такие как цистеиниллейкотриены, не могут быть проанализированы в принципе из-за отсутствия возможности дериватизации [114]. ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием также требует проведения дериватизации [115]. ВЭЖХ с УФ-детектированием не обладает достаточной чувствительностью, поэтому метод применим только к ограниченному количеству поглощающих УФ-излучение соединений. Капиллярный электрофорез позволяет измерять ЕЕТ/DHET после дериватизации [116,117].

Описанные подходы к количественному определению оксилипинов, как правило, фокусируются на небольшом количестве молекул, таких как простагландины [118,119], лейкотриены [120] или HETE [46,121]. Однако, все чаще используются подходы, в которых большое число липидных медиаторов определяется количественно одновременно [122–128]. В настоящее время ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) рассматривается в качестве эталонного метода для проведения высокопроизводительного скрининга наследственных метаболических нарушений, а также для измерения экзогенных и эндогенных веществ, включая определенные гормоны, требующие высокой точности, специфичности и чувствительности анализа [129]. Также ВЭЖХ-МС/МС является универсальной аналитической платформой для анализа большого числа липидных медиаторов благодаря более высокой чувствительности и специфичности [130–133]. Наиболее перспективный аналитический подход заключается в единовременном профилировании всех групп оксилипинов. Одновременный анализ нескольких метаболомных путей важен для получения

целостного представления о роли продуктов окисления ПНЖК в физиологических процессах или при различных заболеваниях. Уникальной особенностью метода масс-спектрометрии является возможность использования меченных стабильными изотопами оксипиринов в качестве внутренних стандартов [14,15]. Аналиты, меченные достаточным количеством атомов дейтерия ^2H или изотопа углерода-13 ^{13}C , имеют практически идентичные физико-химические свойства со своими немечеными аналогами и обеспечивают высокую правильность и прецизионность количественного анализа [16,17,134]. Это имеет особое значение из-за необходимости учета матричных и ионизационных эффектов при анализе сложных биологических матриц. С ростом спроса на изотопно-меченные стандартные образцы эйкозаноидов в последние годы увеличилось число их поставщиков. Количество коммерчески доступных стандартных образцов постоянно растет, причем число оксипиринов, меченных дейтерием, намного выше, чем аналогов, меченных ^{13}C , не в последнюю очередь, за счет существенно большей стоимости последних. Меченные дейтерием стандарты представляют потенциальный риск для использования в количественном анализе из-за возможного обмена водорода на дейтерий, причем олефиновые атомы дейтерия легче поддаются обмену, чем алифатические атомы дейтерия. Использование изотопно-меченных соединений в качестве внутренних стандартов обеспечивает высокую специфичность и точность количественного определения оксипиринов в сложных матрицах. Тем не менее, при смене исследуемых объектов, например, с плазмы крови на слезную жидкость, требуется проведение тщательной проверки метода с точки зрения оценки селективности, чувствительности, точности и воспроизводимости, а также возникающих матричных эффектов, т.е. проведение валидации методики [14–17,134].

Таблица 2. Аналитические стратегии анализа профиля оксипинов в биообъектах различного генезиса

№ №	Образец	Тип ТФЭ	Пробоподготовка	Кондиционирование ТФЭ	Промывка ТФЭ	Элюирование целевых аналитов	Метод анализа	Ссылка
1	Сыворотка крови крысы (400 мкл)	Bakerbond C18 (3 мл, 500 мг)	+ 0,5 мл MeOH + 4 мл MeOH	10 мл MeOH 10 мл H ₂ O	2 мл H ₂ O 2 мл 10% MeOH	3×0,5 мл MeOH	ВЭЖХ-МС	[135]
2	Опухоль молочной железы крысы (~200 мг)		гомогенизация с 2 мл H ₂ O, 4°C, 30 мин, центрифугирование 3000 об/мин, 5 мин					
3	Плазма крови человека (900 мкл)	Oasis HLB (60 мг)	+ 1,0 мл MeOH центрифугирование 12000 об/мин, 5 мин + 6,0 мл 0,1% муравьиной кислоты	5 мл MeOH 5 мл H ₂ O	2 мл 15% MeOH в 0,1% p-ре муравьиной кислоты	0,5 мл MeOH 0,5 мл AcCN	ВЭЖХ-МС	[25], [58]
4	Плазма крови человека (300 мкл)	Sep-Pak C18 (2,8 мл, 500 мг)	+ 1,5 мл MeOH/AcCN (1/1, v/v) 4 °C, центрифугирование 400×g, 20 мин, разбавление H ₂ O до 10% MeOH/AcCN	2 мл MeOH 2 мл 0,1% муравьиной кислоты	+ 2 мл 0,1% муравьиной кислоты	2 мл 0,1% муравьиной кислоты в MeOH	ВЭЖХ-МС	[136]
				10 мл EtOH 20 мл H ₂ O	+ 0.1 М HCl 10 мл H ₂ O 1 мл 35% EtOH	2 мл EtOH		
				10 мл MeOH 10 мл H ₂ O	+ 0.1 М HCl 5 мл 15% MeOH 5 мл H ₂ O 2.5 мл n-гексан	2 мл n-гексан		
5	Плазма крови человека (500 мкл)	Bond Elut Certify II (3 мл, 200 мг)	+ 10 мкл 0,2 мг/мл ВНТ, ЭДТА, 100 мкМ индометацин, 100 мкМ раствора эпоксид гидролазы в 50% MeOH + 1,4 мл холодного MeOH, -80 °C, 30 мин, 4 °C, центрифугирование	1×1% муравьиной кислоты в смеси ЭА/n-гексан (75/25, v/v) 1×MeOH 1 × 0.1 М буферного раствора гидрофосфата натрия (рН 6)	3 мл H ₂ O 3 мл 50% MeOH, упаривание в токе азота, 1 мин	2 мл 1% муравьиной кислоты в смеси ЭА/n-гексан (75/25, v/v)	ВЭЖХ-МС	[137]

			20,000×g, упаривание в токе азота, 10 мин					
6	Слезная и внутриглазная жидкости кролика и человека (15 мкл)	Oasis HLB (60 мг)	+ 1,0 мл 95% p-p MeOH центрифугирование 12000 об/мин, 3 мин + 6,0 мл 0,1% муравьиной кислоты	5 мл MeOH 5 мл H ₂ O	2 мл 15% MeOH в 0,1% p-ре муравьиной кислоты	0,5 мл MeOH 0,5 мл AcCN	ВЭЖХ-МС	[138], [139]
7	Плазма крови человека (200 мкл)	Oasis HLB 96-well plates (30 мг)		1 мл MeOH 1 мл H ₂ O	1,5 мл 5% MeOH	1,2 мл MeOH	ВЭЖХ-МС	[140]
8	Плазма крови человека (200 мкл)	Strata-X (6 мл, 200 мг, 33 мкм)	+ 0.5 мл холодный MeOH с добавкой 20 мг/мл ВНТ/ЭДТА, -80 °С, 30 мин центрифугирование 14000 об/мин, 4 °С, 10 мин	6 мл MeOH 6 мл H ₂ O	6 мл 10% MeOH высушить на воздухе, 2 мин	6 мл MeOH с добавкой 0,0004% w/v БГТ	ВЭЖХ-МС	[84]
9		Sep-Pak C18 (6 мл, 500 мг)	+ 0,45 мл MeOH, 10 мин вортекс, 0,5 мл супернатанта + 4,5 мл HCl in H ₂ O (pH 3,5)	12 мл MeOH 12 мл H ₂ O	12 мл H ₂ O 6 мл n-гексан	9 мл метил формиата		
10	Гомогенизат легких мыши (50 мкл)	MonoSpin™ C18	+ 0.45 мл MeOH, 10 мин вортекс центрифугирование 9000×g, 4 °С, 5 мин упаривание в токе азота, 40 °С, растворение в 0,1 мл MeOH + 0,9 мл HCl в H ₂ O (pH 3,5)	0,3 мл MeOH 0,3 мл H ₂ O	центрифугирование 9000×g, 4 °С, 1 мин, 0,3 мл H ₂ O 0,3 мл n-гексан центрифугирование 9000×g, 4 °С, 1 мин	2×0,3 мл метил формиата	ВЭЖХ-МС	[141]
11	Грудное молоко человека (1,5-2,0 мл)	Oasis HLB (60 мг, 30 мкм)	центрифугирование + 10 мкл 0,2 мг/мл БГТ/ЭДТА	4 мл ЭА 8 мл MeOH 8 мл 5% MeOH с добавкой 0.1% муравьиной кислоты	8 мл 5% MeOH с добавкой 0.1% муравьиной кислоты	2 мл MeOH 3 мл AcCN 2 мл ЭА	ВЭЖХ-МС	[142]
12	Моча человека	Strata-X-AW (3 мл, 100 мг)	+ 200 мМ MeOH/HCl центрифугирование 10000 об/мин, 5 мин	2 мл MeOH 2 мл H ₂ O	4 мл H ₂ O	1 мл MeOH	ВЭЖХ-МС	[143]

Калибровочные кривые стандартов эйкозаноидов показывают отличную линейность в диапазоне концентраций 0,1–1000 пг/мкл с коэффициентами корреляции, близкими к единице. Учитывая, что концентрация эйкозаноидов в культурах клеток и биофлюидах может достигать 0,1–1 мкМ (30–300 пг/мкл), рекомендуется строить калибровочные кривые для каждого соединения с диапазоном концентраций, связанным с их ожидаемой концентрацией в исследуемых образцах. Предел обнаружения (ПО) и нижний предел количественного определения (нПКО) также должны быть определены для каждого аналита в используемых экспериментальных условиях ВЭЖХ-МС/МС в рамках валидации метода. Для многих оксипинов, за исключением ЕЕТ, которые имеют более высокие значения ПО и нПКО, эти значения представлены в диапазоне 0,01–1,0 нг/мл и 0,1–3,0 нг/мл соответственно [95,96].

При упоминании о тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) обычно имеются в виду ВЭЖХ-системы, связанные с тройным квадрупольным (QQQ) масс-детектором или ионной ловушкой (IT), с использованием электрораспылительной ионизации (ESI) или химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) [144,145]. Масс-спектрометры типа QQQ позволяют в настоящее время осуществлять наиболее чувствительный количественный анализ целевых оксипинов методом ВЭЖХ-МС/МС. Молекулы, имеющие в структуре свободную карбоксильную группу, легко детектируются в режиме регистрации отрицательных ионов по депротонированному молекулярному иону $[M-H]^-$. Принципы масс-спектрального анализа, схемы фрагментации различных классов оксипинов рассмотрены в обзоре [146]. Мониторинг множественных реакций (MRM) родительских и дочерних ионов обычно применяется для достижения максимальной чувствительности при количественном анализе с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Обычно один MRM переход используется для количественного анализа, дополнительные MRM переходы обеспечивают

повышение специфичности определения аналита и точность его количественного определения.

Как правило, оксипирины разделяются хроматографически по степени полярности на колонках C8 или C18. Объем анализируемой пробы может варьироваться в широких пределах, используются подвижные фазы на основе подкисленного метанола или ацетонитрила. Для оксипиринов рН подвижной фазы может оказывать существенное влияние на удержание соединений, разрешение и селективность, что в итоге может ухудшить или улучшить чувствительность определения [147,148]. Гидрофильные метаболиты, такие как PG и LT, элюируются в процессе анализа первыми и в малой степени зависят от рН подвижной фазы. Для элюирования наиболее гидрофобных соединений, таких как HETE или EET, требуется более высокое значение рН подвижной фазы и более высокое содержание фракции органического компонента в подвижной фазе. Для решения подавляющего большинства задач необходимо удовлетворительное разделение нескольких критических пар метаболитов для их точной идентификации и количественного определения в биологических образцах, (например, PGE₂ и PGD₂, являющиеся изомерными и изобарными химическими структурами). Общее время анализа методом ВЭЖХ-МС/МС в основном зависит от количества групп/классов оксипиринов и индивидуальных соединений, которые должны быть разделены, и может составлять в среднем около 10-30 минут.

При всех преимуществах подхода с использованием ВЭЖХ-МС/МС определяющим моментом в его использовании является более высокая по сравнению с остальными аналитическими методами стоимость анализа. Она включает в себя стоимость процедуры пробоподготовки, дейтерированных стандартов определяемых соединений и других используемых расходных материалов, себестоимость времени работы прибора и оператора, а также экспертную оценку полученных результатов.

Многие оксипирины имеют по два энантиомера, которые могут различаться по своей биологической активности. Например, 5(R)-HETE и 5(S)-

НЕТЕ, как было показано, отличаются по своей активности: 5(R)-НЕТЕ является более сильным хемотоксическим агентом, чем 5(S)-НЕТЕ [149]. С другой стороны, 13(R)-НОДЕ и 13(S)-НОДЕ обладают диаметрально противоположными биологическими активностями: 13(S)-НОДЕ является антипролиферативным/апоптотическим соединением, тогда как 13(R)-НОДЕ – митогенным [150]. По этой причине для отдельного определения таких пар метаболитов требуется использование хиральных хроматографических колонок. Для лучшего понимания роли оксипинов в появлении и развитии процессов воспаления может потребоваться отдельное определение их энантиомеров с помощью хиральной хроматографии [151–154].

Рассмотренные работы показывают возможность использования качественного и количественного спектра оксипинов – медиаторов липидного обмена – в качестве оценочной тест-системы различных лекарственных средств для регуляции воспалительного процесса, а также в исследованиях различных социально-значимых заболеваний, ассоциированных с воспалительным процессом. Из Рисунок 3 видно, что для реализации оптимального протокола анализа образцов различного генезиса в исследуемые образцы необходимо добавить смесь оксипинов различных классов, меченных стабильными изотопами, т.е. дейтерированных соединений. Образцы затем необходимо подкислять до pH 3,0, чтобы обеспечить полное протонирование карбоксильных групп оксипинов и максимальное извлечение аналитов после проведения процедур осаждения белка и ТФЭ. Эндогенные аналиты и соответствующие дейтеростандарты, присутствующие в полученном экстракте, разделяются с помощью УВЭЖХ, а затем детектируются с помощью МС/МС в режиме регистрации MRM-переходов. При этом необходимо выдерживать минимально необходимое время для отбора проб клеточных культур и биофлюидов, а также обеспечивать проведение всех возможных процедур, связанных с хранением проб и/или готовых к анализу экстрактов, при температуре не менее -80°C.

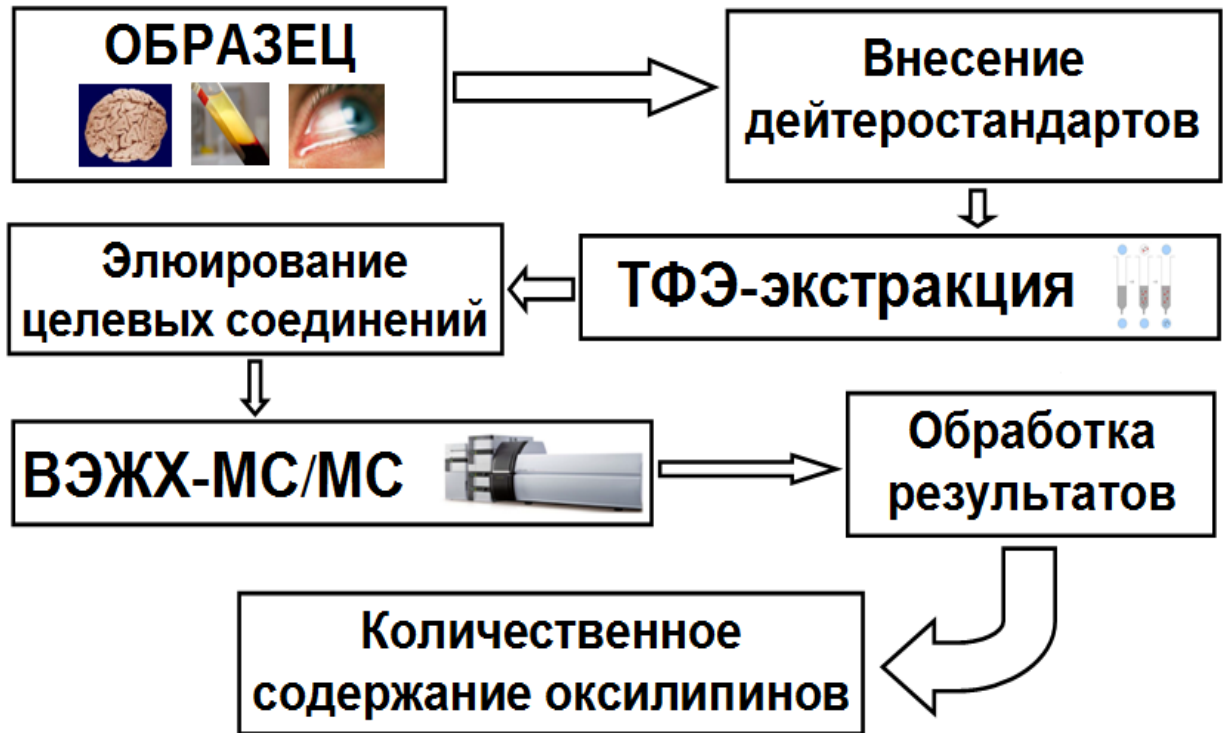


Рисунок 3. Основные этапы оптимального протокола анализа образцов различного генезиса на содержание оксипинов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Оборудование

1. Ультравысокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera X2 (Shimadzu Corp., Япония), включающий в себя градиентный насос, дегазатор, автосэмплер, диодноматричный детектор и тройной квадрупольный масс-спектрометрический детектор Shimadzu 8040 (Shimadzu Corp., Япония);
2. Хроматографическая колонка Phenomenex C8 (2,1 мм×150 мм×2,6 мкм) (Phenomenex, США);
3. Центрифуга с охлаждением Minispin Plus (Eppendorf, Германия);
4. Шейкер Vortex 2 (ИКА, США);
5. Орбитальный шейкер Biosan OS 20 (Biosan Ltd., Латвия);
6. Морозильник низкотемпературный (-80°C) для хранения образцов TSX60086A (Thermo Scientific, США);
7. Весы ATL-220d4-I (Acculab, США);
8. Механические пипет-дозаторы переменного объема Finnpiquette F1 на 20-200 и 100-1000 мкл (Thermo Scientific, США);
9. Ультразвуковая водяная баня УЗВ-9,5 (Сапфир, Россия);
10. Картриджи для ТФЭ-экстракции Oasis HLB (Waters Corp., США);
11. Манифолд 20-портовый для проведения ТФЭ-экстракции Agilent 12234104 (Agilent Technologies, США);
12. CO₂-инкубатор Heraeus BBD 6220 (Thermo Scientific, США)

2.2 Реактивы

Дейтерированные стандарты:

Tetranor-PGEM-d₆ (CAS № 1240398-16-6, кат. № 314840, Cayman Chemical, США); 6-keto-PGF_{1α}-d₄ (CAS № 82414-64-0, кат. № 315210, Cayman Chemical, США); TXB₂-d₄ (CAS № 1346112-79-5, кат. № 319030, Cayman Chemical, США); PGF_{2α}-d₄ (CAS № 34210-11-2, кат. № 316010, Cayman Chemical, США); PGE₂-d₄ (CAS № 34210-10-1, кат. № 314010, Cayman Chemical, США); PGD₂-d₄ (CAS № 211105-29-2, кат. № 312010, Cayman Chemical, США); LTC₄-d₅ (CAS № 1441421-73-3, кат. № 10006198, Cayman Chemical, США); LTB₄-d₄ (CAS № 124629-74-9, кат. № 320110, Cayman Chemical, США); 5-HETE-d₈ (CAS № 330796-62-8, кат. № 334230, Cayman Chemical, США); 12-HETE-d₈ (CAS № 2525175-25-9, кат. № 31745, Cayman Chemical, США); 15-HETE-d₈ (CAS № 84807-87-4, кат. № 334720, Cayman Chemical, США); OEA-d₄ (CAS № 946524-36-3, кат. № 9000552, Cayman Chemical, США); EPA-d₅ (CAS № 1197205-73-4, кат. № 10005056, Cayman Chemical, США); DHA-d₅ (CAS № 1197205-71-2, кат. № 10005057, Cayman Chemical, США); AA-d₈ (CAS № 69254-37-1, кат. № 390010, Cayman Chemical, США); PGA₂-d₄ (CAS № 201608-18-6, кат. № 310210, Cayman Chemical, США); 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂-d₄ (CAS № 1542166-82-4, кат. № 318570, Cayman Chemical, США); Resolvin D₁-d₅ (CAS № 1881277-32-2, кат. № 11182, Cayman Chemical, США);

Ацетонитрил (для HPLC/MS, LiChrosolv[®], CAS № 75-05-8, кат. № 1.00029, Merck, Германия); Метанол (для HPLC/MS, LiChrosolv[®], CAS № 67-56-1, кат. № 1.06035, Merck, Германия); ДМСО (CAS № 67-68-5, кат. № D8418, Sigma-Aldrich, США); Муравьиная кислота (х.ч., CAS № 64-18-6, кат. № 1.00263, Sigma-Aldrich, США); Этанол абсолютизированный (CAS № 64-17-5, кат. № 459844, Sigma-Aldrich, США); Глицерин (ч.д.а., CAS № 56-81-5, Химмед, Россия); Бутилгидрокситолуол (CAS № 128-37-0, кат. № 47168, Sigma-Aldrich, США); Лимонная кислота (ч.д.а., CAS № 77-92-9, кат. № AC07201000 Химмед, Россия); Деионизированная вода (Milli-Q, Millipore, США); Твин-20 (CAS № 9005-64-

5, кат. № 500-018-3, MP Biomedicals, США); Трис-основание (2-амино-2-(гидрокси метил)-1,3-пропандиол) (CAS № 77-86-1, кат. № TRIS-RO, Sigma-Aldrich, США); 13(S)-HPODE (CAS № 33964-75-9, кат. № 48610, Cayman Chemical, США); Фосфатидилхолин (CAS б/н, кат. № 459844, Sigma-Aldrich, США); Гидроксид натрия (ч.д.а., CAS № 1310-73-2, кат. № SIS8045, Химмед, Россия); Аденозинтрифосфат (CAS № 56-65-5, кат. № AC07201000, Fermentas, Lithuania); Человеческий рекомбинантный белок 5-LOX (Biomole, Германия); Человеческий рекомбинантный белок 15-LOX-2 (Biomole, Германия); LPS (CAS № б/н, кат. № L2630, Sigma-Aldrich, США); GW6471 (CAS № 880635-03-0, кат. № 11697, Cayman Chemical, США); GW9662 (CAS № 22978-25-2, кат. № 70785, Cayman Chemical, США); GSK0660 (CAS № 1014691-61-2, кат. № 15272, Cayman Chemical, США); GW501516 (CAS № 317318-70-0, кат. № 10004272, Cayman Chemical, США); Фенофибрат (CAS № 49562-28-9, кат. № 10005368, Cayman Chemical, США); Розиглитазон (CAS № 122320-73-4, кат. № R2408, Sigma-Aldrich, США); Стрептомицин-пенициллин (CAS № б/н, кат. № A063, PanEco, Россия); Трипсин (CAS № б/н, кат. № P037, PanEco, Россия); ЭДТА динатриевая соль дигидрат (CAS № 6381-92-6, кат. № Эл075, PanEco, Россия); FBS (CAS № б/н, кат. № BS-110/500, PanEco, Россия); DMEM (CAS № б/н, кат. № 21885-025, Gibco, США); PBS (CAS № б/н, кат. № AM9624, Thermo Scientific, США); Тролокс (CAS 53188-07-1, кат. № 238813, Sigma-Aldrich, США); Зилеутон (CAS 111406-87-2, кат. № PHR2555, Sigma-Aldrich, США); SkQ1 (НИИ Митоинженерии, Россия); Капли глазные Алкаин 0,5% (Alcone, США); инъекционный анестетик Телазол (тилетамиин + золазепам (Virbac, Франция)); Раствор для инъекций КСИЛАНИТ® (ксилазин Нита-Фарм, Россия); Капли глазные Лидокаин 2% (Московский эндокринный завод, Россия); Капли глазные Проксиметакаин 0,5% (Alcon-Couvreur, Бельгия); Капли глазные Непафенак (Alcone, США); Слезные полоски для теста Ширмера (Haag-Streit, Швейцария).

2.3 Проведение экспериментов «*in vitro*» и «*in vivo*»

2.3.1 Первичная культура клеток астроцитов и нейронов

Первичные культуры астроцитов были получены от новорожденных крысят линии Вистар, обоих полов. Процедура выделения первичных культур реализовывалась следующим образом: мозг после декапитации промывали в ледяном буферном растворе Puck's (в мМ: 137,0 NaCl, 5,4 KCl, 0,2 K₂HPO₄, 0,17 Na₂HPO₄, 5,0 глюкоза, 58,4 сахароза, рН 7,4) очищали его от сосудистых оболочек и измельчали посредством последовательного перетирания сквозь сита с размером ячейки 250 и 136 мкм, промывали в буфере Puck's осаждали посредством центрифугирования при 1000 об/мин, рассаживали в культуральные флаконы площадью 75 см² с плотностью 6×10^5 клеток/мл и культивировали в модифицированной среде Eagle от Dulbecco (DMEM), содержащей глюкозу (1,0 г/литр), 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), стрептомицин (50 ед/мл) и пенициллин (50 мкг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Спустя 5 суток после выделения культуры отряхивали для удаления микроглии на орбитальном шейкере (180 об/мин в течение 90 мин) и меняли среду на свежую среду того же состава. Далее клетки культивировали в течение еще пяти суток со сменой среды каждые двое суток. После получения монослоя культуры клетки трипсинизировали и рассаживали на шестилуночные культуральные планшеты в количестве 750 тыс. клеток на лунку, эксперимент проводили спустя 2 дня [155]. За 2 часа до начала экспериментов с инкубацией клеткам производили замену среды на свежую. В полученных клеточных культурах более 95% клеток были положительны на маркер астроцитов – глиальный фибриллярный кислый белок, и только менее 2% были положительны на маркер, специфичный для микроглии.

Для получения культур нейронов полушария головного мозга выделяли из 18-дневных эмбрионов крыс Вистар, промывали в сбалансированном солевом растворе Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} , очищали от кровеносных сосудов, препарировали в растворе трипсина ЭДТА, затем инкубировали в растворе трипсина ЭДТА в течение 20 мин при 37 °С. После этого трипсин инактивировали 10% FBS в растворе Хенкса. Препарат дважды промывали раствором Хенкса и суспендировали в минимальной основной среде (MEM) с 10% FBS и 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина. Полученную суспензию центрифугировали в течение 2 мин при 400 g. Затем клетки ресуспендировали в MEM, содержащей вышеуказанные добавки, и рассеивали в 6- и 96-луночные планшеты, предварительно обработанные поли-орнитином с плотностью $1,2 \times 10^5$ клеток/см². Пластины предварительно обрабатывали раствором 0,1 мг/мл поли-орнитина в течение нескольких часов, затем промывали один раз стерильной водой. Культуры выдерживали в инкубаторе при 37 °С, 90% влажности, 5% CO_2 в течение 24 ч, затем среду заменяли на нейробазальную (NBM) с 2% B-27 добавкой без сыворотки, 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина и 1% ГлутаМАХ. После этого культуры выдерживали в инкубаторе в течение 10–12 дней. Половину объема среды обновляли каждые 3 дня [156]. Исследования проводились в соответствии с институциональным руководством по использованию животных и одобрены комиссией по биоэтике НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

2.3.2 Определение ферментативной активности белка 5-LOX

Изотопологи АА (7,7-(D₂)-АА, 10,10-(D₂)-АА, 13,13-(D₂)-АА, 7,7,10,10-(D₄)-АА, 7,7,13,13-(D₄)-АА, 10,10,13,13-(D₂)-АА, and 7,7,10,10,13,13-(D₆)-АА) были синтезированы в виде этиловых эфиров для повышения стабильности при хранении, непосредственно перед экспериментами их гидролизировали до свободных жирных кислот (3 мг/мл) действием 0,5 М раствора КОН в метаноле в течение 2 часов при 70 °С. Затем реакционную смесь разбавляли бидистиллированной водой и нейтрализовали с помощью 160 мМ раствора H₂SO₄. Проводили экстракцию троекратным добавлением гексана, органический слой отделяли, сушили досуха под током аргона, перерастворяли 1 мл этанола и хранили при -80 °С.

Активность человеческого рекомбинантного фермента 5-LOX (5-липооксигеназа) (Biomole, Гамбург, Германия) измеряли методом ВЭЖХ-МС/МС. Для каждой пробы 5-LOX субстрат (АА, 7,7-(D₂)-АА, 10,10-(D₂)-АА, 13,13-(D₂)-АА, 7,7,10,10-(D₄)-АА, 7,7,13,13-(D₄)-АА, 10,10,13,13-(D₂)-АА, and 7,7,10,10,13,13-(D₆)-АА; в концентрациях 5-40 мкМ) добавляли к ферменту (5-LOX; 6.7 U) в 110 мкл Трис-буфера (50 мМ, рН 7,5, 25 °С, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ АТФ, 25 мкг/мл фосфатидилхолина). Активатор, 13(S)-HPODE, добавляли в буфер до конечной концентрации 2,5 мкМ. Субстрат (изотопологи АА) и активатор предварительно смешивали в буферном. Реакцию прекращали через 2 мин добавлением 100 мкл MeOH к общей реакционной смеси. Окисленные производные арахидоновой кислоты выделяли из реакционных образцов методом ТФЭ. Для ТФЭ картридж Oasis® HLB (60 мг, 3 куб. см) промывали 1 мл метанола и 1 мл 0,1% муравьиной кислоты. Образцы загружались на колонку и промывались 1 мл 0,1%-ной муравьиной кислоты и 1 мл 15% этанола, затем картриджи элюировали 300 мкл метанола.

2.3.3 Животная модель синдрома сухого глаза

В исследовании приняли участие 102 здоровых новозеландских белых кролика (возраст 6 месяцев, вес 2,3-3,0 кг), приобретенных в сертифицированном хозяйстве (Кролинфо, Россия). Кролики содержались в индивидуальных клетках (795×745×1776 мм³) в нормальных условиях (12 ч свет/12 ч темнота, 22-25 °С, влажность 55-60 %) со свободным доступом к корму и воде. Ежедневный мониторинг состояния здоровья всех животных включал в себя офтальмологический осмотр, осмотр габитуса, дермы и слизистых оболочек, а также мониторинг частоты сердечных/дыхательных сокращений и температуры тела. В ходе исследования не было отмечено никаких побочных явлений. Гуманная эвтаназия животных, предназначенных для гистологического анализа переднего отрезка глаза, проводилась путем передозировки анестетика. Глазные яблоки животных энуклеировали посмертно. В противном случае животных реабилитировали в течение трех дней и возвращали на ферму. С животными обращались в соответствии с 8-м изданием "Руководства по уходу и использованию лабораторных животных" Национального исследовательского совета и "Положением об использовании животных в офтальмологических и зрительных исследованиях" Ассоциации по исследованиям в области зрения и офтальмологии (ARVO) [157]. Исследование было одобрено Комитетом по уходу и использованию животных Белозерского института физико-химической биологии (протокол № 1/2016, 12 января 2016 г.).

2.3.4 Животная модель повреждения сетчатки под действием света

Животные были разделены на шесть групп, включая абсолютный контроль (7 животных), модель (12 животных) и четыре экспериментальные группы (группы 1-4, по 16 животных в каждой). В группу абсолютного контроля вошли интактные животные, содержащиеся в течение эксперимента

в обычных условиях, описанных выше. Животные модельной и экспериментальной групп подвергались воздействию яркого видимого света (30000 лк, 3 ч, 0,15 Вт/см²) под общей анестезией. За восемь часов до освещения все животные (включая группу абсолютного контроля) содержались на диете с единственным свободным доступом к воде. Сразу после освещения или через 1, 3 или 7 дней после воздействия (в эти сроки животные содержались в обычных условиях, описанных выше) животные модельной группы подвергались клиническому и электроретинографическому обследованию (проводили до освещения и на седьмые сутки), а затем жертвовались для гистологического анализа. Животных опытных групп оставляли без лечения (группа 1), премедикацию препаратом SkQ₁ проводили до освещения (группа 2), лечение непафенаком в течение семи дней после освещения (группа 3), премедикацию препаратом SkQ₁ и лечение непафенаком в течение семи дней после освещения (группа 4). Премедикация препаратом SkQ₁ включала шесть последующих конъюнктивальных инстилляций (одна инстиляция в 10 мин) по 50 мкл 7,5 мкМ SkQ₁ в каждый глаз. Лечение непафенаком включало конъюнктивальные инстиллянии 50 мкл непафенака в каждый глаз три раза в день. Сразу после освещения или через 1, 3 или 7 дней после воздействия животным экспериментальных групп проводили клинический осмотр, а также процедуру сбора ВГЖ, как описано ниже. Три животных из каждой экспериментальной группы подвергались эвтаназии, а задние сегменты их глаз подвергались гистологическому анализу. С животными обращались в соответствии с 8-м изданием "Руководства по уходу и использованию лабораторных животных" Национального исследовательского совета и "Положением об использовании животных в офтальмологических и зрительных исследованиях" Ассоциации по исследованиям в области зрения и офтальмологии (ARVO) [158]. Исследование было одобрено Комитетом по уходу и использованию животных Белозерского института физико-химической биологии (протокол № 1/2016, 12 января 2016 г.).

2.3.5 Отбор образцов плазмы человека

В обсервационном исследовании пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВ) участвовало 55 человек: 39 пациентов с БВ и 16 здоровых людей из контрольной группы (КГ). Для исследования было привлечено 39 человек с БВ, поступивших на постоянное стационарное лечение в ФГБУН «НЦ Неврологии» (Москва, Россия). Критериями включения больных БВ были следующие клиничко-лабораторные признаки заболевания: дебют заболевания в детском, подростковом или взрослом возрасте (чаще до 35 лет); сочетанное поражение головного мозга и внутренних органов (цирроз печени, гепатолиенальный синдром, портальная гипертензия, тубулярный нефрит и др.); поражение центральной нервной системы в виде экстрапирамидного синдрома; и системный дискуприноз с нарушением метаболизма меди. Критериями исключения БВ были: манифестация заболевания после 35 лет; аутосомно-доминантный тип наследования; наличие анамнестических, клинических или параклинических признаков другого заболевания, способного вызывать сходные симптомы; галлюцинации, не связанные с приемом лекарств; наличие деменции или признаков нарушения корковой функции (афазия, апраксия и др.); замедление вертикальных саккад или паралич вертикального взора; положительный анамнез воспалительных заболеваний; хронические заболевания и нарушения обмена веществ; лечение НПВП или кортикостероидами в течение последнего месяца; беременность или кормление грудью во время исследовательского визита. В исследование были включены 16 здоровых лиц, не страдающих нейродегенеративными заболеваниями, подтвержденными клиническим обследованием. Их завербовали среди людей, проходящих периодические медицинские осмотры в том же центре. Критерии исключения для здоровых людей из КГ были такими же, как и для пациентов с БВ. Все заборы образцов крови проводились утром в состоянии голодания. Плазму получали сразу после забора крови,

аликвотировали и хранили при -80°C для дальнейшего анализа. Этический комитет ФГБУН «НЦ неврологии» одобрил данное исследование (протокол №4-4/19 от 15.05.19 г.), от каждого пациента получено информированное письменное согласие и контроль согласно методическим рекомендациям, утвержденным в соответствии с данным протоколом (ст. 20 Федерального закона, «Право граждан Российской Федерации на охрану здоровья» №323-ФЗ, 21.11.2011) [25].

2.3.6 Сбор внутриглазной и слезной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и контрольных пациентов

Образцы ВГЖ и СЖ были получены от 38 пациентов, проходивших хирургическое лечение в Национальном медицинском исследовательском центре глазных болезней имени Гельмгольца (Москва, Россия). Из них 14 человек были КГ, которым проводилась операция по удалению катаракты методом факоэмульсификации, а 24 – сопоставимые по возрасту пациенты с клинически установленным диагнозом ПОУГ, которым была выполнена непроникающая глубокая склерэктомия. Диагноз ПОУГ ставился опытным офтальмологом на основании комплексного обследования состояния зрительного нерва (купирование, истончение нейроретинального ободка, образование зазубрин и кровоизлияний в диск), включавшего визометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию и другие стандартные методы анализа.

Забор ВГЖ производился хирургом во время факоэмульсификации или непроникающей глубокой склерэктомии под перibuльбарной (2% лидокаин) и местной (проксиметакаин 0,5% глазные капли) анестезией. Вкратце, парацентезный разрез через роговицу делали с помощью одноразового ножа длиной 1,2 мм и 50 мкл ВГЖ аспирировали с помощью шприца, смешивали с 0,05% БГТ (50:1, v/v), аликвотировали и хранили при -80°C .

СЖ собирали у пациентов в день операции с помощью отмеренных полосок бумаги для теста Ширмера без анестезии или стимуляции слезы. У всех испытуемых процедура проводилась в одинаковых условиях, а именно через 30 минут после пробуждения, в состоянии голодания, одним и тем же медицинским персоналом, при одинаковых условиях окружающей среды. Полоске давали увлажниться на 10 мм под нижним веком, влажный фрагмент отрезали, помещали в 1 мл водно-метанольного раствора (95%, v/v), содержащего 0,1% БГТ, и хранили при -80°C [139].

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и было одобрено местным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней имени Гельмгольца (код протокола №49/1, 7 февраля 2019 года и №50/2, 24 ноября 2020 года) [139].

2.4 Пробоподготовка образцов

Оптимизированный протокол пробоподготовки, выбранный по результатам апробации нескольких подходов, выглядит следующим образом для клеточных культур и плазмы крови: после отбора образца к нему добавляется 10 мкл 10% раствора БГТ в этаноле и 40 мкл 1М лимонной кислоты для предотвращения протекания дальнейших химических реакций в пробе. В случае невозможности проведения пробоподготовки непосредственно после отбора пробы образец помещали в низкотемпературный морозильник (-80°C). Перед анализом к аликвоте образца добавляли смесь дейтерированных соединений, пробы перемешивали с помощью шейкера 30 сек, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Затем отбирали аликвоту супернатанта, добавляли 3 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, затем картридж промывали 2 мл смеси метанол – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (1:4) и сушили 30 мин при включенном компрессоре манифолда. Оксипирины элюировали с картриджа 1 мл метанола в пробирку типа эппендорф, содержащую предварительно добавленные 30 мкл глицерина, затем пробу упаривали в токе азота без нагревания до 100 мкл, встряхивали в течение 1 мин, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин и переносили пробу в хроматографическую виалу для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.5 Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования оксипиринов

Анализ образцов клеточных культур и биофлюидов на качественное и количественное содержание оксипиринов проводили с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040, оборудованного в качестве системы разделения УВЭЖХ Nexera X2. Использовали хроматографическую колонку Phenomenex C8 (2,1×150 мм×2,6 мкм). Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Температура автосэмплера и термостата колонки были 5 °С и 40 °С, соответственно. Объем закола - 20 мкл. В качестве подвижных фаз использовали 0,1% р-р 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 [144,159].

Использование готового продукта – программного метода управления ВЭЖХ-МС/МС системой, а также сбора и обработки данных (Shimadzu lipid mediator method package Ver. 2) значительно упростило задачу и позволило пропустить необходимый в разработке аналитических методик обязательный шаг установления оптимальных хроматографических и масс-спектрометрических характеристик большей части определяемых соединений, обеспечив их приемлемое разделение и высокую чувствительность определения в сложных биологических матрицах. Настройки программного продукта корректировали под использование в количественных расчетах для дейтерированных стандартных образцов оксипинолов. Настройки программного продукта в отдельных экспериментах «*in vitro*» корректировали под детектирование оксипинолов, образующихся при использовании в качестве субстратов дейтерированных ПНЖК с разной степенью изомерспецифичного дейтерозамещения [144,159].

2.6 Статистическая обработка

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS v.23.0.0.0. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Нормальность наборов данных оценивалась с помощью теста Шапиро-Уилка. Сравнение относительных концентраций проводили с помощью двухвыборочного двустороннего t-теста, ANOVA с последующей поправкой Холма-Бонферрони для множественных сравнений, $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Данные метаболомики анализировали с помощью пакета *mixOmics R* версии 6.1.1. Разделение классов анализировали с

помощью частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA). Отсечение для VIP-баллов было принято равным 1,5 в соответствии со стандартной инициативой метаболомики (уровень MSI = 1).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

На первом этапе работы оптимизировали условия масс-спектрометрического детектирования дейтерированных оксипинов, информация о которых отсутствовала в программном пакете. Оптимизация включала выбор напряжений на префильтрах первого и третьего квадруполь и настройку режима работы соударительной ячейки для достижения наилучшей чувствительности для изучаемых аналитов без использования хроматографической колонки.

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 разных метаболитов. Структурные изомеры часто обнаруживаются при одном и том же MRM-переходе и проявляются несколькими пиками на 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 MS/MS наиболее интенсивные дочерние ионы образуются в результате процесса последовательного элиминирования таких нейтральных частиц, как H_2O и CO_2 . Однако для повышения специфичности их детектирования лучше выбирать дочерние ионы с более низким m/z , интенсивность которых увеличивается с увеличением напряжения в

соударительной ячейке масс-спектрометра. Устанавливали времена удерживания оксипинов (Таблица 3). Оказалось, что в используемых хроматографических условиях происходит ко-элюирование 15-deoxy- Δ -12,14-PGJ₂, 15-deoxy- Δ -12,14-PGJ₂-d₄ и 19-НЕТЕ, а также используется идентичный MRM-переход (319,2→275,2) для детектирования последних двух соединений. Это повлекло необходимость более пристального рассмотрения масс-спектров второго порядка молекул и подбора иных условий детектирования для 15-deoxy- Δ -12,14-PGJ₂-d₄ (319,2→165,1), т.к. дочерний ион с m/z 165,1 отсутствовал в спектре МС/МС 19-НЕТЕ. Спектры МС/МС некоторых изученных соединений представлены на Рисунок 4.

Масс-хроматограмма MRM-переходов, соответствующих используемым в работе дейтеростандартам, представлена на Рисунок 5, отнесение пиков показано в Таблице 3. Установлена необходимость использования информации по временам удерживания родственных соединений, элюируемых совместно с теми, для которых имеется набор дейтеростандартов, в целях их корректной идентификации в биологических образцах различного генезиса. Оптимизировали протокол пробоподготовки оксипинов из сложных матриц, исследуемых в работе. Для экстракции оксипинов применяли подход, ориентированный на использование ТФЭ-экстракции (Oasis HLB), так как для некоторых оксипинов, несмотря на большую интенсивность сигналов в случае ЖЖ-экстракции из подкисленных растворов с помощью этилацетата, наилучшее соотношение сигнал/шум достигалось при использовании ТФЭ-экстракции. Это свидетельствует о том, что при большей эффективности ЖЖ-экстракции при использовании этилацетата помимо целевых соединений (оксипинов) попутно извлекаются иные эндогенные соединения из образцов, влияющие на результаты анализа путем ионной супрессии сигналов. Показатель воспроизводимости при проведении параллельных опытов (n=3) также был выше при применении ТФЭ-экстракции, при этом он зависел от типа матрицы. Воспроизводимость при анализе клеточной культуры была выше, чем для слезной жидкости и

плазмы крови, что говорит о более сложном химическом составе последних двух матриц.

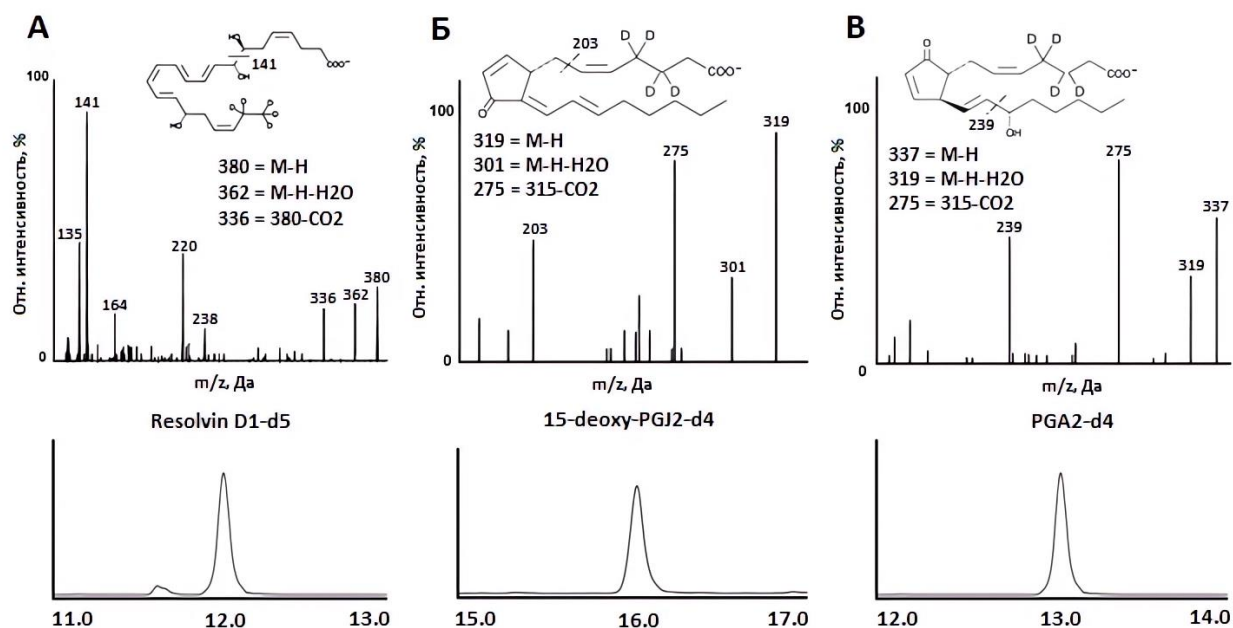


Рисунок 4. Спектры МС/МС и МRM-хроматограммы Resolvin D₁-d₅ (А), 15-deoxy-Δ-12,14-PGJ₂-d₄ (Б) и PGA₂-d₄ (В).

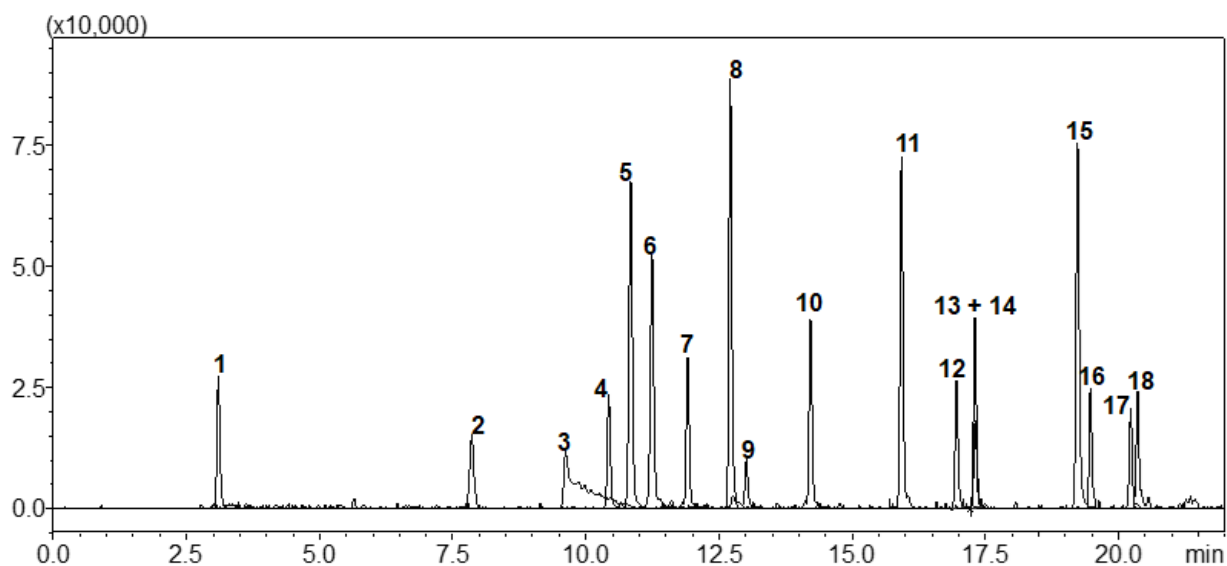


Рисунок 5. Масс-хроматограмма МRM-переходов, соответствующих используемым дейтеростандартам (C = 100 нг/мл): 1 – tetranor-PGEM-d₆, 2 – 6-keto-PGF_{1α}-d₄, 3 – TXB₂-d₄, 4 – PGF_{2α}-d₄, 5 – PGE₂-d₄, 6 – PGD₂-d₄, 7 – Resolvin D₁-d₅, 8 – LTC₄-d₅, 9 – PGA₂-d₄, 10 – LTB₄-d₄, 11 – 15-deoxy-Δ-12,14-PGJ₂-d₄, 12

– 15-НЕТЕ-d₈, 13 – 12-НЕТЕ-d₈, 14 – 5-НЕТЕ-d₈, 15 – ОЕА-d₄, 16 – ЕРА-d₅, 17 – ДНА-d₅, 18 – АА-d₈.

Таким образом, для проведения исследований, направленных на изучение качественного и количественного состава широкого спектра оксилипинов различных классов в сложных биологических матрицах, был выбран вариант ТФЭ-экстракции с помощью патронов Oasis HLB. Типичные масс-хроматограммы MRM-переходов оксилипинов, обнаруживаемых в клеточных культурах, плазме крови и слезной жидкости представлены на Рисунок 6-8.

Таблица 3. Дескрипторы для идентификации и количественного анализа оксилипинов

№№	Название	Время удерживания, мин	MRM-переход	Полярность	Q1, В	Q2, В	СЕ
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

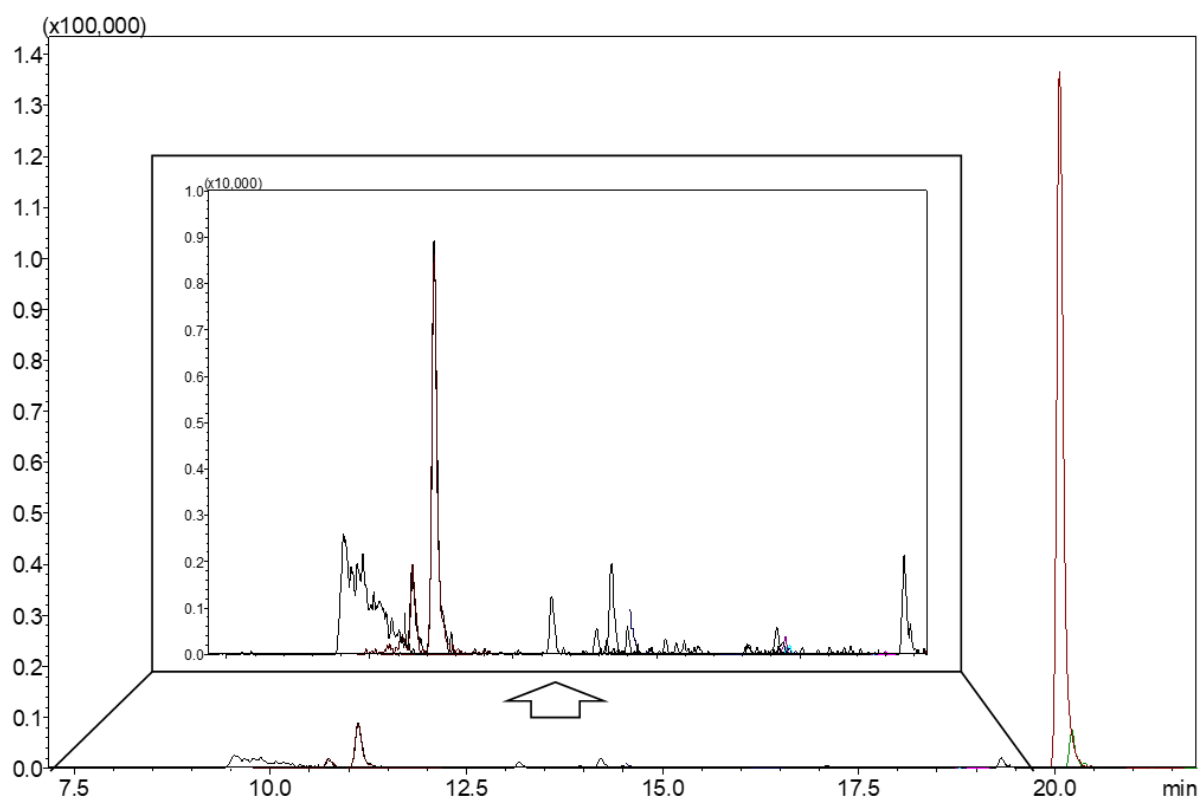


Рисунок 6. Типичная хроматограмма MRM-переходов оксипинов из образца клеточной культуры

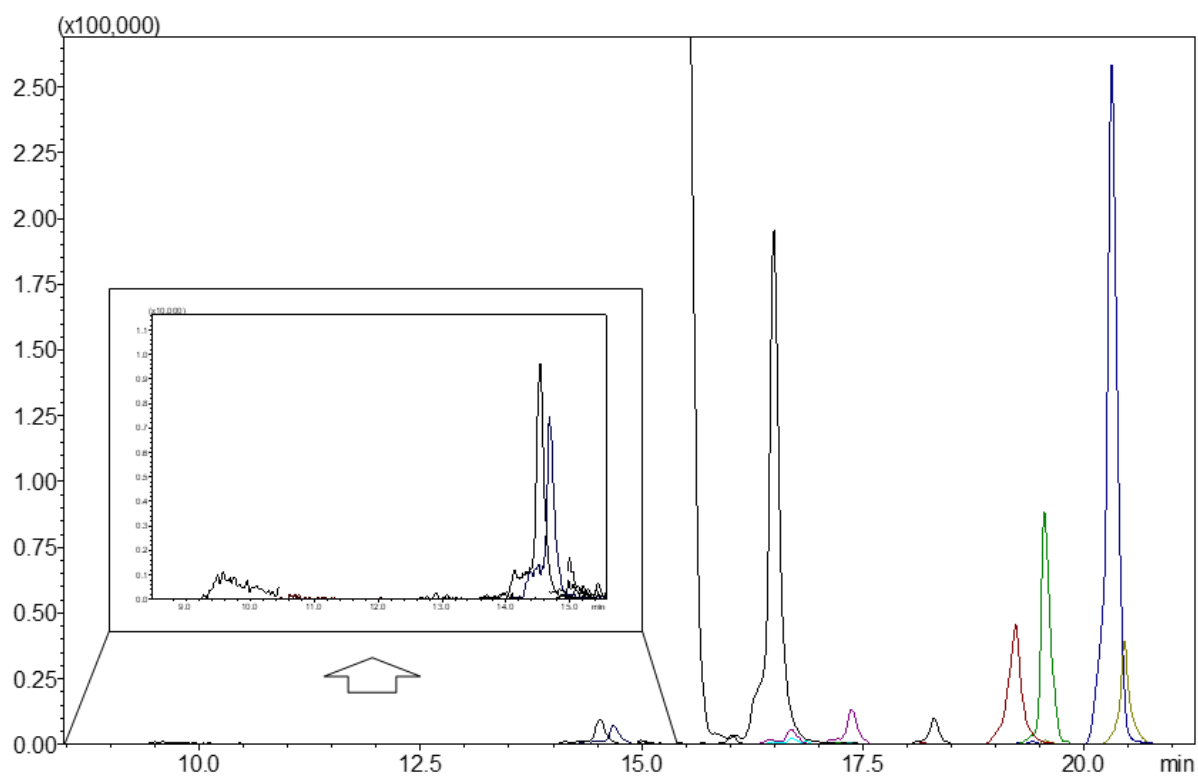


Рисунок 7. Типичная хроматограмма MRM-переходов оксилипинов из образца плазмы крови

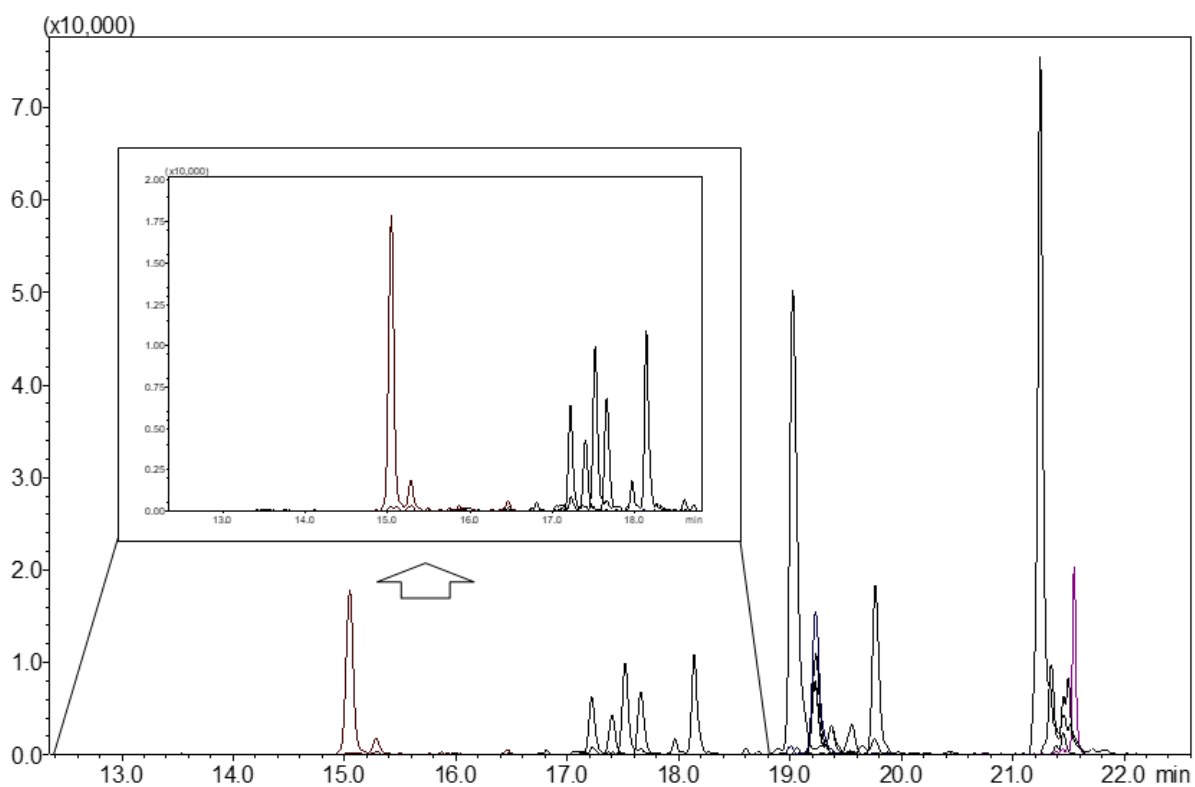


Рисунок 8. Типичная хроматограмма MRM-переходов оксилипинов из образца слезной жидкости

3.2 Валидация разработанных методик количественного определения оксипинов

Целью валидации является документальное подтверждение того, что аналитическая методика определения количественного содержания оксипинов методом ВЭЖХ-МС/МС соответствует предъявляемым к ней требованиям.

Валидация разработанных методик проводилась в соответствии с действующими нормативными документами [14–17,134].

В результате работы были установлены необходимые и достаточные валидационные параметры разработанной методики и доказана ее пригодность для количественного анализа профилей оксипинов в различных биологических матрицах.

3.2.1 Селективность

Для определения селективности отбирали биологические матрицы (клеточная культура, плазма крови, слезная жидкость) в количестве не менее 12 параллельных образцов для каждой, дополнительно добавляли к 6 образцам каждой биологической матрицы смесь дейтерированных стандартов определяемых соединений и проводили пробоподготовку методом ТФЭ-экстракции. Проводили также анализ двух образцов «бланк» (бидистиллированная вода, бидистиллированная вода с добавлением смеси дейтерированных стандартов), которые подвергали всем этапам пробоподготовки перед приборным анализом.

Критерий приемлемости: на хроматограммах соответствующих определяемым соединениям MRM-переходов должны отсутствовать сигналы,

совпадающие по времени удерживания веществ (не более 20% от значения площади пика ВС нПКО определяемых веществ).

Поскольку все анализируемые соединения из определяемой панели являются эндогенными метаболитами, оценить селективность каждого MRM-перехода невозможно напрямую в матрицах. Селективность для них оценивали по образцам «бланк», убеждаясь в отсутствии интерференции между хроматографическими пиками. На MRM-хроматограммах образца «бланк» без добавок отсутствовали все пики, характеристичные для определяемых веществ и дейтеростандартов. Во втором образце «бланк» детектировали все соответствующие привнесенным соединениям MRM-переходы. При этом в испытуемых образцах с добавкой дейтеростандартов наблюдали сигналы соответствующих MRM-переходов, а в испытуемых образцах без добавки сигналы соответствующих MRM-переходов отсутствовали.

Таким образом, полученные результаты подтверждают высокую селективность методики.

3.2.2 Предел обнаружения

Исходя из невозможности селективного удаления эндогенных определяемых соединений из исследуемых матриц без существенного изменения их химического состава, ПО находили экспериментально для каждого дейтеростандарта путем анализа серии растворов, содержащих добавки разного количества смеси ВС к исследуемым биоматрицам.

Критерий приемлемости: для раствора, содержащего ВС на уровне ПО, соотношение сигнал/шум должно быть не менее 3:1 для каждого соединения.

Результаты представлены в Таблице 4.

Таким образом, установлены ПО для определяемых соединений в условиях методики.

3.2.3 Нижний предел количественного определения

Исходя из невозможности селективного удаления эндогенных определяемых соединений из исследуемых матриц без существенного изменения их химического состава, нПКО находили экспериментально для каждого дейтеростандарта путем анализа серии растворов, содержащих добавки разного количества смеси ВС к исследуемым биоматрицам.

Критерий приемлемости: для раствора, содержащего ВС на уровне нПКО, соотношение сигнал/шум должно быть не менее 10:1 для каждого соединения.

Результаты представлены в Таблице 4.

Таким образом, установлены уровни нПКО для определяемых соединений в условиях методики.

3.2.4 Линейность

Для определения линейности шесть калибровочных образцов с концентрацией ВС от 0,01 до 50,0 нг/мл для всех ВС готовили для каждой матрицы биофлюидов и анализировали каждый образец в трех повторностях.

Критерий приемлемости: величина отклонения от приготовленной концентрации для всех дейтерированных ВС в калибровочных образцах должна отличаться не более чем на 15% на всех калибровочных уровнях, кроме нПКО (допускается отклонение не более чем на 20%).

В результате выявлена линейная зависимость отклика детектора от концентрации аналитов, рассчитаны уравнения калибровочных кривых, установлены значения коэффициентов корреляции (не менее 0,998). Статистические параметры представлены в Таблице 5.

Таким образом, доказана линейность методики количественного определения профилей липидов в различных биологических матрицах.

3.2.5 Точность (правильность и прецизионность)

Правильность метода показывает степень близости средних результатов измерений к номинальному (истинному) значению. Прецизионность демонстрирует близость отдельных значений, полученных при параллельном анализе одного и того же образца.

Правильность и прецизионность методики внутри серии определялась по результатам анализов образцов контроля качества (QC_1-QC_4) в одном аналитическом цикле. Анализ проводился в шести сериях для каждого значения концентрации.

Правильность и прецизионность методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализов образцов контроля качества (QC_1-QC_4). Анализ проводился в шести сериях для каждого значения концентрации в течение трех аналитических циклов одним исследователем.

Определение значений концентраций образцов контроля качества (QC_1-QC_4) осуществлялось по уравнениям калибровочных кривых для соответствующего аналитического цикла. Результаты определения правильности и прецизионности представлены в Таблице 6.

Таблица 4. Результаты определения ПО и нПКО для различных биологических матриц

№№	Название	Биологическая матрица					
		Клеточная культура		Плазма крови		Слезная жидкость	
		Предел обнаружения (ПО), пг/вкол	Нижний предел количественного определения (нПКО), пг/вкол	Предел обнаружения (ПО), пг/вкол	Нижний предел количественного определения (нПКО), пг/вкол	Предел обнаружения (ПО), пг/вкол	Нижний предел количественного определения (нПКО), пг/вкол
1	tetranor-PGEM-d6	10,2	19,2	10,5	16,1	12,0	18,3
2	6-keto-PGF _{1a} -d4	6,3	15,1	4,2	13,0	5,9	18,2
3	TXB ₂ -d4	4,3	10,1	4,3	12,4	4,6	15,2
4	PGF _{2a} -d4	10,3	21,1	12,5	26,3	11,1	23,3
5	PGE ₂ -d4	3,2	10,2	4,6	13,4	5,3	14,7
6	PGD ₂ -d4	3,1	11,4	4,0	13,9	4,6	12,5
7	Resolvin D ₁ -d5	5,6	14,1	5,9	15,2	8,2	14,6
8	LTC ₄ -d5	7,6	15,3	8,3	19,9	8,5	17,6
9	PGA ₂ -d4	3,9	13,6	3,9	13,8	3,9	12,9
10	LTB ₄ -d4	6,9	15,3	7,6	18,6	7,3	20,2
11	15-deoxy- Δ -12,14-PGJ ₂ -d4	7,4	20,1	7,2	19,6	8,0	22,6
12	15-HEТЕ-d8	21,2	43,6	25,4	46,5	25,8	52,1
13	12-HEТЕ-d8	17,8	41,6	21,0	43,7	19,5	45,2
14	5-HEТЕ-d8	13,0	22,6	15,3	25,0	14,6	27,5
15	OEA-d4	2,4	8,3	3,0	9,0	3,2	8,5
16	EPA-d5	48,9	101,2	52,2	113,5	53,7	105,8
17	DHA-d5	52,3	111,5	48,6	107,2	50,3	113,6
18	AA-d8	66,8	103,2	83,2	117,8	76,3	111,9

Критерии приемлемости: для концентрации на уровне нПКО коэффициент вариации (CV) среднего значения результатов измерений должен отличаться не более чем на 15% на всех уровнях, а значение правильности составлять меньше $\pm 15\%$ от истинной концентрации, кроме уровня нПКО (не более чем на 20%, а значение правильности составлять меньше $\pm 20\%$ от истинной концентрации).

Полученные результаты демонстрируют, что значения правильности и прецизионности для разработанной методики соответствуют критериям приемлемости для всех изученных биологических матриц.

Таким образом, установлены правильность и прецизионность для определяемых соединений в условиях методики.

3.2.6 Эффект матрицы и степень извлечения

Для оценки влияния на результаты анализа оксипиринов сопутствующих веществ, присутствующих в различных биологических матрицах, на количественное определение оксипиринов, проводили расчёт матричного фактора (MF), представляющего собой отношение площадей хроматографических пиков, соответствующих MRM-переходам для каждого дейтерированного ВС в образце с биологической матрицей к их площадям в чистом растворителе (без биологической матрицы). Нормализованный фактор матрицы (NMF), получаемый путём деления рассчитанного значения MF определяемого соединения на значение MF соответствующего ВС, не рассчитывали в связи с невозможностью получения биологических матриц, свободных от содержания эндогенных определяемых соединений. При этом, принимая во внимание идентичность физико-химических свойств определяемых аналитов и ВС, являющихся их изотопологами, а также

Таблица 5. Результаты валидации по параметру «линейность»

№№	Название	Биологическая матрица								
		Клеточная культура			Плазма крови			Слезная жидкость		
		Уравнение калибровочной кривой	R ²	R	Уравнение калибровочной кривой	R ²	R	Уравнение калибровочной кривой	R ²	R
1	tetranor-PGEM-d6	$y = 9942,7x + 954,78$	0,9975	0,9985	$y = 4892,5x + 438,9$	0,997	0,9985	$y = 21023x + 246,64$	0,9965	0,999
2	6-keto-PGF _{1α} -d4	$y = 4898,5x + 275,04$	0,9978	0,999	$y = 4931,3x + 201,01$	0,9987	0,9990	$y = 21434x - 2711$	0,9974	0,9985
3	TXB ₂ -d4	$y = 17827x + 5789,8$	0,9955	0,9995	$y = 4863,4x + 448,3$	0,995	0,9980	$y = 21064x - 474,79$	0,9978	0,9985
4	PGF _{2α} -d4	$y = 10223x + 3325,5$	0,9987	0,9985	$y = 4886,1x + 963,68$	0,998	0,9990	$y = 21328x - 1887,9$	0,9971	0,998
5	PGE ₂ -d4	$y = 10181x + 3931,3$	0,999	0,9985	$y = 4838,1x + 689,24$	0,9955	0,9985	$y = 13035x + 11119$	0,9955	0,999
6	PGD ₂ -d4	$y = 8958,7x + 3354,6$	0,9987	0,998	$y = 4891,2x + 885,51$	0,9984	0,9985	$y = 11712x + 12431$	0,9962	0,999
7	Resolvin D ₁ -d5	$y = 9933,4x + 2218,2$	0,9996	0,9985	$y = 4819,4x + 805,43$	0,9976	0,9990	$y = 12154x + 8995,7$	0,9971	0,9985
8	LTC ₄ -d5	$y = 19885x + 1909,6$	0,9975	0,999	$y = 17454x + 6238$	0,9951	0,9995	$y = 11229x + 11120$	0,9961	0,9995
9	PGA ₂ -d4	$y = 6436,3x + 1623,6$	0,9994	0,999	$y = 13294x + 8294,3$	0,9985	0,9980	$y = 11714x + 9163,1$	0,9972	0,998
10	LTB ₄ -d4	$y = 9908,4x + 526,18$	0,9967	0,9985	$y = 14348x + 2526$	0,9995	0,9985	$y = 13660x + 8044,9$	0,9968	0,999
11	15-deoxy-Δ-12,14-PGJ ₂ -d4	$y = 9049,3x + 2368,3$	0,9998	0,998	$y = 14158x + 2516$	0,9988	0,9990	$y = 13842x + 7188,2$	0,9968	0,998
12	15-HETE-d8	$y = 6747,2x + 245,04$	0,9989	0,999	$y = 14433x + 1083,6$	0,9956	0,9980	$y = 9878,4x + 5884$	0,9952	0,9985
13	12-HETE-d8	$y = 13324x + 5837,7$	0,9994	0,9995	$y = 14279x + 3061,1$	0,9992	0,9980	$y = 13913x + 7344,2$	0,9975	0,9985
14	5-HETE-d8	$y = 6730,6x + 3763,2$	0,9961	0,9995	$y = 14304x + 2608,6$	0,9995	0,9985	$y = 13879x + 7124,5$	0,9971	0,998
15	OEA-d4	$y = 6024,7x + 502,1$	0,9985	0,9985	$y = 21207x - 557,18$	0,9979	0,9990	$y = 13745x + 4943,3$	0,999	0,9985
16	EPA-d5	$y = 6472,2x + 4062,8$	0,9973	0,999	$y = 20579x + 937,16$	0,9976	0,9985	$y = 6544,2x + 4611,6$	0,9989	0,999
17	DHA-d5	$y = 14199x + 2784,1$	0,9986	0,999	$y = 21069x - 364,16$	0,9966	0,9990	$y = 9300,2x + 2838$	0,9988	0,998
18	AA-d8	$y = 14325x + 2714,1$	0,9995	0,9995	$y = 21196x - 108,96$	0,9968	0,9980	$y = 9064,4x + 3973,3$	0,9995	0,9995

прецизионность используемого оборудования, считали, что коэффициенты вариации значений NMF будут составлять не более 15% для используемого наиболее точного варианта количественного анализа (метод изотопного разбавления). Для определения параметров использовали образцы контроля качества на двух уровнях (QC_2 и QC_3). Анализ проводили в шести повторностях для каждого значения концентрации. Для расчёта показателей степени извлечения дейтерированных ВС определяли отношения площадей хроматографических пиков, соответствующих MRM-переходам для каждого дейтерированного ВС в образцах контроля качества после проведения процедуры ТФЭ-экстракции с площадями соответствующих хроматографических пиков в образцах той же концентрации без проведения ТФЭ-экстракции. Анализ проводили в шести повторностях для каждого значения концентрации.

Критерий приемлемости: коэффициенты вариации значений степени извлечения дейтерированных ВС не должны превышать не более 15%.

Результаты оценки матричного эффекта и степени извлечения для исследованных биологических матриц представлены в Таблице 7.

Таким образом, были определены матричный эффект и степень извлечения для дейтерированных ВС в условиях методики количественного определения оксипинов в различных биологических матрицах.

3.2.7 Эффект переноса

Перенос аналитов из пробы в пробу в хроматографической системе оценивали путем шестикратного последовательного анализа проб каждой биологической матрицы (клеточная культура, плазма крови, слезная жидкость), содержащих ВС на уровне 75% от верхнего предела

Таблица 6. Результаты определения правильности и прецизионности для различных биологических матриц

№ №	Название	Образец	Биологическая матрица											
			Клеточная культура				Плазма крови				Слезная жидкость			
			Правильность		Прецизионность		Правильность		Прецизионность		Правильность		Прецизионность	
			RSD, %		E, %		RSD, %		E, %		RSD, %		E, %	
			Внутри серийная	Между серийная	Внутри серийная	Между серийная	Внутри серийная	Между серийная	Внутри серийная	Между серийная	Внутри серийная	Между серийная	Внутри серийная	Между серийная
1	tetranor-PGEM-d6	QC_1	103,2	92,1	2,7	3,4	89,1	94,1	2,6	2,3	113,2	104,1	2,1	3,3
		QC_2	93,4	97,1	2,9	2,6	87,0	98,0	3,5	3,8	106,1	105,2	3,6	2,7
		QC_3	95,1	104,8	3,8	2,8	91,3	114,3	3,2	2,9	100,2	107,1	3,9	2,5
		QC_4	101,5	92,2	3,1	3,2	92,1	103,2	2,7	3,5	88,1	112,1	2,1	3,4
2	6-keto-PGF _{1a} -d4	QC_1	100,5	102,3	3,6	2,5	112,0	91,5	2,3	2,4	111,5	86,3	2,2	3,8
		QC_2	92,1	96,6	3,1	2,8	101,3	111,6	3,6	3,7	95,6	107,4	3,1	3,9
		QC_3	100,3	101,7	3,4	3,8	95,4	103,7	2,3	2,6	112,4	90,2	2,3	3,6
		QC_4	99,3	93,4	2,1	3,0	102,0	106,0	2,9	2,6	103,5	85,4	2,0	3,0
3	TXB ₂ -d4	QC_1	92,7	102,6	2,9	3,7	105,1	102,1	2,4	3,4	102,1	104,5	3,1	2,8
		QC_2	94,8	96,9	3,6	2,1	109,0	104,6	2,1	2,4	100,7	115,1	3,4	3,4
		QC_3	102,7	99,5	3,0	2,3	87,0	94,6	2,9	3,2	102,7	97,7	2,7	3,8
		QC_4	108,9	109,3	3,9	2,7	91,3	93,2	2,2	3,2	105,7	111,5	3,8	2,0

4	PGF _{2a} -d4	QC_1	100,4	109,8	2,3	3,1	101,3	107,2	3,5	2,8	101,2	92,2	2,1	2,9
		QC_2	104,7	99,3	3,8	3,3	112,3	97,7	2,7	3,6	88,4	98,4	2,4	2,8
		QC_3	93,6	90,4	2,4	2,8	92,5	105,8	2,8	2,7	115,5	103,3	3,5	3,7
		QC_4	96,7	105,6	3,6	2,9	115,6	114,6	2,3	3,1	106,8	111,2	2,3	3,4
5	PGE ₂ -d4	QC_1	106,8	101,5	3,4	3,2	107,4	96,4	2,6	3,3	102,4	102,6	2,4	2,5
		QC_2	97,3	105,5	2,0	3,4	95,7	90,2	3,1	2,6	100,7	104,6	3,7	3,1
		QC_3	104,4	107,3	2,9	2,6	104,3	97,3	3,5	3,1	88,6	105,6	2,5	2,9
		QC_4	101,4	98,4	3,0	3,7	91,5	111,6	2,3	2,2	109,4	87,7	3,6	3,6
6	PGD ₂ -d4	QC_1	107,1	101,4	3,9	2,9	92,7	89,1	3,2	3,3	114,5	90,5	2,3	2,1
		QC_2	96,8	100,3	3,5	2,7	102,2	113,0	2,1	2,8	101,2	115,8	3,9	2,9
		QC_3	98,7	103,2	2,2	3,1	109,4	93,2	3,2	2,3	101,7	99,3	3,2	3,0
		QC_4	109,8	100,7	2,8	3,4	105,6	90,7	2,5	2,5	87,9	102,8	3,6	2,1
7	Resolvin D ₁ -d5	QC_1	91,2	101,7	2,3	3,8	86,6	92,5	2,5	2,5	91,6	101,8	3,6	3,1
		QC_2	95,7	101,7	2,6	3,4	88,7	87,8	2,8	3,9	89,4	102,2	2,7	3,1
		QC_3	100,2	104,6	3,1	3,6	85,2	95,3	2,2	2,6	114,1	115,8	3,5	3,2
		QC_4	96,7	106,3	2,6	3,2	85,8	87,1	3,0	3,5	86,7	102,3	2,3	2,8
8	LTC ₄ -d5	QC_1	107,6	109,3	3,0	3,4	94,1	103,8	3,7	3,3	113,5	106,4	3,0	2,7
		QC_2	105,3	103,2	3,6	3,1	81,0	106,5	3,4	2,1	106,5	105,6	3,8	3,4
		QC_3	99,1	107,4	2,5	2,0	96,4	102,6	2,6	2,2	107,8	102,6	2,6	2,0
		QC_4	104,5	108,8	2,3	3,9	95,5	99,3	2,7	3,9	111,2	101,5	3,0	2,1
9	PGA ₂ -d4	QC_1	97,4	99,7	3,7	2,1	107,7	95,4	3,3	2,1	106,3	114,7	3,7	2,8
		QC_2	98,7	102,5	2,7	3,5	104,3	107,2	2,9	2,0	103,7	106,7	2,4	3,4

		QC_3	97,4	92,9	3,4	2,9	105,4	99,7	2,5	3,2	95,9	89,9	3,7	3,0
		QC_4	108,4	102,4	2,2	3,9	91,6	100,1	3,4	2,2	103,8	100,7	2,9	2,4
10	LTB ₄ -d4	QC_1	109,8	108,4	3,2	2,6	106,2	87,7	2,7	2,3	112,5	108,6	3,3	3,6
		QC_2	101,4	106,8	2,9	2,4	113,3	93,5	2,6	3,4	89,8	112,5	2,2	3,9
		QC_3	90,3	97,8	3,3	3,8	108,4	103,3	3,26	2,0	112,6	109,4	3,1	3,8
		QC_4	102,5	101,7	3,4	2,3	112,7	113,4	3,2	2,4	115,7	109,2	3,3	2,7
11	15-deoxy- Δ -12,14-PGJ ₂ -d4	QC_1	107,2	100,8	2,5	3,0	105,5	105,6	2,4	2,6	87,7	88,3	3,5	2,2
		QC_2	101,6	104,1	3,7	2,1	98,6	96,7	3,5	2,3	106,3	104,8	3,0	2,5
		QC_3	103,8	96,7	3,8	2,4	112,3	101,3	3,1	3,3	111,3	111,6	2,9	2,3
		QC_4	102,8	108,5	3,2	3,7	113,1	98,2	3,5	3,3	104,4	100,4	3,7	2,3
12	15-HETE-d8	QC_1	94,5	95,6	3,5	3,1	102,7	98,8	2,5	2,7	106,4	95,5	2,5	3,9
		QC_2	106,3	102,8	2,7	3,1	94,4	109,2	2,6	2,1	114,4	106,3	2,4	3,6
		QC_3	103,9	108,5	2,6	3,7	108,2	106,3	2,5	3,1	106,4	115,4	3,3	2,8
		QC_4	97,6	96,8	3,9	2,2	101,6	93,5	2,6	3,4	103,3	103,3	3,1	2,6
13	12-HETE-d8	QC_1	105,8	100,4	2,4	3,6	101,4	107,6	2,8	3,1	106,5	94,7	2,9	2,5
		QC_2	99,2	98,4	3,3	2,9	110,6	114,3	3,6	3,6	114,5	108,8	3,8	2,6
		QC_3	104,5	96,8	3,1	2,2	89,4	96,2	2,4	3,3	115,7	91,3	3,4	3,2
		QC_4	108,5	101,5	3,7	3,3	103,2	96,4	3,1	2,6	109,8	106,4	2,6	3,9
14	5-HETE-d8	QC_1	92,3	92,8	2,2	2,8	98,3	91,0	2,6	3,4	115,2	109,2	3,5	3,3
		QC_2	98,8	103,6	3,1	3,8	104,9	100,2	3,3	3,3	90,1	102,5	2,1	2,3
		QC_3	90,6	90,7	3,5	2,3	110,6	105,3	3,4	3,5	103,5	106,8	3,2	2,5
		QC_4	98,4	100,8	2,6	3,9	107,8	101,5	2,6	2,1	86,7	106,2	2,7	3,1

15	OEA-d4	QC_1	94,7	94,9	3,8	3,1	89,4	109,7	3,0	2,2	110,5	111,6	3,0	2,7
		QC_2	102,5	94,9	2,8	2,2	99,5	95,3	2,9	2,7	101,3	89,7	3,9	2,9
		QC_3	109,2	95,6	3,6	3,1	102,3	111,4	2,0	2,7	106,6	115,2	2,9	2,1
		QC_4	108,9	100,6	2,4	3,4	90,6	103,5	3,7	2,4	99,4	109,1	3,2	3,7
16	EPA-d5	QC_1	98,9	103,2	2,8	3,4	102,7	96,3	2,5	3,8	86,7	106,8	3,8	3,2
		QC_2	108,4	98,4	3,7	2,3	92,2	111,7	2,0	2,4	106,6	102,8	2,6	3,2
		QC_3	108,3	100,5	2,6	3,3	85,8	102,9	2,8	2,2	88,3	105,9	2,8	3,6
		QC_4	105,7	109,5	3,4	2,9	95,4	86,3	3,4	3,7	115,5	114,5	3,9	2,1
17	DHA-d5	QC_1	102,3	105,1	2,6	3,9	105,2	88,6	3,1	2,9	113,8	112,4	2,2	2,4
		QC_2	93,7	107,6	3,2	3,0	86,3	110,3	2,3	2,3	85,8	106,1	3,2	3,4
		QC_3	101,4	109,4	3,7	2,1	103,4	94,5	2,7	2,8	107,2	106,2	3,8	3,3
		QC_4	109,5	99,8	3,1	2,9	89,2	108,4	2,9	2,9	86,3	115,6	3,6	3,1
18	AA-d8	QC_1	106,5	100,3	3,2	2,7	88,6	93,7	2,2	3,0	91,3	87,3	2,7	2,1
		QC_2	106,4	91,7	2,9	3,5	89,7	98,3	3,4	3,2	100,4	113,3	2,9	2,2
		QC_3	95,7	109,2	3,2	2,8	91,3	109,0	3,6	3,5	110,1	113,1	2,8	3,9
		QC_4	105,2	100,4	3,5	2,0	97,9	102,3	3,1	3,6	107,1	112,3	2,9	3,7

количественного определения (образцы QC_3) и последующего анализа образцов «бланк» (бидистиллированная вода).

Критерий приемлемости: значения площадей сигналов хроматографических пиков, соответствующих MRM-переходам для дейтерированных ВС, не должны превышать 20% от значений площадей сигналов хроматографических пиков на уровне нПКО.

На хроматограммах образцов «бланк» отсутствовали сигналы MRM-переходов, соответствующих дейтерированным ВС, что подтверждает отсутствие эффекта переноса для аналитов при переходе от большей концентрации к меньшей.

Таким образом, установлено отсутствие эффекта переноса для определяемых соединений в условиях методики.

3.2.8 Стабильность

Исследование стабильности проводили на двух концентрационных уровнях (QC_2 и QC_3) для трех видов биологических матриц (клеточная культура, плазма крови, слезная жидкость). Проводились следующие исследования стабильности:

1. Стабильность в автосэмплере;
2. Краткосрочная и долгосрочная стабильность стандартных растворов.

Критерий приемлемости: колебание концентрации не должно превышать 15% для аналитов.

Таблица 7. Результаты определения эффекта матрицы и степени извлечения для различных биологических матриц

№ №	Название	Образец	Биологическая матрица								
			Клеточная культура			Плазма крови			Слезная жидкость		
			Эффект матрицы	Степень извлечения		Эффект матрицы	Степень извлечения		Эффект матрицы	Степень извлечения	
			Коэффициент вариации MF, %	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %	Коэффициент вариации MF, %	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %	Коэффициент вариации MF, %	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
1	tetranor-PGEM-d6	QC_2	73,8	83,4	2,5	68,2	76,1	7,5	75,8	77,8	2,4
		QC_3	79,5	87,1	9,6	74,1	75,6	3,6	74,7	73,6	6,3
2	6-keto-PGF _{1a} -d4	QC_2	89,3	90,5	10,7	84,8	97,2	6,1	61,9	74,9	7,3
		QC_3	85,8	87,8	8,8	91,4	93,2	2,3	66,3	77,9	4,9
3	TXB ₂ -d4	QC_2	61,7	89,2	6,6	67,3	75,4	4,9	88,2	86,8	16,7
		QC_3	68,5	84,6	4,9	63,2	77,1	3,4	85,4	96,5	12,6
4	PGF _{2a} -d4	QC_2	81,5	87,5	16,3	76,1	94,8	11,7	72,6	94,1	17,2
		QC_3	75,4	94,7	14,6	70,7	92,5	6,2	73,7	86,4	7,2
5	PGE ₂ -d4	QC_2	63,7	86,6	9,5	68,1	80,9	32,3	89,8	78,7	2,9
		QC_3	67,6	74,8	13,5	72,2	84,6	15,2	81,2	86,5	2,3
6	PGD ₂ -d4	QC_2	87,1	94,1	8,2	92,0	86,7	5,6	70,4	80,6	3,3
		QC_3	90,4	97,9	17,8	85,9	82,0	3,9	67,5	86,9	4,7
7	Resolvin D ₁ -d5	QC_2	73,3	83,5	6,3	78,8	98,6	4,4	81,6	76,8	7,7
		QC_3	79,1	79,7	4,6	74,7	96,0	3,5	83,8	80,3	16,2

8	LTC ₄ -d5	QC_2	66,8		77,4	4,7	72,4		85,4	0,6	84,5		78,5	15,5
		QC_3	72,7		79,5	6,6	67,3		88,3	1,3	77,1		83,2	14,3
9	PGA ₂ -d4	QC_2	86,8		88,2	1,2	91,5		74,7	17,5	72,8		96,1	8,1
		QC_3	90,1		90,3	4,3	85,7		80,5	7,1	77,9		91,4	10,7
10	LTB ₄ -d4	QC_2	62,5		96,8	6,2	67,8		84,2	7,6	68,4		77,7	14,3
		QC_3	69,2		92,7	2,2	64,7		78,2	6,5	66,2		84,6	7,3
11	15-deoxy- Δ -12,14-PGJ ₂ -d4	QC_2	82,1		77,1	2,7	77,5		94,5	1,6	76,1		91,9	19,4
		QC_3	76,0		80,5	3,8	71,4		86,3	5,1	75,1		73,8	11,5
12	15-HETE-d8	QC_2	61,9		96,2	18,5	67,5		84,6	8,9	80,2		93,5	19,1
		QC_3	68,7		94,9	11,4	63,6		93,3	10,1	82,6		97,7	19,3
13	12-HETE-d8	QC_2	81,7		89,7	7,7	76,6		82,2	22,9	80,7		93,6	17,9
		QC_3	75,6		94,1	5,9	71,1		85,0	13,3	75,7		86,3	8,8
14	5-HETE-d8	QC_2	63,9		89,5	9,4	68,3		82,4	6,3	71,3		92,2	11,8
		QC_3	67,8		85,6	8,8	72,4		88,2	7,7	87,6		97,7	9,5
15	OEA-d4	QC_2	87,3		94,2	4,7	92,0		85,7	2,2	79,8		77,4	10,2
		QC_3	90,6		87,7	8,3	85,9		80,0	5,4	83,5		91,6	18,6
16	EPA-d5	QC_2	73,9		97,2	7,2	78,8		91,3	3,7	76,8		86,5	18,2
		QC_3	79,6		94,4	2,1	74,6		88,1	6,1	78,3		91,1	9,8
17	DHA-d5	QC_2	66,9		76,9	10,2	72,3		84,8	5,8	68,9		76,4	14,8
		QC_3	72,8		79,3	6,3	67,2		90,4	5,3	64,3		92,9	10,2
18	AA-d8	QC_2	87,2		86,7	13,1	92,0		82,5	3,9	71,7		97,8	20,4
		QC_3	90,5		95,4	4,8	85,7		79,1	1,4	75,3		75,4	19,5

1. Стабильность в автосэмплере

При проведении ВЭЖХ-МС/МС анализа образцов различного генезиса ограничивали их время пребывания в автосэмплере хроматографа при температуре 5 °С до непосредственно анализа не более чем 12 часами. Стабильность оценивали с помощью образцов контроля качества (QC2 и QC3), проводили анализ не менее чем 12 параллельных образцов на каждом из концентрационных уровней. Образцы анализировали сразу после приготовления и спустя 12 часов их нахождения в термостатируемом автосэмплере. Результаты представлены в Таблице 8.

Полученные результаты показывают колебания концентрации аналитов в пределах допустимой ошибки ($\pm 15\%$). Таким образом, влияние внешних факторов на подготовленные пробы, находящиеся в автосэмплере в течение 12 часов, практически отсутствует.

2. Краткосрочная и долгосрочная стабильность стандартных растворов

Исследовали стабильность стандартных растворов при комнатной температуре в течение 2 часов) и в течение месяца при хранении в морозильной камере при -80 °С. Изучение стабильности проводили на двух концентрационных уровнях (QC_2 и QC_3). Результаты представлены в Таблице 8.

Краткосрочное исследование стабильности показало незначительное изменение площадей пиков аналитов при выдерживании стандартного раствора при комнатной температуре в течение 2 часов. Результаты показывают соответствие критерию приемлемости (не более 15%), что доказывает стабильность в изученных пределах.

Таблица 8. Результаты определения стабильности для различных биологических матриц

№ №	Название	Образец	Биологическая матрица											
			Клеточная культура			Плазма крови			Слезная жидкость					
			Стабильность в автосэмплере		Стабильность стандартных растворов		Стабильность в автосэмплере		Стабильность стандартных растворов		Стабильность в автосэмплере		Стабильность стандартных растворов	
			Ошибка определения, %		Краткосрочная, %	Долгосрочная, %	Ошибка определения, %		Краткосрочная, %	Долгосрочная, %	Ошибка определения, %		Краткосрочная, %	Долгосрочная, %
1	tetranor-PGEM-d6	QC_2	-7,2		-9,5	1,8	1,9		-8,5	-5,3	5,9		7,5	5,2
		QC_3	-2,7		5,4	-8,1	-2,0		-4,0	-3,7	-8,5		0,6	3,0
2	6-keto-PGF _{1a} -d4	QC_2	3,6		-2,9	4,3	-5,9		2,2	0,7	4,1		-3,3	-1,1
		QC_3	-1,1		0,4	-4,8	3,8		-7,4	6,1	-4,0		1,3	0,8
3	TXB ₂ -d4	QC_2	2,2		-6,7	-7,6	4,3		-0,3	-1,1	-1,9		-0,2	5,1
		QC_3	7,9		-3,3	-8,9	5,0		-6,7	1,3	0,4		3,6	0,5
4	PGF _{2a} -d4	QC_2	-9,2		-4,5	0,1	-3,5		-5,1	7,3	1,7		4,0	2,1
		QC_3	1,5		-8,7	7,4	7,7		-6,0	-9,0	6,7		2,8	4,8
5	PGE ₂ -d4	QC_2	-0,8		6,2	-9,9	1,4		6,6	2,8	2,2		-2,5	1,5
		QC_3	6,7		-5,1	2,8	-8,2		-0,5	-4,8	8,0		-3,6	-3,2
6	PGD ₂ -d4	QC_2	-3,4		-7,2	6,5	-6,1		-4,4	5,7	-5,7		-1,2	-6,4
		QC_3	-6,3		3,3	-2,1	4,9		-1,6	-2,6	-2,3		-7,6	6,2
7	Resolvin D ₁ -d5	QC_2	4,0		1,1	-1,4	0,2		-2,7	7,4	-0,9		0,7	1,2

		QC_3	5,9		-0,5	3,9	3,1		-7,2	1,8	-3,9		-8,9	-2,8
8	LTC ₄ -d ₅	QC_2	-4,2		2,0	-6,6	-1,9		5,6	-8,7	3,5		-9,0	4,3
		QC_3	8,0		-7,9	-5,0	-8,1		-2,8	0,1	0,9		-4,6	-1,5
9	PGA ₂ -d ₄	QC_2	-5,6		-6,0	5,2	-4,2		4,7	-3,9	6,3		3,1	-9,3
		QC_3	3,1		7,5	-3,0	6,4		-0,6	-7,7	2,0		5,4	-6,8
10	LTB ₄ -d ₄	QC_2	-8,4		4,9	-0,2	-7,6		-9,8	-6,8	-2,1		-1,3	-7,4
		QC_3	-2,5		6,4	1,4	-3,8		-2,9	-1,5	7,2		4,9	-5,1
11	15-deoxy- Δ -12,14-PGJ ₂ -d ₄	QC_2	0,8		-1,7	7,2	-5,6		0,3	-9,2	-7,2		-5,2	-0,4
		QC_3	-9,7		-8,5	-4,6	-1,0		2,7	-6,4	-9,4		-6,2	3,8
12	15-HETE-d ₈	QC_2	-0,6		0,7	8,0	-6,5		8,0	7,9	2,3		-4,7	-4,5
		QC_3	5,7		-4,9	-2,4	5,3		-3,2	6,7	-6,5		7,6	-8,2
13	12-HETE-d ₈	QC_2	-7,4		5,6	6,0	-0,8		2,1	-4,5	-3,4		-5,8	-7,5
		QC_3	4,6		-1,3	-7,1	7,8		-4,9	-1,7	4,2		1,6	2,9
14	5-HETE-d ₈	QC_2	-5,3		-9,1	3,4	-8,4		6,5	0,5	-1,0		-1,7	1,0
		QC_3	-2,3		1,6	0,2	-3,0		-6,3	4,0	8,0		-8,1	0,3
15	OEA-d ₄	QC_2	2,6		-3,2	-5,8	2,5		7,2	-5,5	-4,2		-2,9	5,9
		QC_3	7,1		8,0	-9,4	-5,0		-7,1	2,6	5,5		3,7	-7,3
16	EPA-d ₅	QC_2	-6,2		-0,9	-1,9	-9,1		-3,4	-0,4	-5,3		5,0	-3,7
		QC_3	1,0		2,3	-3,7	7,6		3,9	6,2	7,4		-9,5	1,4
17	DHA-d ₅	QC_2	-4,3		4,7	5,1	-1,3		-9,6	3,5	3,4		-0,6	4,1
		QC_3	6,2		-8,2	-4,5	5,4		1,2	-2,2	0,2		-4,3	-2,0
18	AA-d ₈	QC_2	-3,6		6,9	-0,4	1,5		-5,2	4,2	-6,6		-7,7	-1,6
		QC_3	0,3		-5,4	2,5	-6,6		-8,3	8,0	6,4		8,0	6,1

3.3 Апробация разработанного подхода

Разработанный метод детекции большого количества окисленный производных жирных кислот (оксилипинов) в различных биологических объектах позволил нам сформулировать задачи по исследованию возможности использования профиля оксилипинов как характеристической подписи при различных заболеваниях, для которых описано участие воспалительных процессов, а также потенциальной возможности использования профиля для оценки эффективности действия ЛС, обладающих противовоспалительными свойствами. Мы охарактеризовали профили оксилипинов в крови пациентов с нарушением метаболизма (болезнью Вильсона-Коновалова), слезной жидкости пациентов с первичной открытоугольной глаукомой, а также животных и клеточных моделях заболеваний с воспалительной компонентой. В ходе исследований оценивали, может ли профиль оксилипинов отражать наличие заболевания, давать новую информацию о его патогенезе или характеризовать эффективность действия ЛС.

3.3.1 Изменения профиля оксилипинов при болезни Вильсона-Коновалова

Нами было проведено исследование изменения профиля оксилипинов при болезни Вильсона-Коновалова (БВ). Это редкое аутосомно-рецессивное нарушение обмена веществ, возникающее в результате мутаций в гене АТР7В, кодирующем белок, транспортирующий медь. Распространенность БВ в мире составляет 1 на 30 000 человек; она еще выше в популяциях с высокой частотой кровного родства [160]. Проявления БВ разнообразны и, помимо заболеваний печени, могут включать неврологические и/или психиатрические

симптомы, а также нарушения в крови или почках. Поэтому существует гипотеза, что другие генетические и/или экологические факторы могут влиять на фенотипы БВ [160,161], однако влияние эпигенетических, экологических, возрастных и половых факторов на фенотип БВ остается малоизученным. Такие изменения могут по-разному проявляться на уровне организма в целом и быть причиной наблюдаемых различий в проявлениях заболевания. Это привлекло внимание к изучению болезни на уровне метаболома. Понимание вариаций в метаболоме может помочь в выявлении вариаций в биохимических путях, ведущих к различным проявлениям болезни. Высокопроизводительные методы, такие как метаболомное профилирование, могут углубить наше понимание патогенеза заболевания и биологии проявления БВ [162,163], а значит, привести к появлению новых терапевтических подходов [25].

В исследовании приняли участие 39 пациентов с БВ и 16 здоровых контрольных лиц. Антропометрические, демографические и биохимические параметры крови обследованных лиц представлены в Таблице 9. Было проведено биохимическое профилирование крови пациентов с БВ; данные по концентрации церулоплазмينا и Си в сыворотке также представлены в Таблице 9 [25].

Таблица 9. Демографические параметры пациентов, характеристики заболевания и принимаемые препараты.

Пациенты с БВ				
Пол	Ж (n=22)		М (n=17)	
	Среднее	Станд. откл.	Среднее	Станд. откл.
Возраст	35,68	13,17	32,18	12,36
Концентрация Си в сыворотке, мкМ	8,50	4,30	9,62	4,36
Шкала Шваба, %	80,95	18,41	67,5	22,36
Лейпцигская шкала	7,32	2,19	6,42	2,57
Церулоплазмин, мг/дл	9,61	7,20	12,78	8,02
Рост, см	169,95	5,55	180,80	7,44

Длительность заболевания, годы	13,86	11,34	9,81	9,32
Длительность лечения, годы	12,86	11,25	8,21	8,75
Вес, кг	61,20	13,27	75,67	12,21
Контрольная группа (КГ)				
	Ж (n=11)		М (n=5)	
	Среднее	Станд. откл.	Среднее	Станд. откл.
Возраст	37,88	15,96	49,2	12,19

Мы обнаружили, в общей сложности, 43 метаболита в плазме крови человека (Таблица П1 Приложения). Метаболиты принадлежали к различным классам липидов: 3 ПНЖК (АА, ДНА и ЕРА), 19 производных АА, одно производное DGLA, 7 производных ДНА, 3 производных ЕРА, 7 производных LA и 3 соединения, не относящиеся к ПНЖК (ОЕА, АЕА, Lyso-PAF) (Таблица П1 Приложения).

Для оценки отдельных метаболитов, различающихся в группах БВ и КГ, мы провели попарные сравнения концентраций метаболитов с поправкой на возраст и пол. Затем результаты были проиллюстрированы с помощью вулканической диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рисунок 9А). Четыре метаболита, концентрация которых значительно изменилась, обозначены красным цветом (12-ННТ, ЕРА, PGE₂ и PGD₂). Гистограммы относительных концентраций указанных соединений представлены на рисунке 9В. Концентрации всех измеренных метаболитов представлены в Таблице П1 Приложения.

Для дальнейшего анализа данных мы использовали нормализованные концентрации метаболитов. Наличие выбросов было выявлено путем проведения анализа главных компонент (РСА), чтобы предотвратить их влияние на модель. Тест Хотеллинга T2 показал наличие трех выбросов в группе здорового контроля. Для дальнейшего анализа были использованы 52 образца, которые находились внутри красных границ эллипса 95% доверительного интервала. Для проверки того, можно ли различать пациентов

БВ и КГ на основе концентрации оксипинов и ПНЖК, был проведен частичный дискриминантный анализ по методу наименьших квадратов (PLS-DA). Проекция на две компоненты представлена на Рисунок 9В. Исследуемые группы были разделены с небольшим перекрытием. Для каждого метаболита оценивался показатель VIP (как описано в разделе «Материалы и методы»). Значение этого параметра учитывает объясненную вариацию между классами в каждой проекции. Семь метаболитов (12-ННТ, EPA, 14,15-DHET, 9-NODE, OEA, PGE₂ и 9-KODE) со значениями VIP-значений > 1,5 приведены в Таблице 10 [25].

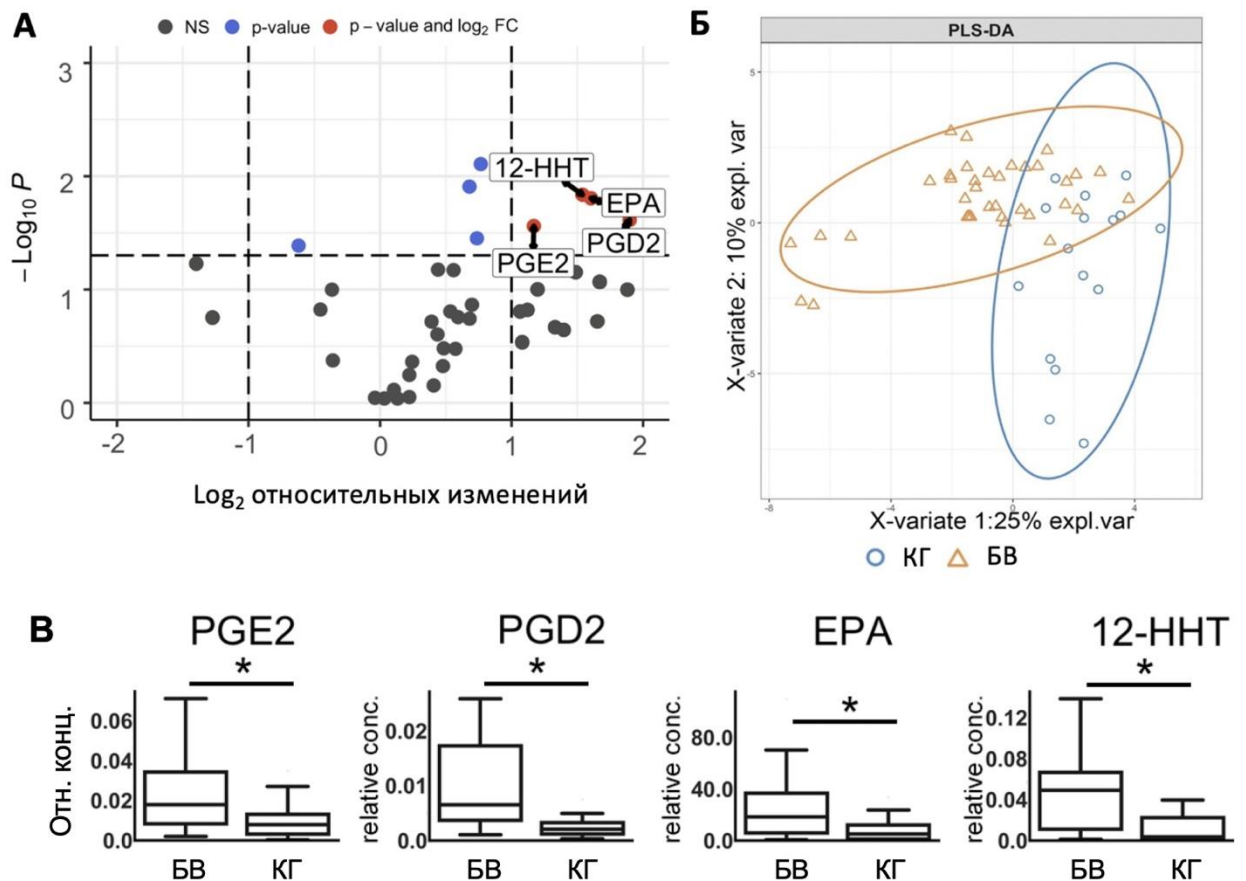


Рисунок 9. (А) Диаграмма, показывающая значительно изменившиеся соединения. Ось X указывает на изменение в \log_2 раза для пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВ) по сравнению с КГ (контрольной группой). Ось Y показывает $-\log_{10}$ p-значений (скорректированных). Отсечение для p-значений указано на основе поправки Бонферрони.

Соединения, которые изменились незначительно, обозначены серым цветом, соединения, чьи средние значения изменились в БВ (по сравнению с ГК) более чем в два раза или менее чем в два раза, но незначительно, обозначены зеленым цветом. Красными точками отмечены соединения, которые изменились более чем в два раза и имели р-значение (скорректированное < 0,05). (Б) Модель частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), различающая здоровый контроль (КГ) и пациентов с болезнью Вильсона (БВ). Объясненная дисперсия каждого компонента указана в скобках на соответствующей оси. (В) Относительные концентрации отдельных метаболитов, которые значительно изменились у пациентов с БВ по сравнению с ГК. Попарное сравнение скорректированных средних проводилось с учетом возраста и пола пациентов. * $p < 0,05$ (с поправкой на множественное тестирование) [25].

Таблица 10. Оценки важности переменных в прогнозе (VIP) для 7 метаболитов (в качестве отсекающего значения для выбора VIP установлено 1,5).

Соединение	12-ННТ*	ЕРА*	14,15-DHET	9-NODE	ОЕА	PGE2*	9-KODE
VIP	1,899456	1,741633	1,739218	1,62494	1,61702	1,59483	1,837164

Таким образом проведенный анализ выявил 8 соединений, отражающих разницу между БВ и КГ: 12-ННТ, ЕРА, 14,15-DHET, ОЕА, 9-NODE, 9-KODE, PGD₂, и PGE₂. Среди них была ПНЖК ЕРА; два метаболита LA, 9-NODE и 9-KODE, которые могут быть отнесены к LOX или неферментативным ветвям метаболизма; три метаболита AA (12-ННТ, PGD₂, PGE₂), отнесенные к ветви COX; и один метаболит AA из ветви метаболизма CYP (14,15-DHET). Хотя оксипирины обладают множественными эффектами, и одно и то же соединение может быть прослежено через различные процессы [2], следующие процессы могут быть охарактеризованы соответствующими

соединениями: окислительный стресс (9-HODE, 9-KODE, OEA, EPA), маркеры воспаления (9-HODE, 9-KODE, PGE₂, 12-HHT, PGD₂) и агонисты рецепторов пероксисомного пролифератора (PPAR) (9-HODE, 9-KODE, OEA, EPA, 14,15-DHET). Биологическая значимость этих соединений указывает на вовлеченность окислительного стресса, воспалительных процессов и сигнальных путей PPAR в данное заболевание. Полученные данные открывают новые возможные терапевтические мишени и стратегии вмешательства для лечения БВ [25].

3.3.2 Изменения профиля оксилипинов при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ)

На следующем этапе мы характеризовали изменение профиля оксилипинов во внутриглазной жидкости (ВГЖ) и слезной жидкости (СЖ) пациентов с ПОУГ. Основной целью данного исследования была оценка изменений в сигнальных липидах, секретируемых в ВГЖ пациентов с ПОУГ на разных стадиях заболевания и в условиях повышенного ВГД. Исследование было направлено на поиск корреляций между этими изменениями и имеющимися данными об экспрессии ферментов, ответственных за биосинтез выявленных липидов, тем самым прогнозируя сигнальные пути при глаукоме [139].

Глаукома является широко распространенным нейродегенеративным глазным заболеванием, которым страдают более 70 миллионов человек во всем мире. В большинстве случаев она характеризуется преходящим или устойчивым повышением ВГД, приводящим к апоптотической гибели ганглиозных клеток сетчатки, потере слоя нервных волокон сетчатки и экскавации головки зрительного нерва. На ранних стадиях заболевание часто протекает бессимптомно, поскольку дефекты поля зрения вначале

развиваются на его периферии. Однако прогрессирование оптической нейропатии при отсутствии соответствующего лечения может привести к ухудшению центрального зрения и слепоте [139,164] [165]. Существуют указания на участие оксипинолов в патогенезе глаукомы. Например, было обнаружено, что сывороточные уровни производных LA – HODE и производных AA – HETE повышены у пациентов с ПОУГ [166]. Ингибирование фермента COX-2, метаболизирующего AA, повышает выживаемость клеток сетчатки [167,168]. Известно, что ВГЖ контактирует со всеми тканями глаза, пораженными глаукомой, и его содержание может отражать биохимические изменения, связанные с этим заболеванием [169,170]. В то же время комплексный анализ связанных с ПОУГ изменений в сигнальных липидах ВГЖ ранее никогда не проводился.

В исследовании приняли участие в общей сложности 24 пациента с ПОУГ и 14 пациентов с катарактой без истории глаукомы, которые использовались в качестве контроля. Подробные демографические характеристики и сопутствующие заболевания участников представлены в Таблице 11[139].

Таблица 11. Характеристики КГ и группы ПОУГ.

Параметр	Контрольная группа	Стадии ПОУГ				Общая группа ПОУГ	
		IIA (≤21 мм рт. ст.)	IIВ (22–28 мм рт. ст.)	IIIВ (22–28 мм рт. ст.)	IIIС (≥29 мм рт. ст.)		
Количество пациентов	14	3	7	8	6	24	
Средний возраст ± станд.откл., года	65,64 ± 13,77	67,0 ± 2,65	68,86 ± 4,18	71,62 ± 6,8	63,33 ± 6,65	68,17 ± 9,35	
Пол, %	Ж	21,43	0,0	14,29	50,0	33,33	29,17
	М	78,57	100,0	85,71	50,0	66,67	70,83
ВГД ± станд.откл., мм рт. ст.	14,9 ± 1,8	17,7 ± 1,7	24,7 ± 2,1	25,5 ± 1,8	33,5 ± 3,4	26,3 ± 1,9	
Отношение чашки к диску	0,54 ± 0,12	0,73 ± 0,05	0,71 ± 0,04	0,84 ± 0,09	0,85 ± 0,06	0,79 ± 0,06	
Реф., %	Миопия	42,86	33,33	42,86	12,5	16,67	25,00
Сопутствующие заболевания, %	Артериальная гипертензия	42,86	66,67	42,86	50,0	50,0	50,00
	Ишемическая болезнь сердца	14,29	33,33	28,57	75,0	0	37,50
	Диабет	7,14	0	28,57	0	16,67	12,50

Лечение, %	Аналоги простагландинов	0	0	0	62,5	50,0	33,33
	β -блокаторы	0	100	57,14	37,5	33,33	37,50
	Ингибиторы карбоангидраз	0	100	71,43	50,0	66,67	54,16
	α -агонисты	0	0	42,86	12,5	33,33	25,00

Всего было идентифицировано 22 соединения (Таблица П2 Приложения). Пул ПНЖК состоял из EPA, DHA (омега-3 ПНЖК) и AA (омега-6 ПНЖК). Производные AA оксилипинов включали TXB₃, LTB₄, 20-карбоксит- LTB₄, 19-НЕТЕ и 20-НЕТЕ, а также неразделимую смесь простагландинов PGA₂ и PGJ₂. Второй большой набор оксилипинов был представлен производными LA, а именно 9-HODE/13-HODE, 9-KODE/13-KODE, 9,10-ЕрОМЕ/12,13-ЕрОМЕ и 9,10-DiНОМЕ/12,13-DiНОМЕ кислотами. Кроме того, мы обнаружили производные α -линоленовой кислоты (ALA) – 9-НОТрЕ и 13-НОТрЕ и два производных фосфолипидов – ОЕА и Lyso-PAF (Таблица П2 Приложения).

3.3.2.1 Изменения в содержании оксилипинов во внутриглазной жидкости (ВГЖ), связанные с ПОУГ

Для выявления липидов ВГЖ, различающих общую группу ПОУГ и контрольную группу, мы сначала провели попарные сравнения концентрации каждого из выявленных соединений с поправкой на возраст и пол, используя ANCOVA (Рисунок 10). Как видно из полученного графика вулканов с поправкой Хольма-Бонферрони, разницу между группами обеспечивали только два LA-производных оксилипинов: 12,13-DiНОМЕ и 13-KODE (Рисунок 10А), которые продемонстрировали значительное увеличение при глаукоме (Рисунок 10Б). оценки с помощью PLS-DA выявили те же оксилипины 12,13-DiНОМЕ и 13-KODE, дополненные фосфолипидным

производным Lyso-PAF, который также был повышен при ПОУГ (Рисунок 10В, Г) [139].

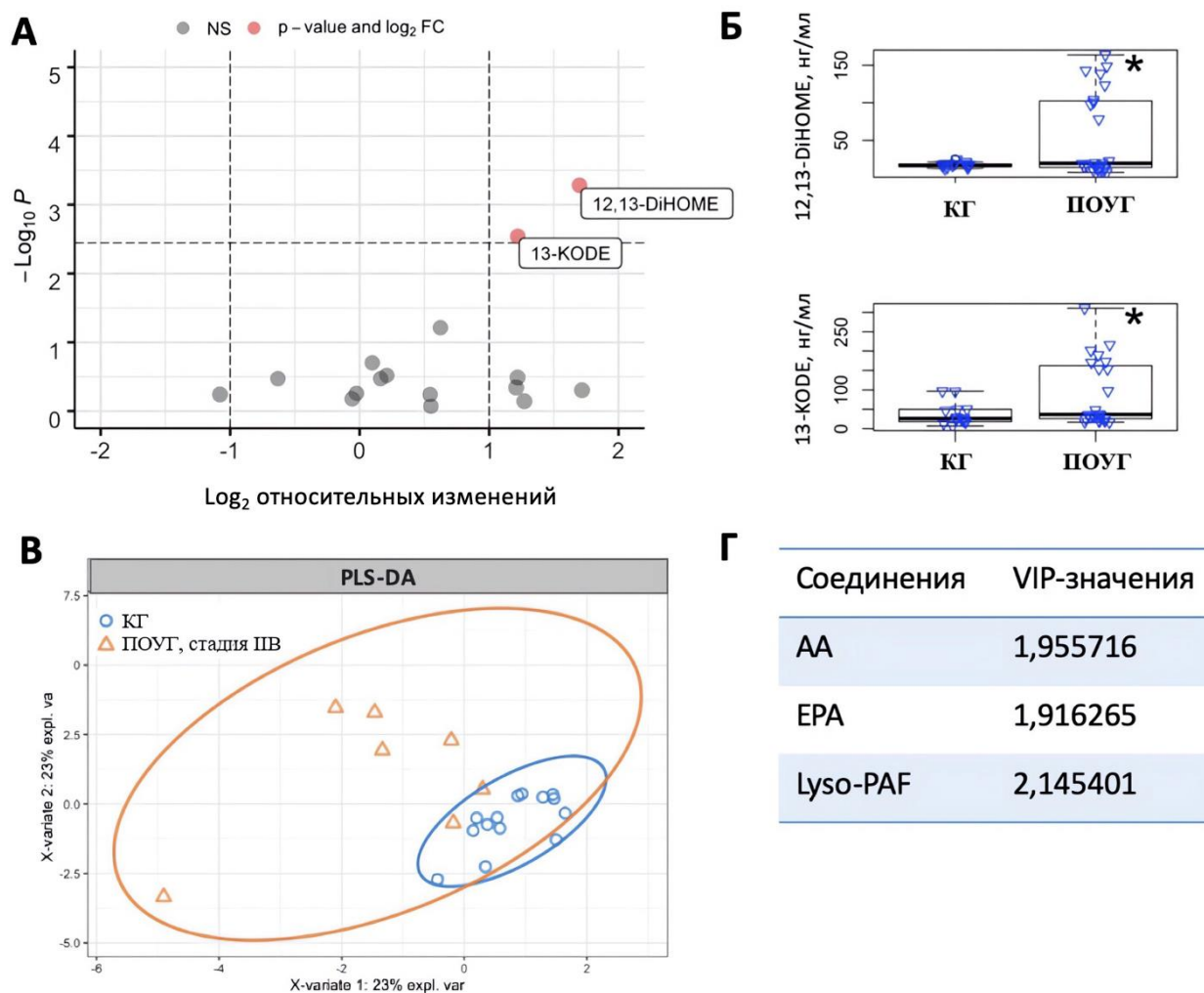


Рисунок 10. Сравнение профилей оксипинов у пациентов с ПОУГ и КГ. (А) Красным цветом выделены соединения, которые изменились более чем в два раза, $p < 0,05$, с поправкой на множественное тестирование. (Б) Отображение изменившихся соединений приведенное в нг/мл, $*p < 0,05$. (В) Результаты PLS-DA, показывающие соединения, отличающие ПОУГ ПВ стадии от КГ, (Г) отображение VIP-значений после применения PLS-DA анализа.

3.3.2.2 Изменения в содержании оксипинов в слезной жидкости (СЖ), связанные с ПОУГ

Поскольку СЖ часто рассматривается как источник биомаркеров различных глазных заболеваний, мы использовали описанные выше подходы для анализа ассоциированных с ПОУГ изменений в СЖ, собранных у тех же пациентов и в контрольной группе. Целевой анализ СЖ позволил идентифицировать и количественно оценить 22 соединения, представляющих тот же набор, что и в случае с ВГЖ (Таблица ПЗ Приложения). Более того, разница между всеми группами ПОУГ и контролем в липидоме ТФ была обеспечена в основном теми же сигнальными липидами, а именно 12,13-DiHOME, 9- и 13-HODE/KODE, AA и Lyso-PAF (Рисунок 11). Как и в случае с ВГЖ, в глаукоматозной СЖ наблюдалось снижение уровня HODE (предшественника) и увеличение уровня KODE (продукта) [139].

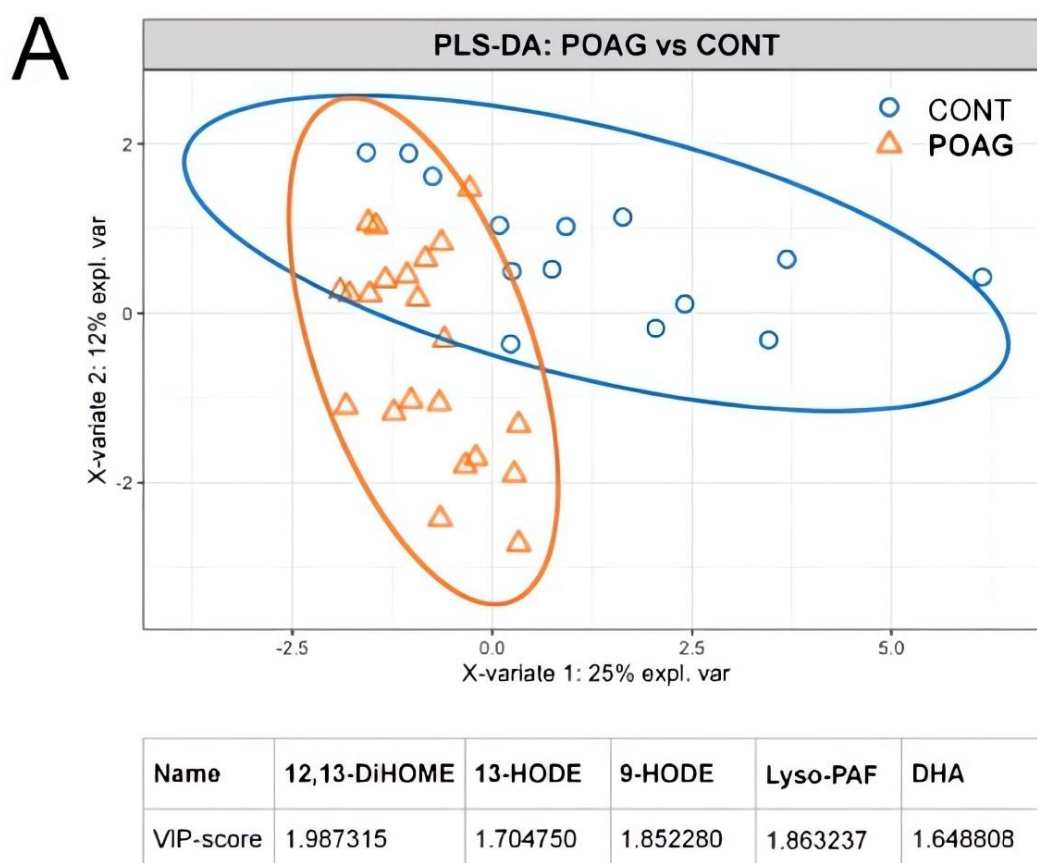


Рисунок 11. Общие изменения в содержании сигнальных липидов в СЖ пациентов с ПОУГ. Результаты частичного дискриминантного анализа по методу наименьших квадратов (PLS-DA), выявляющего соединения СЖ, отличающие пациентов с глаукомой (А) от КГ. На осях указана объясненная

дисперсия каждого компонента (учитываются VIP-значения, превышающие значение отсечения 1,5).

Таким образом данное исследование является первым, в котором целенаправленно рассматриваются изменения в сигнальном липидоме ВГЖ у пациентов с ПОУГ. Предыдущие работы на эту тему были сосредоточены в основном на общем содержании фосфолипидов и сфинголипидов, в то время как паттерны сигнальных липидов (т.е. оксилипинов) в глаукоматозной ВГЖ оставались неясными [170]. В данном исследовании мы идентифицировали в общей сложности 22 липидных медиатора, среди которых было три ПНЖК, 17 оксилипинов и два производных фосфолипидов. Интересно, что мы продемонстрировали наличие выраженных специфических изменений в сигнальных липидах ВГЖ, которые можно отнести к патогенезу ПОУГ.

Производное LA, оксилипин 12,13-DiHOME, можно считать наиболее значимым биомаркером ПОУГ, поскольку он наиболее часто встречался в нашем анализе как соединение, обеспечивающее разницу между КГ и ПОУГ как для ВГЖ, так и для СЖ. Он принадлежит к недавно выявленному классу липидов, называемых липокинами, которые действуют как сигнальные молекулы, модулирующие системный метаболизм. 12,13-DiHOME повышается в ответ на воздействие холода или физическую нагрузку, и его действие связано с улучшением метаболизма, таким как повышенное окисление и поглощение жирных кислот [55]. Общий путь биосинтеза 12,13-DiHOME включает два этапа: окисление LA под действием CYPs с образованием эпоксидного производного 12,13-EpOME и его последующее дигидроксилирование, катализируемое EH-1 или EH-2 [55]. Несмотря на то, что 12,13-DiHOME никогда не был связан с глаукомой, существующие транскриптомные и протеомные данные об изменениях в глазных тканях, связанных с ПОУГ, в целом подтверждают повышенную продукцию и секрецию этого оксилипина в ВГЖ и СЖ [139].

В целом, увеличение содержания повышающих ВГД и цитотоксических медиаторов PAF и 12,13-DiHOME, а также оксилипинов HODEs/KODEs,

связанных с окислительным стрессом, представляют собой часть патофизиологической картины ПОУГ, проявляющейся в сигнальном липидоме ВГЖ. Тем не менее, точные механизмы, опосредованные идентифицированными сигнальными липидами при глаукоме, а также подходы к управлению этими механизмами еще предстоит определить.

3.3.3 Изучение профиля оксипинолов в животной модели повреждения роговицы

Одним из распространенных подходов для разработки новых методов терапии заболеваний является изучение их патогенеза на основании животных моделей. Повреждение роговицы (ПР) является распространенной патологией, ее причиной могут стать разнообразные воздействия от непосредственной травмы глаза до изменения ее клеточной структуры при контакте с нагретым предметом или воздухом и др. К сожалению, применение распространенных глазных противовоспалительных препаратов, таких как кортикостероидные глазные капли или циклоспорин, связано с рядом побочных эффектов у пациентов с повреждением роговицы, что, как правило, ограничивает их применение [164]. Таким образом, существует большая потребность в новой безопасной и эффективной противовоспалительной терапии для заболеваний, имеющих компонентом ПР [157].

В качестве терапевтического агента нами был предложен оригинальный подход с использованием глазных капель, содержащих диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО был выбран, поскольку он обладает низкой токсичностью [171], высокой тканевой проницаемостью и облегчает проникновение других соединений через биологические мембраны [172]. Использование до 50% ДМСО было признано не вызывающим никаких побочных реакций при местном введении в глаза [171]. Мы остановились на рецептуре полных

глазных капель, состоящей из нормального физиологического раствора, содержащего 50% ДМСО. Согласно результатам клинического осмотра, проведенного опытным ветеринаром (соавтором данного исследования), данная дозировка хорошо переносилась как здоровыми кроликами, так и животными с ПР [157].

С помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа образцов слезной жидкости выявили в общей сложности 23 липидных медиатора, включая три ПНЖК (АА, ДНА и ЕРА), 18 оксилипинов и три производных фосфолипидов (ОЕА, АЕА, Lyso-PAF). Выявленные оксилипины были отнесены к пяти подгруппам, а именно: циклооксигеназа (COX)-зависимые производные АА (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, TXB₂), цитохром р450 (CYP)-зависимые производные LA (9,10-DiHOME/9,10-EpOME и 12,13-DiHOME/12,13-EpOME), а также липоксигеназа (LOX)-зависимые производные АА (5-НЕТЕ, 12-НЕТЕ и LTB₄), LA (9-NODE/9-KODE и 13-NODE/13-KODE) и ALA (9-HOTrE, 13-HOTrE). Обнаруженные липидные медиаторы демонстрировали различное поведение при ССГ. Так, наиболее длительное изменение содержания СЖ наблюдалось для АА и его COX-зависимых (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) и LOX-зависимых (LTB₄, 5-НЕТЕ, 12-НЕТЕ) продуктов, большинство из которых демонстрировали устойчивый рост до седьмого дня после анестезии (Рисунок 12). Значительное увеличение LTB₄ сопровождалось увеличением и последующим снижением содержания в СЖ его предшественника 5-НЕТЕ (Рисунок 12). В свою очередь, LOX/окислительный стресс-зависимые производные LA (9-NODE/9-KODE и 13-NODE/13-KODE), LOX-зависимые производные ALA (9-HOTrE, 13-HOTrE), CYP-производные LA (9,10-EpOME и 12,13-EpOME), а также фосфолипидное производное АЕА продемонстрировали краткосрочное увеличение в первый день, что указывает на критическую важность этой временной точки как пика окислительного и воспалительного ответа (Рисунок 13). Наконец, значительных изменений, зависящих от ПР, не наблюдалось в случае ДНА и ЕРА, а также ОЕА и Lyso-PAF (Рисунок 12, 13) [157].

Лечение ДМСО предотвращало увеличение содержания производных АА, простагландинов (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, TXB₂) и LTB₄, в то время как содержание 5-НЕТЕ и 12-НЕТЕ изменялось в значительно меньшей степени (Рисунок 12). Кроме того, терапия подавляла кратковременное повышение содержания LOX/окислительного стресса-зависимых LOX-зависимых производных АЛА (9-НОТгЕ, 13-НОТгЕ) (Рисунок 13). Таким образом, терапия с использованием ДМСО заметно улучшила состояние роговицы при ПР за счет ослабления оксипин-опосредованных воспалительных реакций, не влияя на скорость слезопродукции.

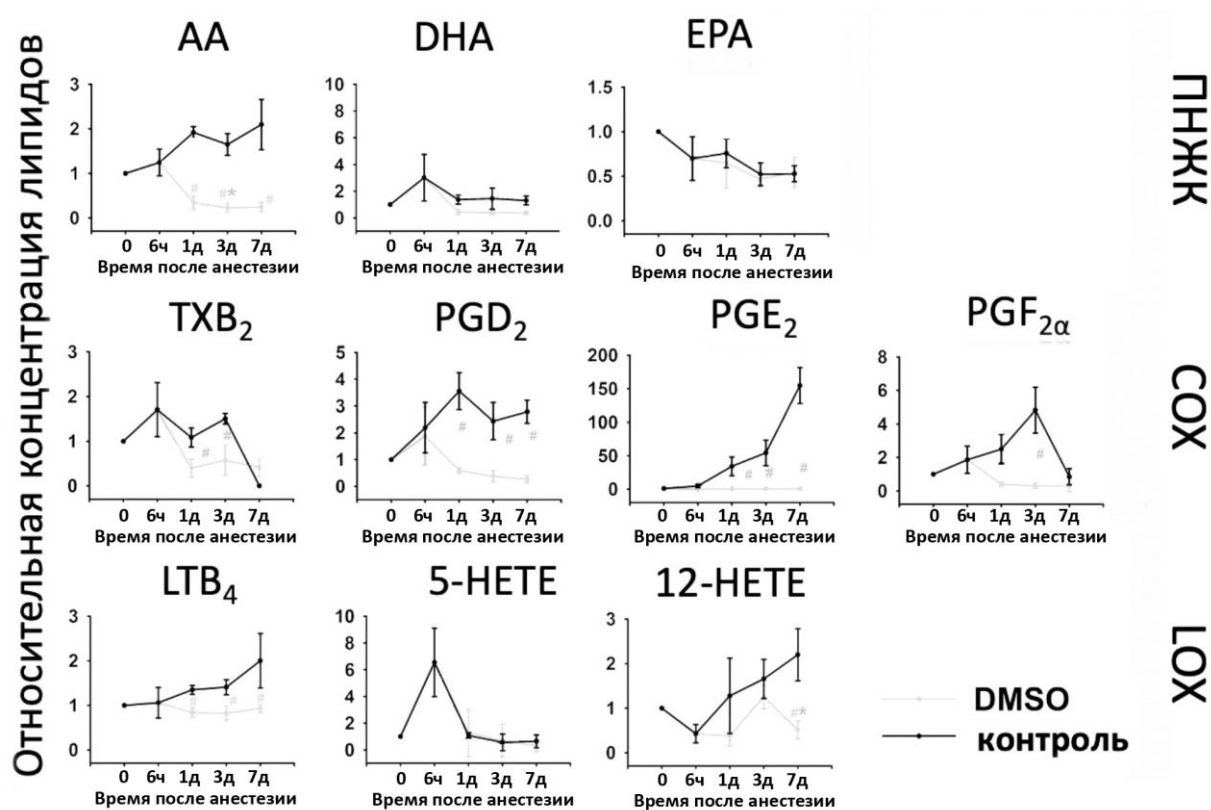


Рисунок 12. Динамические изменения содержания ПНЖК и производных АА в СЖ при ПР на фоне противовоспалительной терапии. # $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией оксипинов в СЖ животных без лечения (черная линия). * $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией оксипинов в СЖ животных из группы ДМСО (серая линия).

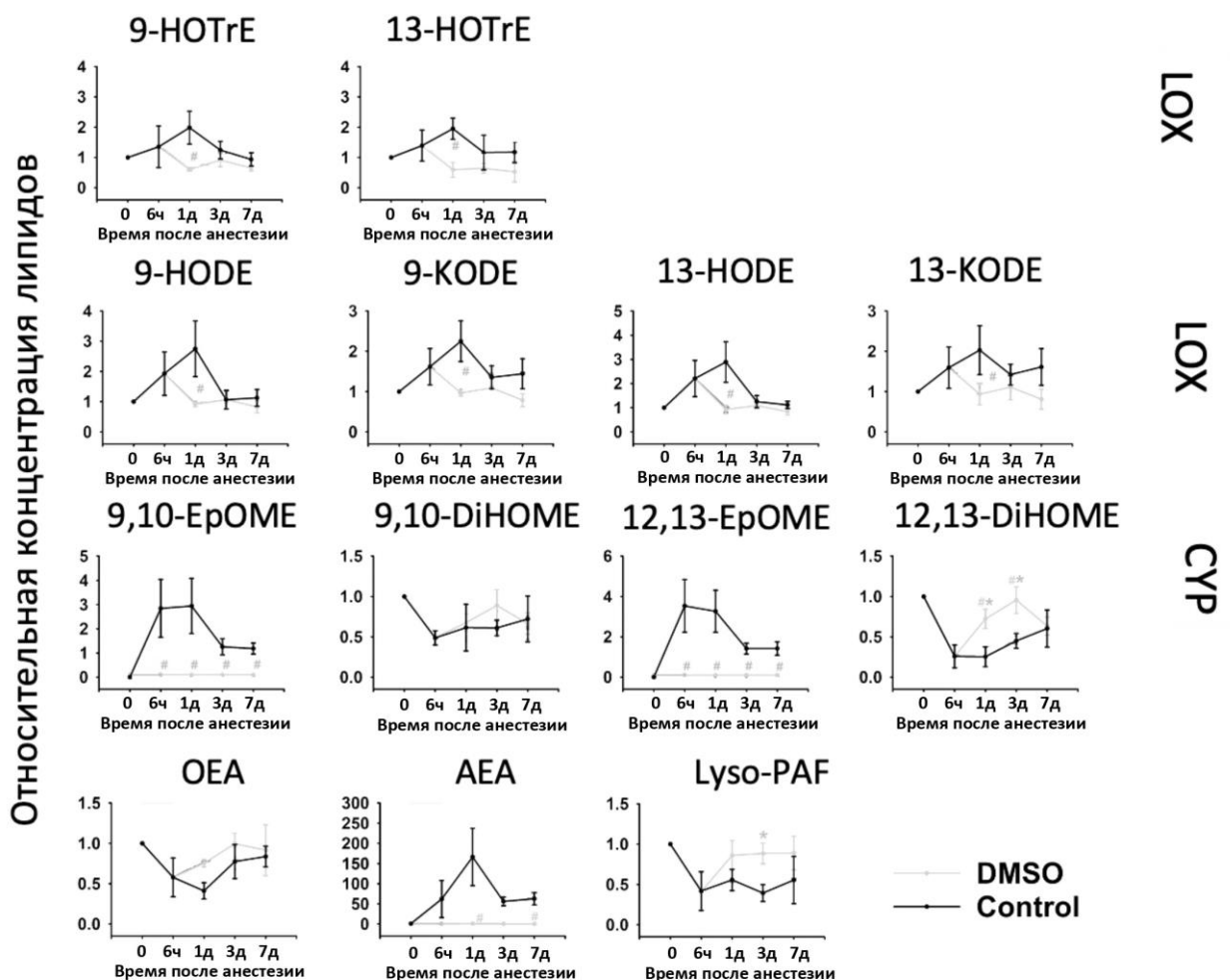


Рисунок 13. Динамические изменения содержания производных LA и ALA в СЖ при ПР на фоне противовоспалительной терапии; # $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией оксилипинов в СЖ животных без лечения (черная линия). * $p < 0,05$ по сравнению с концентрацией оксилипинов в СЖ животных из группы ДМСО (серая линия).

3.3.4 Изучение профиля оксилипинов в животной модели светоиндуцируемого повреждения сетчатки

На следующем этапе мы оценили, как профиль оксилипинов меняется при воспалении, связанном со светоиндуцируемой дегенерацией сетчатки

(LIRD), используя кроликов в качестве модельных животных. Группы животных и модель описаны в разделе 2.3.3 «Материалы и методы».

С помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа выявили в общей сложности 17 липидных соединений (Рисунок 14, 15, черная линия), включая три ПНЖК (АА, ДНА и ЕРА), два производных фосфолипидов (ОЕА и Lyso-PAF) и двенадцать оксилипинов. Последние включали четыре производных АА (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ и LTB_4) (Рисунок 14, черная линия) и восемь производных LA (9-HODE/13-HODE), 9-KODE/13-KODE, 9,10-EpOME/12,13-EpOME и 9,10-DiHOME/12,13-DiHOME (Рисунок 15, черная линия). В нашей модели LIRD мы выявили кратковременное увеличение содержания АА, ДНА и снижение уровня ЕРА во время освещения (Рисунок 14, 15, серое поле). Кроме того, мы обнаружили более длительное увеличение концентрации Lyso-PAF. Эти краткосрочные реакции (за исключением ЕРА) в основном разрешились в течение следующих 1-3 дней (Рисунок 14, 15, черная линия). Примечательно, что в динамике содержания оксилипинов при развитии LIRD наблюдались явные тенденции. Наиболее выраженные изменения были обнаружены в простагландинах PGE_2 , PGD_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$, демонстрируя долгосрочное увеличение, которое, в случае $\text{PGF}_{2\alpha}$, не разрешилось даже на седьмой день после облучения (Рисунок 14, черная линия). Напротив, почти все производные LA демонстрировали короткий всплеск во время светового воздействия, и их концентрация восстанавливалась в течение одного дня. Примечательно, что в то время, как простагландины биосинтезируются в основном через СОХ-зависимый путь, обнаруженные производные LA могут генерироваться не только ферментативными (LOX- и СУР-зависимыми), но и с помощью неферментативных механизмов с участием активных форм кислорода (Рисунок 15, черная линия). Таким образом, можно ожидать, что LIRD-ассоциированное воспаление может реагировать на лечение с использованием ингибиторов СОХ (НПВП) и антиоксидантов [158].

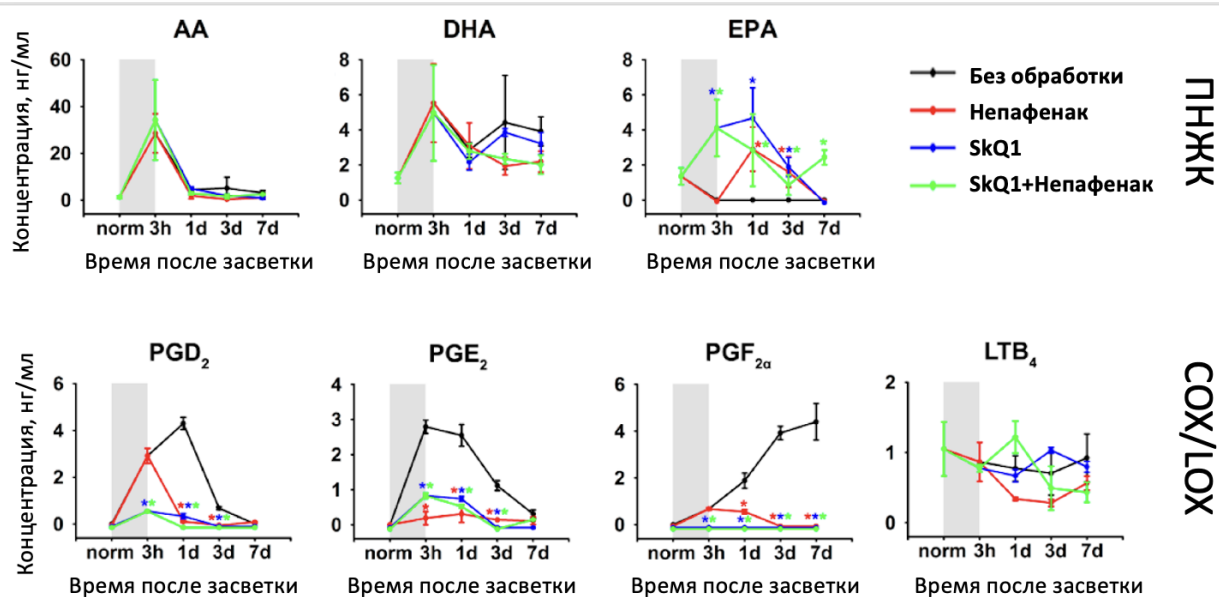


Рисунок 14. Динамические изменения содержания ПНЖК и производных АА в условиях LIRD без лечения (черный), на фоне лечения непафенаком (красный), после премедикации SkQ₁ (синий) и на фоне терапии комбинацией двух препаратов (зеленый). Глаза животных освещали интенсивным видимым светом (30000 лк) в течение 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 не леченных облученных животных.

На основании полученных значений изменения профиля оксипинов и ПНЖК была предложена терапия с использованием вещества непафенак (ингибитор СОХ) и антиоксиданта SkQ₁. Непафенак ожидаемо снизил уровень всех оксипинов (PG), генерируемых через СОХ путь биосинтеза, начиная с самого начала лечения (первый день после освещения) (Рисунок 14, красная линия). В то же время премедикация препаратом SkQ₁ оказывала сопоставимое подавляющее действие на эти оксипины (Рисунок 14, синяя линия), хотя комбинированная терапия была несколько более эффективной (Рисунок 14, зеленая линия). В отличие от этого, на концентрацию ВГЖ оксипинов, полученных из LA, влияла только премедикация антиоксидантами, а подавляющий эффект комбинированной терапии, по-

видимому, обеспечивался исключительно SkQ₁ (Рисунок 15, синяя линия). Интересно, что ни на одну из секретируемых ПНЖК не влиял ни один из видов лечения. В то же время, непафенак заметно сильнее чем SkQ₁ снижал уровень Lyso-PAF (Рисунок 15, красная линия) [158].

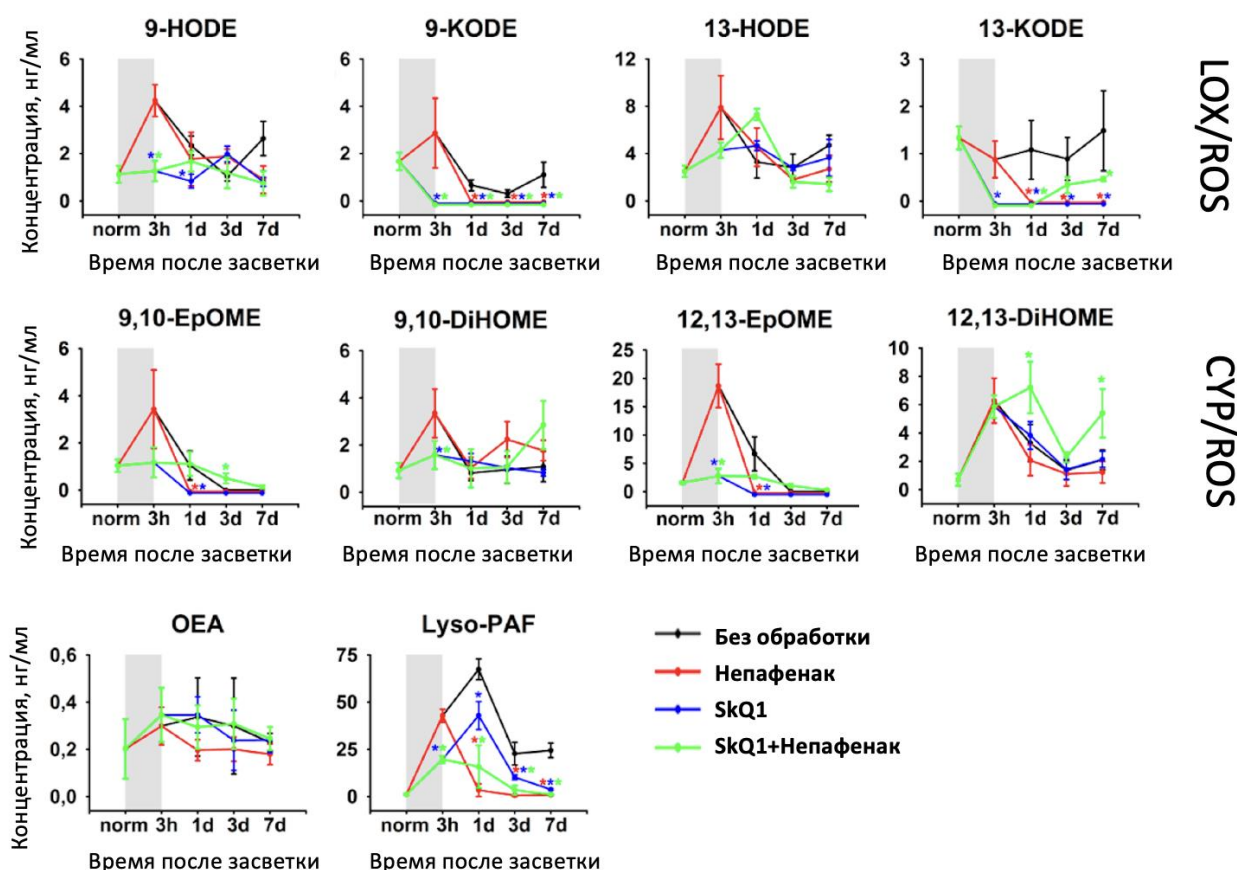


Рисунок 15. Динамические изменения содержания производных линолевой кислоты в условиях LIRD без лечения (черный), на фоне лечения непафенаком (красный), после премедикации SkQ₁ (синий) и на фоне терапии комбинацией двух препаратов (зеленый). Глаза животных освещали интенсивным видимым светом (30000 лк) 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.

В целом, наши данные подтверждают, что светоиндуцируемая дегенерация сетчатки сопровождается окислительным стрессом, а также

воспалением, в основном связанным с COX-зависимыми сигнальными путями, чувствительным к действию НПВП непафенак. Оба механизма могут быть подавлены препаратом SkQ₁, оказывающим не только антиоксидантное, но и противовоспалительное действие и, следовательно, надежно защищающим структуру и электрофизиологическую активность сетчатки. Непафенак обладает специфическим противовоспалительным действием и, следовательно, дополняет защиту SkQ₁. Эти результаты дают основание для включения комбинации обоих препаратов в терапию воспаления, вызванного LIRD [158].

3.3.5 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 [173]. В работе мы применили подход измерения профиля производных ПНЖК (оксилипинов) для оценки противовоспалительных эффектов шести лигандов для трех рецепторов активации пролиферации пероксисом (PPAR), в модели LPS-стимулированного клеточного ответа в первичных астроцитах крыс. Астроциты подвергали воздействию LPS отдельно или в комбинации с лигандами PPAR: PPAR α (фенофибрат, GW6471); PPAR β (GW501516, GSK0660); PPAR γ (росиглитазон, GW9662). Структуры лигандов PPAR представлены на Рисунок 16.

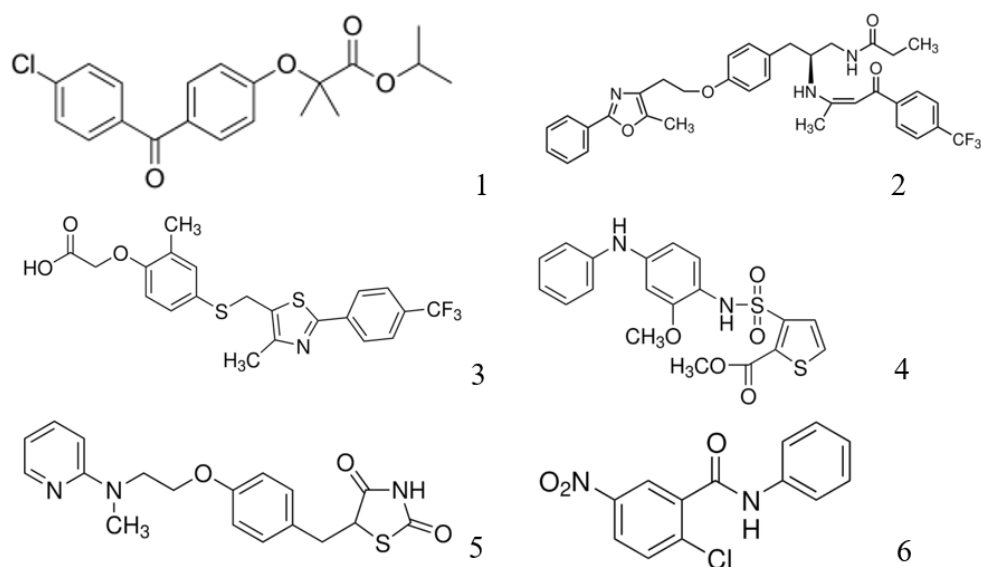


Рисунок 16. Структурные формулы агонистов и антагонистов лигандов PPAR α : 1 – фенофибрат, 2- GW6471, PPAR β : 3 - GW501516, 4 – GSK0660 и PPAR γ : 5 – росиглитазон, 6 - GW9662.

3.3.5.1 Сравнение лигандов PPAR α : агонист фенофибрат (Fen), антагонист GW6471 (GW6)

Проведенный анализ позволил обнаружить 28 соединений, которые были классифицированы в соответствии с их метаболическими путями: циклооксигеназа (COX), монооксигеназы цитохрома P450 (CYP) и липоксигеназа (LOX); также были определены ПНЖК: АА, DHA, EPA. Данные представлены в виде тепловой карты, где по вертикальной оси указаны стимулы, а по горизонтальной - относительное количество каждого липидного медиатора (Рисунок 17А) (количественные данные представлены на Рисунок П4 Приложения).

Агонист PPAR α фенофибрат снижает стимулированный LPS синтез метаболизированных COX-производных соединений: 12-ННТ, PGD $_2$, PGA $_2$ +PGJ $_2$, TXB $_2$, 13-НДоНЕ. Фенофибрат также увеличивает

высвобождение внеклеточной АА. Антагонист PPAR α GW6471 обладает собственной активностью через ингибирование CYP-метаболизируемых веществ (14,15-DHET, 20-HDoHE). GW6471 не модулирует COX-метаболизированные производные или высвобождение АА (Рисунок 17) [173].

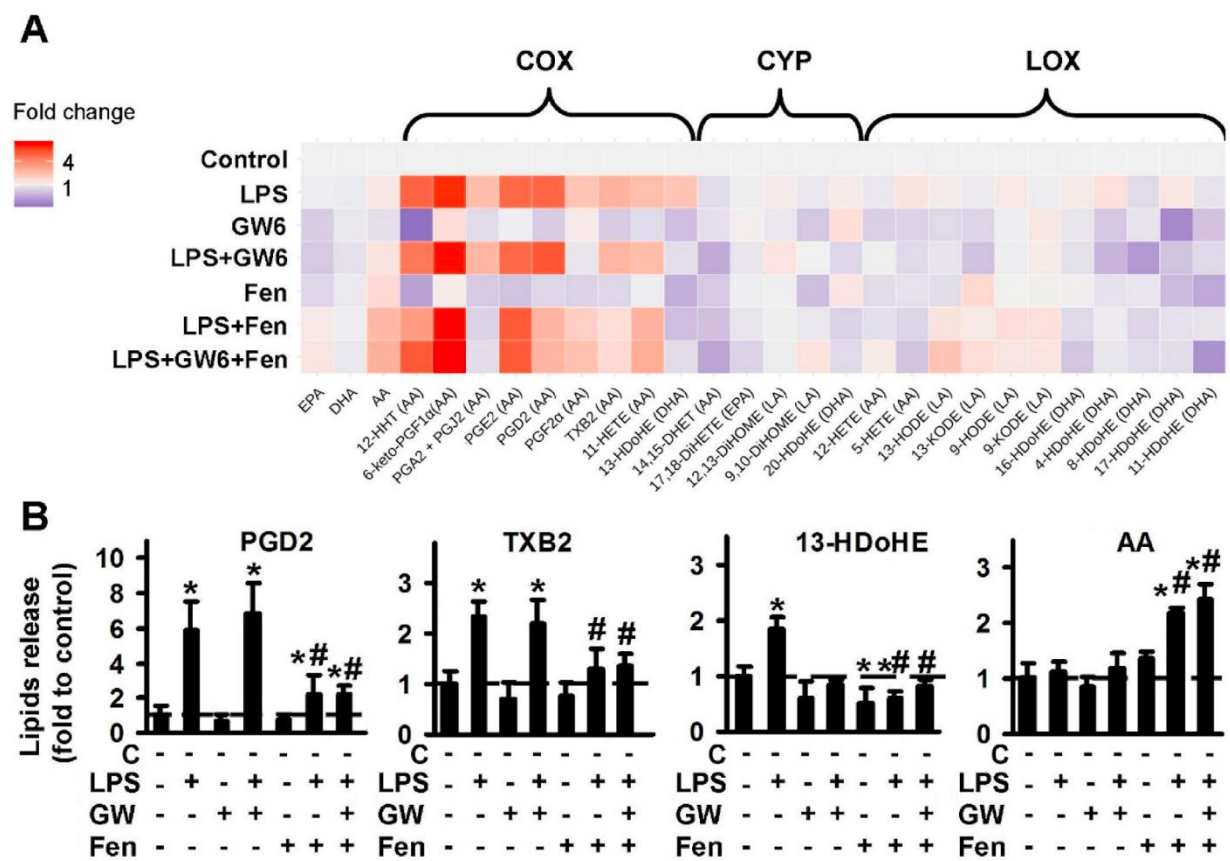


Рисунок 17. Влияние агонистов ядерных рецепторов PPAR α на профиль оксилипинов при стимуляции первичных астроцитов LPS. Исследовалось влияние следующих соединений - агонист PPAR α фенофибрат (Фен, 50 мкМ) и антагонист GW6471 (GW6, 5 мкМ), на высвобождение оксилипинов в астроцитах, стимулированных LPS (100 нг/мл). 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 при стимуляции клеток лигандами PPAR α . Значения представляют собой среднее \pm SD из трех

независимых экспериментов. $*p < 0.05$, по сравнению с нестимулированными клетками, $\#p < 0.05$, по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Примечательно, что в лечении, где оба лиганда PPAR α были добавлены одновременно, отсутствует действие классических пар агонист-антагонист (Рисунок 17В, Рисунок 4 Приложения). Хотя можно предположить, что фенофибрат является противовоспалительным модулятором благодаря своей активности, как ингибитора LPS-опосредованного синтеза PG, эффект, похоже, не был реализован через PPAR α , так как антагонист GW6471 не отменял его.

3.3.5.2 Сравнение лигандов PPAR β : агонист GW501516 (GW5), антагонист и обратный агонист GSK0660 (GSK)

В ходе исследования участия PPAR β в LPS-опосредованном синтезе оксилипинов в астроцитах мы использовали агонист GW501516 и вещество GSK0660, которое обычно используется как антагонист PPAR β , но также считается обратным агонистом PPAR β [174]. Данные представлены в виде тепловой карты (Рисунок 18А). Количественные данные представлены на Рисунок П4 Приложения. Оба лиганда PPAR β ингибируют LPS-стимулированный синтез оксилипинов через путь COX, причем GSK0660 является более сильным ингибитором, чем GW501516, в зависимости от используемых концентраций (Рисунок 18А). Ингибируются: 12-ННТ; 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, PGA $_2$ +PGJ $_2$, PGE $_2$, PGD $_2$, PGF $_{2\alpha}$, TXB $_2$, 11-НЕТЕ, 13-НДоНЕ. Примечательно, что добавление GSK0660 увеличивает синтез 13-НДоНЕ, 12-ННТ и PGF $_{2\alpha}$, что может свидетельствовать о синтезе этих веществ через другие метаболические пути [175–177]. Такая модуляция также позволяет рассматривать лиганд PPAR β , GSK0660, как обратный агонист, а не антагонист, в нашей испытанной модели. Помимо COX-пути, агонист PPAR β ,

GW501516, снижает уровень LPS-опосредованных оксилипинов, приписываемых LOX-метаболизированному пути: 5-НЕТЕ, 8-НДоНЕ, и значительно увеличивает синтез 4-НДоНЕ, 11-НДоНЕ, 17-НДоНЕ (Рисунок 18Б). Последние три вещества считаются важными “веществами разрешения” воспаления [178,179], в то время как 5-НЕТЕ и 8-НДоНЕ обладают провоспалительными свойствами [54]. Следует отметить, что 4-НДоНЕ, 8-НДоНЕ, 11-НДоНЕ, 13-НДоНЕ и 17-НДоНЕ являются производными ДНА, в то время как оба протестированных лиганда PPAR β не влияют на концентрацию внеклеточных ПНЖК (ДНА, АА, ЕРА) (Рисунок 4 Приложения). В целом, полученные данные показывают, что оба протестированных лиганда PPAR β способны снижать LPS-опосредованный синтез простагландинов; среди них агонист GW501516 является сильным индуктором прорезорбтивных веществ [173].

3.3.5.3 Сравнение лигандов PPAR γ : агонист розиглитазон (RG) и антагонист GW9662 (GW9)

Для исследования участия PPAR γ в синтезе оксилипина в астроцитах мы использовали агонист розиглитазон и классический антагонист GW9662 [180]. Данные представлены в виде тепловой карты (Рисунок 19А). Количественные данные представлены в Рисунок 4 Приложения. Оба лиганда PPAR γ демонстрируют влияние на синтез оксилипина в нативных астроцитах. Розиглитазон увеличивает LPS-стимулированный синтез оксилипинов из АА через СОХ-путь. Этот эффект антагонизировался GW9662 (Рисунок 19В, Рисунок 4 Приложения). Розиглитазон также увеличивает концентрацию внеклеточных ПНЖК, АА и ЕРА, но не ДНА, как в нативных, так и в LPS-стимулированных клетках (Рисунок 19В). Этот эффект не отменяется GW9662

Одновременное добавление обоих лигандов PPAR γ увеличивает опосредованный LPS синтез 5-HETE и 4-HDoHE (Рисунок 4 Приложения) [173].

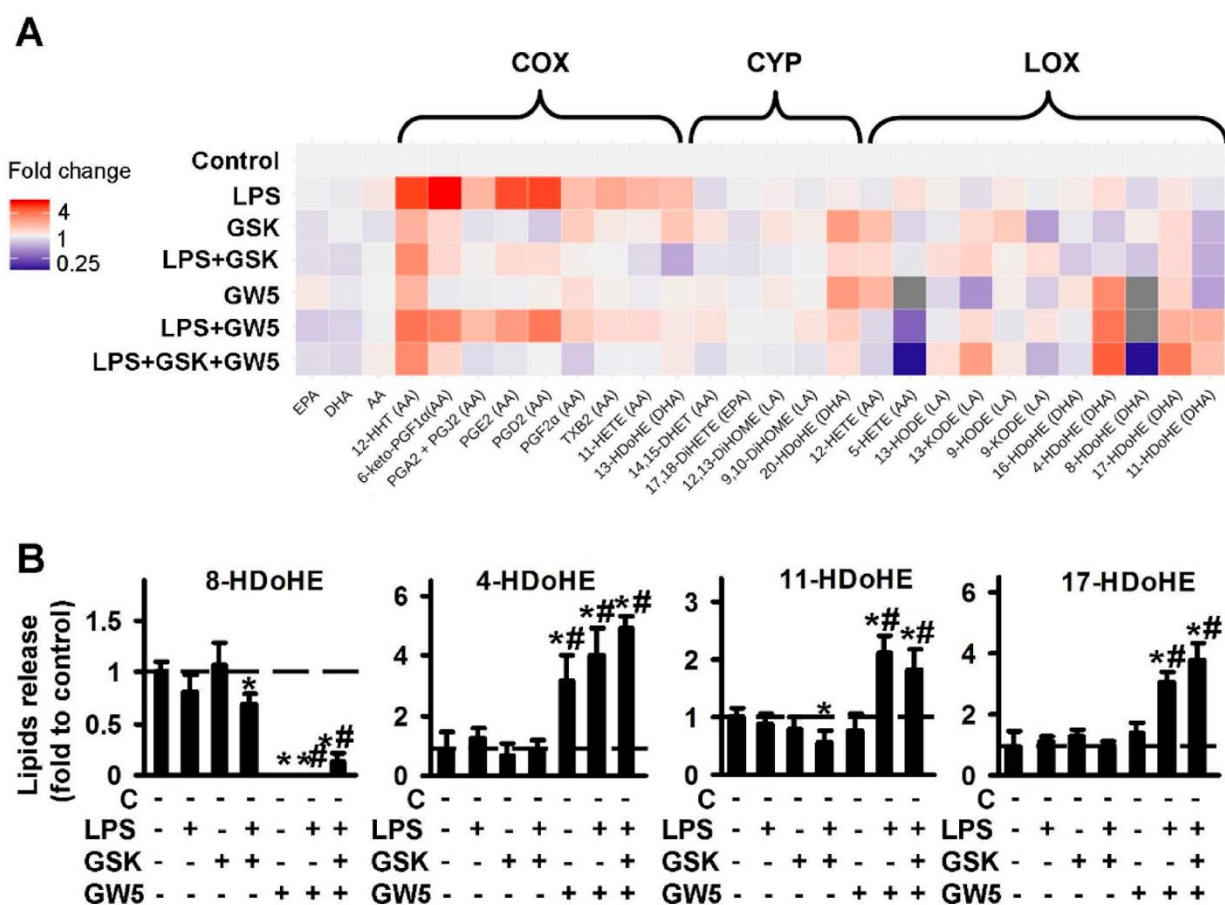


Рисунок 18. Влияние агонистов ядерных рецепторов PPAR β на профиль оксилипинов при стимуляции первичных астроцитов LPS. Исследовалось влияние следующих соединений - агонист агонист PPAR β GW501516 (GW5, 25 мкМ) и антагонист GSK0660 (GSK, 5мкМ) на высвобождение оксилипинов в астроцитах, стимулированных LPS (100 нг/мл). 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. (A) – Тепловая карта иллюстрирует изменение концентраций при обработке клеток исследуемыми соединениями по отдельности или в комбинации. (B) – относительное изменение концентрации ДНА-производных при стимуляции клеток лигандами PPAR β . Значения представляют собой среднее \pm SD из трех независимых экспериментов. * $p < 0.05$, по сравнению с

нестимулированными клетками, # $p < 0.05$, по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

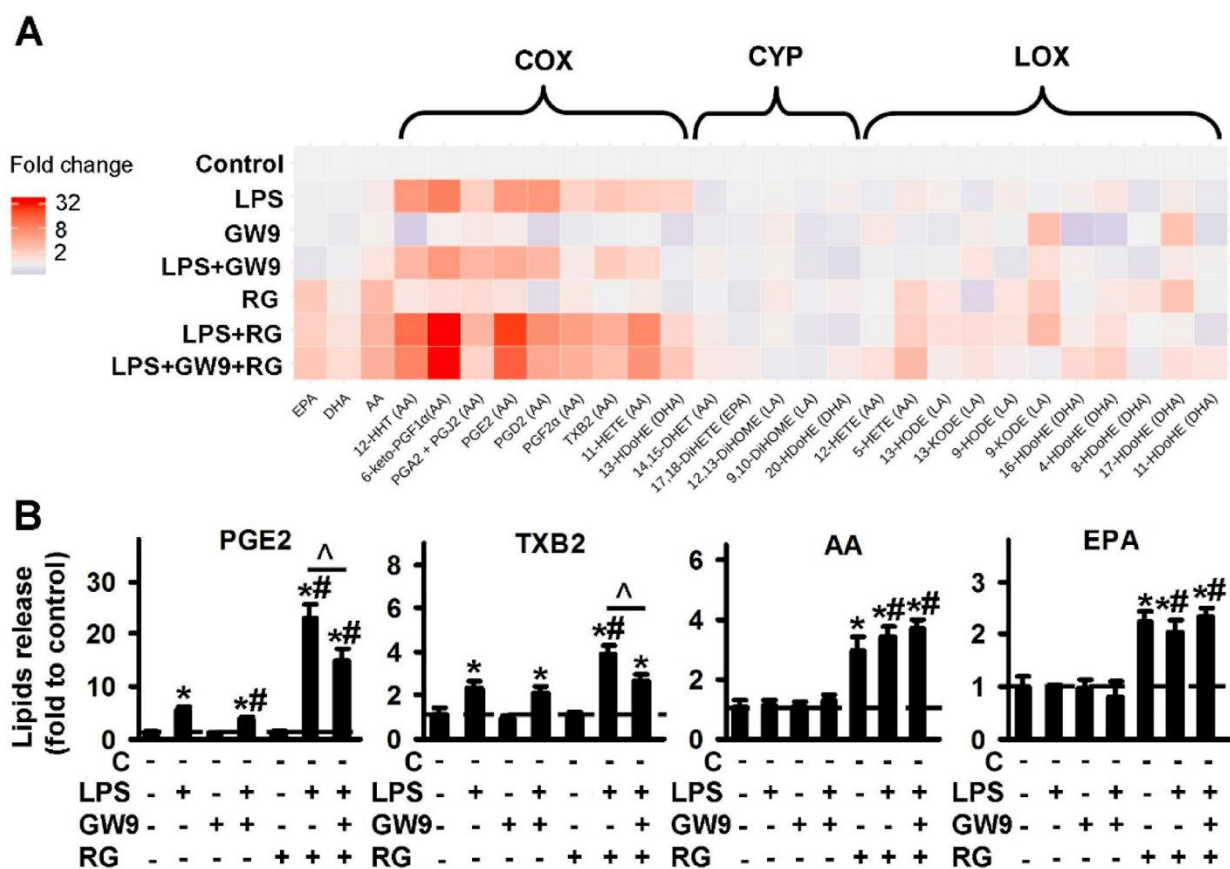


Рисунок 19. Влияние агонистов ядерных рецепторов PPAR γ на профиль оксилипинов при стимуляции первичных астроцитов LPS. Исследовалось влияние следующих соединений - агонист агонист PPAR γ росиглитазон (RG, 20 мкМ) и GW9662 (GW9, 5мкМ) на высвобождение оксилипинов в астроцитах, стимулированных LPS (100 нг/мл). 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 оксилипинов при стимуляции клеток лигандами PPAR γ . Значения представляют собой среднее \pm SD из трех независимых экспериментов. * $p < 0.05$, по сравнению с

нестимулированными клетками, #p<0.05, по сравнению с LPS-стимулированными клетками.

Таким образом все протестированные вещества, кроме росиглитазона, могут быть определены как противовоспалительные, поскольку они ингибируют LPS-опосредованный синтез оксилипинов через пути COX. В порядке убывания активности вещества можно расположить следующим образом: GSK0660 (антагонист PPAR β) > GW501516 (агонист PPAR β) > GW9662 (антагонист PPAR γ) >> фенофибрат (агонист PPAR α) > GW6471 (антагонист PPAR α). Более того, агонист PPAR β , GW501516, увеличивал синтез 4-HDoHE, 11-HDoHE и 17-HDoHE, производных DHA, что указывает на то, что они являются веществами, способствующими разрешению воспаления [178,179]. Мы показали, что, используя различные лиганды PPARs, можно манипулировать метаболизмом оксилипинов. Хотя в настоящее время трудно предсказать эффект таких манипуляций, важно отметить, что многие оксилипины высвобождаются в низких концентрациях, их эффекты могут быть суммированы, из этого следует, что нейропротекторные свойства следует тестировать не для отдельных оксилипинов, а для их смесей [173]. Тем не менее, согласно существующим взглядам на роль простагландинов, именно лиганд PPAR β , GW501516, можно считать более успешным модулятором воспалительных процессов на астроцитах, в рамках LPS-индуцированного синтеза оксилипинов.

3.3.6 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. Нами было предположено, что эти эффекты могут быть связаны с оксипипинами, которые синтезируются из ПНЖК [181].

Для проверки этой гипотезы мы сравнили липидные фракции из нативных и LPS-стимулированных первичных культур астроцитов в отношении их нейротоксической активности в первичной культуре нейронов коры головного мозга (данные не приведены). Чтобы оценить возможность модуляции нейротоксической активности фракций, мы сравнили два вещества, ML355 и зилеутон, которые были добавлены к астроцитам до стимуляции LPS. ML355 и зилеутон принадлежат к классу ингибиторов LOX-опосредованного синтеза оксипипинов [181] (химические структуры данных соединений представлены на Рисунок 20).

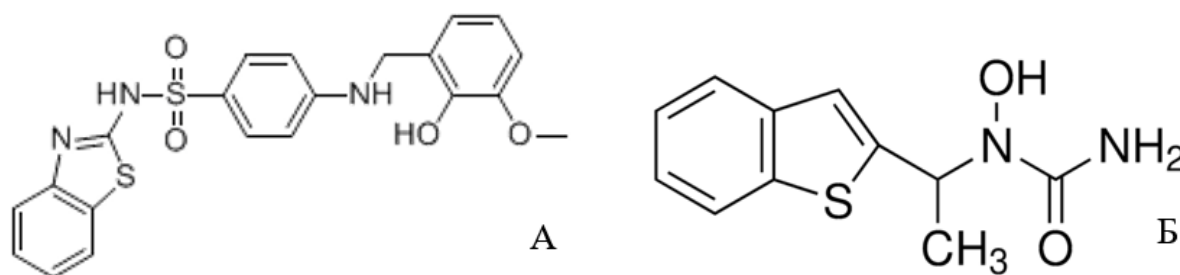


Рисунок 20. Структурные формулы селективных ингибиторов ферментов 12-LOX (А – ML355) и 5-LOX (Б – зилеутон).

Клетки обрабатывались LPS в концентрации 100 нг/мл в течение 24 часов и/или предобработывались ингибиторами ML355 (10 мкМ) и зилеутон (10 мкМ). После обработки клеток выделяли липидные фракции из клеточного

супернатанта, проводили оценку состава оксипинонов, и оценивали нейротоксические свойства подготовленных фракций (Рисунок 21А).

Установлено, что липидные фракции, секретируемые LPS-стимулированными культурами, обогащенными первичными астроцитами крыс, обладали нейротоксической активностью в первичных культурах нейронов крыс, имея в своем составе повышенную концентрацию ряда оксипинонов (Рисунок 21А).

Для дальнейшего анализа мы разделили липидные фракции, на "токсичные" (LPS, зилеутон, зилеутон + LPS) и "нетоксичные" (контроль, ML355, LPS+ML355) по их нейротоксическим свойствам. Для оценки отдельных метаболитов, различающихся между нетоксичными и токсичными группами, мы провели попарное сравнение концентраций метаболитов. Результаты были проиллюстрированы с помощью вулканической диаграммы с поправкой Хольма-Бонферрони (Рисунок 21В). Два метаболита, концентрация которых была значительно увеличена (4-HDoHE, 8-HDoHE), и семь метаболитов, концентрация которых была значительно снижена (13-HDoHE, PGE₂, PGA₂+PGJ₂, PGD₂, PGF_{2a}, 11-HETE, 6-keto-PGF_{1a}), отмечены красным цветом (данные по кратности изменения приведены в Таблице 12) [181].

Таблица 12. Log₂ кратности изменения (FC) показаны для девяти метаболитов, $p < 0,05$ (с поправкой на множественное тестирование).

Наименование	13-HDoHE	4-HDoHE	8-HDoHE	PGE ₂	PGA ₂ +PGJ ₂	PGD ₂	PGF _{2a}	11-HETE	6-keto-PGF _{1a}
Log ₂ FC	-1,58	1,25	1,56	-2,87	-1,88	-2,02	-2,56	-1,55	-1,84

Чтобы проверить, можно ли отличить токсичные и нетоксичные фракции на основе концентрации оксипинонов, также был проведен частичный дискриминантный анализ по методу наименьших квадратов (PLS-

DA). Проекции, относящиеся к первым двум компонентам, представлены на Рисунок 21В. Исследуемые фракции были разделены с небольшим перекрытием. Для каждого метаболита оценивался показатель VIP. Значение этого параметра отражает объясненную вариацию между классами в каждой проекции. Было выделено три метаболита - 13-HDoHE, 4-HDoHE и 17-HDoHE, со значениями VIP-значения $> 1,5$ [181].

Таким образом сравнение токсичных и нетоксичных фракций липидов показало, что использование именно ML355 снижает нейротоксичность липидной фракции астроцитов. Во фракции были обнаружены производные АА и ДНА, обладающие нейропротекторными свойствами. Концентрация веществ 17-HDoHE, 4-HDoHE и 8-HDoHE была повышена. Все они являются производными ДНА и могут быть отнесены к нейропротекторной фракции оксипинонов. Это логичное предположение по нескольким причинам. В мозге крыс было выявлено пять основных оксипиноновых метаболитов, производных ДНА: 17-HDoHE, 14-HDoHE, 11-HDoHE, 7-HDoHE и 4-HDoHE [182]. Известно, что вещества 4-HDoHE, 14-HDoHE и 17-HDoHE принадлежат к группе специализированных, про-решающих медиаторов (СПМ); они также являются предшественниками других СПМ [183]. Более того, ранее они были предложены в качестве маркеров путей биосинтеза СПМ [184]: например, 17-HDoHE для образования RvD, а протектин D₁ и 14-HDoHE для биосинтеза марезина 1 [183]. Марезин, RvD₁ и протектин D₁ способствуют снятию воспаления, нейропротекции и функциональному неврологическому восстановлению после травмы мозга [183]. Поэтому защитные свойства липидных фракций, обогащенных этими веществами, не кажутся необычными [181]. В целом, наши данные подтверждают результаты предыдущих исследований, согласно которым астроциты, активированные провоспалительными стимулами, выделяют растворимые сигналы, которые оказывают нейротоксическое действие. Мы впервые показали, что эти нейротоксические эффекты опосредуются, по крайней мере частично, через

смеси оксипинов, а вещество ML355 может рассматриваться как перспективный нейропротектор.

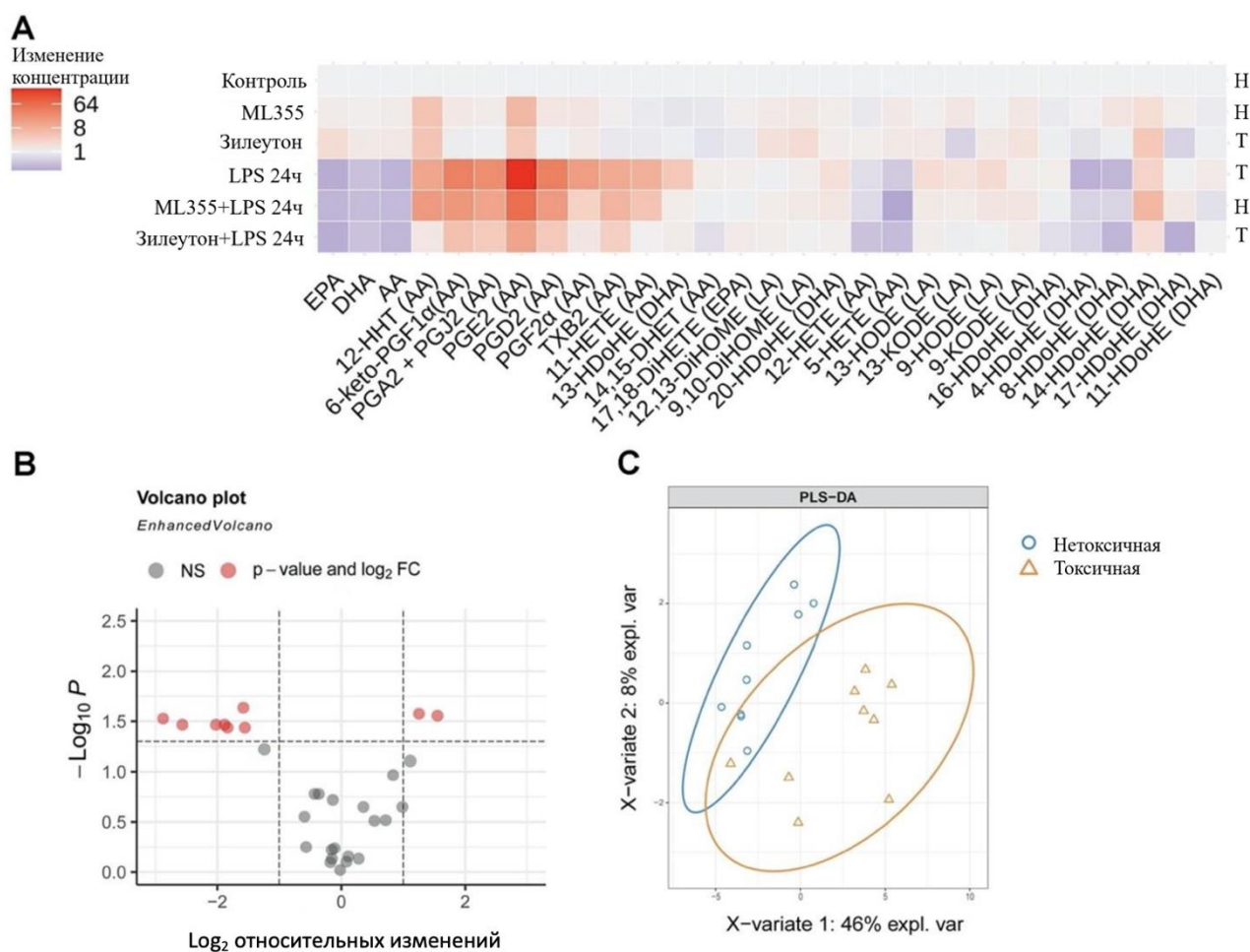


Рисунок 21. ML355 и зилеутон модулируют профили оксипинов астроцитов, стимулированных LPS. Первичные культуры астроцитов крыс предварительно обрабатывали зилеутоном (10 мкМ) или ML355 (10 мкМ) в течение 30 минут, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 24 часов. (A) Тепловая карта, показывающая относительное количество каждого соединения по сравнению с контролем, Н – нетоксичная фракция и Т – токсичная; (B) VolcanoPlot, отображающий количество соединений с наиболее значительно изменившейся концентрацией при сравнении токсичной и нетоксичной фракций. (C) Результаты PLS-DA анализа при сравнении токсичных (Т) и нетоксичных (Н) для нейронов фракций липидов.

3.3.7 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 оксипинонов [185]. Этот подход уже использовали для подавления неферментативного перекисного окисления липидов в различных моделях заболеваний. Дозированная форма для орального применения этилового эфира дейтеро-ЛА проходит в настоящее время клинические испытания для использования при различных заболеваниях [186,187]. Представлялось интересным оценить возможность использования дейтерированных изотопологов АА для целей контроля протекания процесса воспаления (стимуляция, поляризация, модуляция и т.д.), поскольку АА является источником эйкозаноидов, действующих в качестве медиаторов воспаления. Оценивали чистоту используемых в работе 8 субстратов АА, химические структуры которых представлены на Рисунок 22, методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС. Все образцы имели чистоту не менее 97,0-98,5%, в качестве примесей в них были идентифицированы более тяжелые изотопомеры, содержащие в составе на два атома дейтерия больше, чем искомые субстраты. Инкорпорирование атомов дейтерия в исходную молекулу АА приводит к инкременту молекулярной массы субстратов согласно количеству 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 с целью их корректного детектирования (Таблица 13,14). Иные параметры MRM-переходов

(напряжения на префильтрах, времена регистрации и т.д.), кроме массовых чисел родительских и дочерних ионов, оставляли неизменными. Кинетические параметры реакций образования 5-НЕТЕ и 8-НЕТЕ при взаимодействии АА и дейтерированных АА с ферментом 5-LOX представлены в Таблице 15.

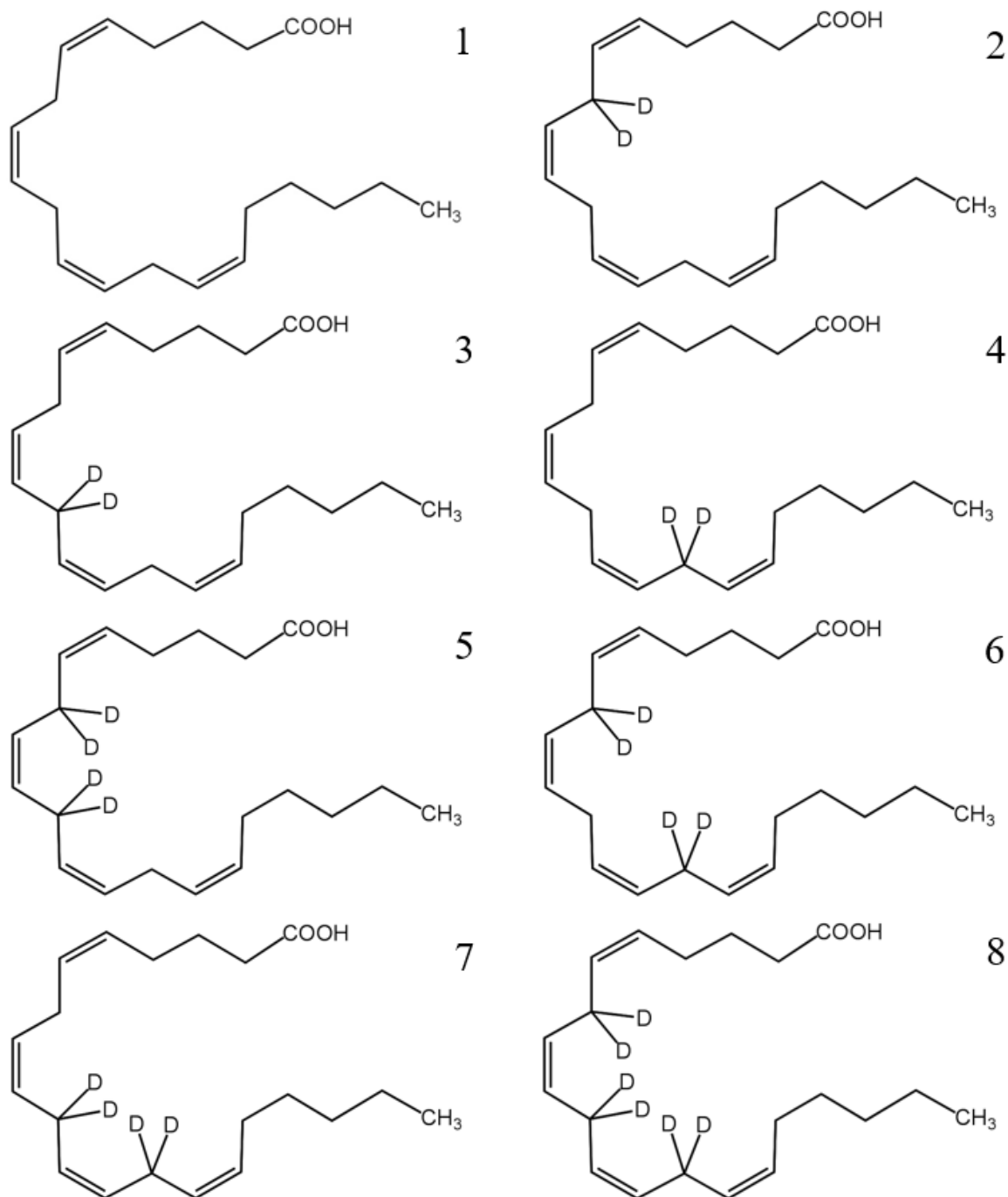


Рисунок 22. Структурные формулы исследованных АА: 1 – АА, 2 – 7,7-АА-d2, 3 – 10,10-АА-d2, 4 – 13,13-АА-d2, 5 – 7,7,10,10-АА-d4, 6 – 7,7,13,13-АА-d4, 7 – 10,10,13,13-АА-d4, 8 – 7,7,10,10,13,13-АА-d6.

Таблица 13. MRM-переходы для детектирования продуктов реакции субстратов АА с ферментом 5-LOX

№№	Субстрат	MRM-переход	
		5-НЕТЕ	8-НЕТЕ
1	АА	319→115	319→155
2	7,7-АА-d2	320→115	321→157
3	10,10-АА-d2	321→115	320→155
4	13,13-АА-d2	321→115	321→155
5	7,7,10,10-АА-d4	322→115	323→157
6	7,7,13,13-АА-d4	322→115	323→157
7	10,10,13,13-АА-d4	322→115	323→157
8	7,7,10,10,13,13-АА-d6	324→115	324→157

Таблица 14. MRM-переходы для детектирования продуктов реакции субстратов АА с ферментом 15-LOX-2

№№	Субстрат	MRM-переход	
		15-НЕТЕ	15-НрЕТЕ
1	АА	319→219	335→113
2	7,7-АА-d2	321→221	337→113
3	10,10-АА-d2	321→221	337→113
4	13,13-АА-d2	321→221	337→113
5	7,7,10,10-АА-d4	323→223	339→113
6	7,7,13,13-АА-d4	323→223	339→113
7	10,10,13,13-АА-d4	323→223	339→113
8	7,7,10,10,13,13-АА-d6	325→225	341→113

Таблица 15. 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	AA	1,151±0,21	17,3±3,5	-	0,025±0,008	22,9±4,6	-	98/2
2	7,7-AA-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-AA-d2	0,933±0,15	15,9±3,2	1	-	-	-	100/0
4	13,13-AA-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-AA-d4	0,037±0,015	16,6±3,3	31	-	-	-	100/0
6	7,7,13,13-AA-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-AA-d4	0,665±0,09	21,7±4,3	2	-	-	-	100/0
8	7,7,10,10,13,13-AA-d6	0,040±0,02	23,5±4,7	29	-	-	-	100/0

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 С10 или С13 мало влияет на скорость образования 5-НЕТЕ, однако при этом наличие атомов дейтерия при углероде в позиции С10 резко снижает скорость образования 8-НЕТЕ (Рисунок 23). Такая блокировка синтеза 8-НЕТЕ связана с фактом увеличения барьера активации и приводит к сильному ингибированию этого процесса. Дейтерирование в позиции С13 вызывает значительное (почти в два раза) увеличение скорости образования 8-НЕТЕ (для субстратов 13,13-AA-d2 и 7,7,13,13-AA-d4).

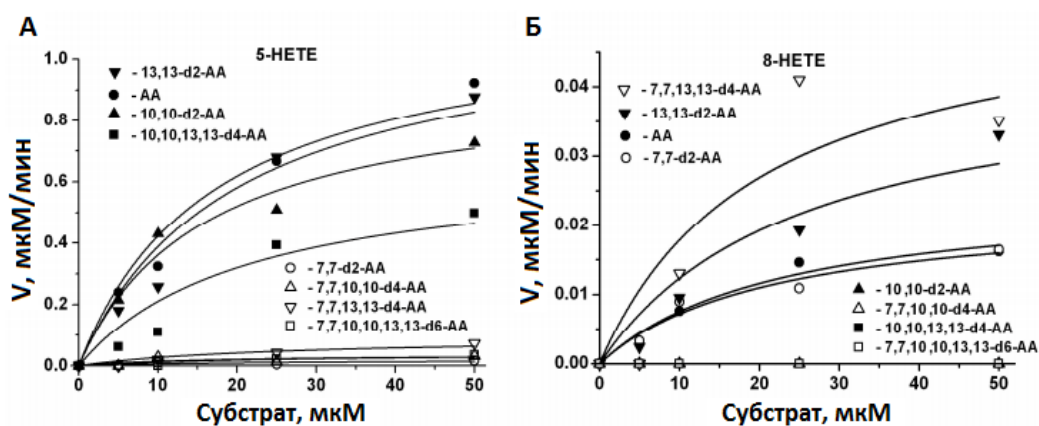


Рисунок 23. Кинетика образования 5-НЕТЕ (А) и 8-НЕТЕ (Б) под действием фермента 5-LOX.

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). 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.

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 оксилипинов;

2. Проведена валидация разработанной методики количественного определения оксилипинов в различных биологических образцах методом ВЭЖХ-МС/МС;

3. Показана возможность использования разработанной методики количественного определения оксилипинов 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

AA – арахидоновая кислота (C20:4)

DHA – докозагексаеновая кислота (C22:6)

EPA – эйкозапентаеновая кислота (C20:5)

DGLA – дигомо- γ -линоленовая кислота (C20:3)

ALA – α -линоленовая кислота (C18:3)

LA – линолевая кислота (C18:2)

COX – циклооксигеназа

LOX – липоксигеназа

CYP – цитохром P450

HETE – гидроксикокозатетраеновая кислота

HEPE – гидроксикокозапентаеновая кислота

EET – эпоксиэйкозатриеновая кислота

DHET – дигидроксикокозатетраеновая кислота

HDHA – гидроксидокозагексаеновая кислота

NODE – гидроксикокозадекадиеновая кислота

NOTrE – гидроксикокозатриеновая кислота

KODE – кетоккозадекадиеновая кислота

EpOME – эпоксикокозадеценивая кислота

DiHOME – дигидроксикокозадеценивая кислота

LX – липоксин

PG – простагландин

TX – тромбоксан

LT – лейкотриен

Rv – резольвин

AEA – N-арахидоноилэтаноламид

OEA – олеоилэтаноламид

LPS – липополисахарид

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ИАХ – иммуноафинная хроматография

ИФА – иммуноферментный анализ

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

ТФЭ – твердофазная экстракция

ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия

УВЭЖХ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

ESI – электрораспылительная ионизация

APCI – химическая ионизация при атмосферном давлении

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

QQQ – масс-спектрометрический детектор типа «тройной квадруполь»

IT – масс-спектрометрический детектор типа «ионная ловушка»

TOF – масс-спектрометрический детектор типа «времяпролетный анализатор»

MRM – мониторинг множественных реакций

СИ – средство измерения

ЛС – лекарственное средство

ВС – внутренний стандарт

СО – стандартный образец

БГТ – бутилгидрокситолуол

TRP – трифенилфосфин

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия

нПКО – нижний предел количественного определения

MF – матричный фактор

NMF – нормализованный матричный фактор

QC – образцы контроля качества

SD – стандартное отклонение

CV – коэффициент вариации

ANOVA – метод однофакторного дисперсионного анализа

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

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

EMA – Европейское медицинское агентство

PPAR – рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором

БВ – болезнь Вильсона-Коновалова

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

ВГД – внутриглазное давление

ПР – повреждение роговицы

LIRD – светоиндуцируемая дегенерация сетчатки

ВВ – водянистая влага

СЖ – слезная жидкость

DMEM – модифицированная среда Eagle от Dulbecco

FBS – фетальная бычья сыворотка

PBS – фосфатный буферный солевой раствор

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

MEM – минимальная основная среда

NBM – нейробазальная среда

SkQ₁ – 10-(60-пластохинонил)-децилтрифенилфосфоний

GW6471 – N-(((2S)-2-((((1Z)-1-метил-3-оксо-3-(4-(трифторметил)фенил)проп-1-енил)амино)-3-(4-(2-(5-метил-2-фенил-1,3-оксазол-4-ил)этокси)фенил)пропил)пропанамид

GW9662 – 2-хлор-5-нитро-N-фенилбензамид

GSK0660 – 3-(((2-Метокси-4-(фениламино)фенил)амино]сульфонил)-2-тиофенкарбоновой кислоты метиловый эфир

GW501516 – 2-[2-Метил-4-[[[4-метил-2-[4-(трифторметил)фенил]-5-тиазолил метил]тио]феноксид]-уксусная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

СПМ – специализированные про-разрешающие медиаторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Libby, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease // *Nutr Rev.* – 2008. – V. 65. – P. S140–S146. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x.
2. Gabbs, M. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs / M. Gabbs, S. Leng, J.G. Devassy, M. Monirujjaman, H.M. Aukema // *Advances in Nutrition.* – 2015. – V. 6. – № 5. – P. 513–540. DOI: 10.3945/an.114.007732.
3. Sugin, L.J.S. Roflumilast: A potential drug for the treatment of cognitive impairment? / L.J.S. Sugin, A. Murugesan, M. Bindu, K.N. Sunil // *Neurosci Lett.* – 2020. – V. 736. – P. 135281. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.135281.
4. Orafaie, A. An overview of lipoxygenase inhibitors with approach of in vivo studies / A. Orafaie, M. Mousavian, H. Orafaie, H. Sadeghian // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2020. – V. 148. – P. 106411. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106411.
5. Gladine, C. MS-based targeted metabolomics of eicosanoids and other oxylipins: Analytical and inter-individual variabilities / C. Gladine, A.I. Ostermann, J.W. Newman, N.H. Schebb // *Free Radic Biol Med.* – 2019. – V. 144. – P. 72–89. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.012.
6. Burla, B. MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines / B. Burla, M. Arita, A.K. Bendt, A. Cazenave-Gassiot, E.A. Dennis, M.R. Wenk // *J Lipid Res.* – 2018. – V. 59. – № 10. – P. 2001–2017. DOI: 10.1194/jlr.S087163.

7. Song, J. A highly efficient, high-throughput lipidomics platform for the quantitative detection of eicosanoids in human whole blood / J. Song, X. Liu, J. Wu, M.J. Meehan, J.M. Blevitt, P.C. Dorrestein, M.E. Milla // *Anal Biochem.* – 2013. – V. 433. – № 2. – P. 181–188. DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.022.
8. Mazaleuskaya, L.L. A broad-spectrum lipidomics screen of antiinflammatory drug combinations in human blood / L.L. Mazaleuskaya, J.A. Lawson, X. Li, G. Grant, C. Mesaros, T. Grosser, G.A. Fitzgerald // *JCI Insight.* – 2016. – V. 1. – № 12. DOI: 10.1172/jci.insight.87031.
9. Chistyakov, D.V. Resolution of inflammation and mood disorders / D.V. Chistyakov, A.A. Astakhova, M.G. Sergeeva // *Exp Mol Pathol.* – 2018. – V. 105. – № 2. – P. 190–201. DOI: 10.1016/j.yexmp.2018.08.002.
10. Buckner, T. The oxylipin profile is associated with development of type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY) / T. Buckner, L.A. Vanderlinden, B.C. DeFelice, P.M. Carry, K. Kechris, F. Dong, J.M. Norris // *Diabetologia.* – 2021. – V. 64. – № 8. – P. 1785–1794. DOI: 10.1007/s00125-021-05457-9.
11. Chistyakov, D.V. Blood Oxylipin Profiles as Markers of Oncological Diseases / D.V. Chistyakov, L.V. Kovalenko, M.Y. Donnikov, M.G. Sergeeva // *Biochemistry (Moscow).* – 2023. – V. 88. – № 5. – P. 621–629. DOI: 10.1134/S000629792305005X.
12. Liakh, I. Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples / I. Liakh, A. Pakiet, T. Sledzinski, A. Mika // *Molecules.* – 2019. – V.24. – P.1639. DOI: 10.3390/molecules24081639.
13. Koch, E. Stability of oxylipins during plasma generation and long-term storage / E. Koch, M. Mainka, C. Dalle, A.I. Ostermann, K.M. Rund, L. Kutzner, N.H. Schebb // *Talanta.* – 2020. – V. 217. – P. 121074. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121074.
14. Руководство по экспертизе лекарственных средств / под ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. – М.: Гриф и К. 2013. – 328 с.

15. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC. 2013.
16. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London. 2011.
17. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №85 "Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза".
18. Funk, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology // *Science*. – 2001. – V.294. – P.1871–1875. DOI: 10.1126/science.294.5548.1871.
19. Wymann, M.P. Lipid signalling in disease / M.P. Wymann, R. Schneiter // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – №9. – P.162–176. DOI: 10.1038/nrm2335.
20. Сергеева, М.Г. Каскад арахидоновой кислоты. – М: Народное образование. 2006. – 192 с.
21. Генрихс, Е.Е. Модуляторы эндогенной каннабиноидной системы как нейропротекторы / Е.Е. Генрихс, М.Ю. Бобров, Е.Л. Андрианова, Н.М. Грецкая, А.А. Лыжин, А.В. Блаженова, Л.Г. Хаспеков // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2010. – Т. 4. – №. 4. – С. 37–42.
22. Buczynski, M.W. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology / M.W. Buczynski, D.S. Dumlao, E.A. Dennis // *J Lipid Res.* – 2009. – V. 50. – № 6. – P. 1015–1038. DOI: 10.1194/jlr.R900004-JLR200.
23. Serhan, C.N. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution / C.N. Serhan, N.A. Petasis // *Chem Rev.* – 2011. – V. 111. – № 10. – P. 5922–5943. DOI: 10.1021/cr100396c.

24. Youhnovski N. et al. Determination of Hydroxyoctadecadienoic Acids // *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2003. Vol. 58, № 3–4. P. 268–276. DOI: 10.1515/znc-2003-3-422.
25. 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, M.G. Sergeeva // *Metabolites*. – 2020. – V. 10. – № 6. – P. 222. DOI: 10.3390/metabo10060222.
26. Cathcart, M.C. Eicosanoid signalling pathways in the development and progression of colorectal cancer: novel approaches for prevention/intervention / M.C. Cathcart, J. Lysaght, G.P. Pidgeon // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2011. – V. 30. – № 3–4. – P. 363–385. DOI: 10.1007/s10555-011-9324-x.
27. Greene, E.R. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids / E.R. Greene, S. Huang, C.N. Serhan, D. Panigrahy // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2011. – V. 96. – № 1–4. – P. 27–36. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2011.08.004.
28. Moreno, J.J. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development // *Biochem Pharmacol.* – 2009. – V. 77. – № 1. – P. 1–10. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.07.033.
29. Serhan, C.N. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators / C.N. Serhan, N. Chiang, T.E. Van Dyke // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – V. 8. – № 5. – P. 349–361. DOI: 10.1038/nri2294.
30. Ferrer, R. Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis / R. Ferrer, J.J. Moreno // *Biochem Pharmacol.* – 2010. – V. 80. – № 4. – P. 431–438. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.04.033.
31. Montuschi, P. Leukotrienes, Antileukotrienes and Asthma // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2008. – V. 8. – № 7. – P. 647–656. DOI: 10.2174/138955708784567395.
32. Li, N. Use of metabolomic profiling in the study of arachidonic acid metabolism in cardiovascular disease / N. Li, J.Y. Liu, H. Qiu, T.R. Harris, P.

- Sirish, B.D. Hammock, N. Chiamvimonuat // *Congest. Heart Fail.* – 2011. – V.17. – P.42–46. DOI: 10.1111/j.1751-7133.2010.00209.x.
33. Lundström, S.L. Asthmatics exhibit altered oxylipin profiles compared to healthy individuals after subway air exposure / S.L. Lundström, B. Levänen, M. Nording, A. Kiepczynska-Nyström, M. Sköld, J.Z.Haeggström, J. Grunewald, M. Suartengreen, B.D. Hammock, B.M. Larsson, A.Eklund, A.M. Wheelock, C.E. Wheelock // *PloS One.* – 2011. – V.6. – P.e23864. DOI: 10.1371/journal.pone.0023864.
34. Barreto, M. 8-Isoprostane in exhaled breath condensate and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children and adolescents / M. Barreto, M.P. Villa, C. Olita, S. Mantella, G. Ciabattoni, P. Montuschi // *Chest.* – 2009. – V.135. – P.66–73. DOI: 10.1378/chest.08-0722.
35. Lucidi, V. Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin E₂ in patients with stable and unstable cystic fibrosis / V. Lucidi, G. Ciabattoni, S. Bella, P.J. Barnes, P. Montuschi // *Free Rad. Biol. Med.* – 2008. – V.45. – P.913–919. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.026.
36. Curtis-Prior, P. Ed. *The Eicosanoids* / Curtis-Prior P. – John Wiley & Sons, 2004 г. – 654 p.
37. Lu, Y. Targeted analysis of omega-6-derived oxylipins and parent polyunsaturated fatty acids in serum of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma patients / Y. Lu, J. Fang, C.N. Ong et al. // *Metabolomics.* – 2007. – V.13. – № 1. – P. 6. DOI: 10.1007/s11306-016-1148-9.
38. Moore, G.Y. Cross-talk between cancer cells and the tumour microenvironment: the role of the 5-lipoxygenase pathway / G.Y. Moore, G.P. Pidgeon // *Int J Mol Sci.* – 2017. – V.18. – №2. – P.E236. DOI: 10.3390/ijms18020236.
39. Hu, J. Angiogenesis and vascular stability in eicosanoids and cancer / J. Hu, T. Frömel, I. Fleming // *Cancer Metastasis Rev.* – 2018. – V.37. – P.425-438. DOI: 10.1007/s10555-018-9732-2.

40. Vona-Davis, L. The obesity-inflammation-eicosanoid axis in breast cancer / L. Vona-Davis, D.P. Rose // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. – 2013. – V.18. – №3-4. – P.291-307. DOI: 10.1007/s10911-013-9299-z.
41. Jain, R. The role of the lipidome in obesity-mediated colon cancer risk / R. Jain, C. Austin Pickens, J.I. Fenton // *J Nutr Biochem*. – 2018. – V.59. – P.1-9. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.02.015.
42. Iyengar, N.M. Obesity and cancer mechanisms: tumor microenvironment and inflammation / N.M. Iyengar, A. Gucalp, A.J. Dannenberg, C.A. Hudis // *J Clin Oncol*. – 2016. – V.34(35). – P.4270-4276. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.4283.
43. Basu, S. Eicosanoids and adipokines in breast cancer: from molecular mechanisms to clinical considerations / S. Basu, R. Nachat-Kappes, F. Caldefie-Chézet, M.P. Vasson // *Antioxid Redox Signal*. – 2013. – V.18. – №3. – P.323-360. DOI: 10.1089/ars.2011.4408.
44. Tuncer, S. Eicosanoid pathway in colorectal cancer: Recent updates / S. Tuncer, S. Banerjee // *World J Gastroenterol*. – 2015. – V.21(41). – P.11748–11766. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11748.
45. Tucker, S.C. Emerging targets in lipid-based therapy / S.C. Tucker, K.V. Honn // *Biochem. Pharmacol*. – 2013. – V.85. – P.673–688. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.11.028.
46. Strassburg, K. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery / K. Strassburg, A.M. Huijbrechts, K.A. Kortekaas, J.H. Lindeman, T.L. Pedersen, A. Dane, R. Berger, A. Brenkman, T. Hankemeier, J. van Duynhoven, E. Kalkhoven, J.W. Newman, R.J. Vreeken // *Anal. Bioanal. Chem*. – 2012. – V.404. – P.1413–1426. DOI: 10.1007/s00216-012-6226-x.
47. Claria, J. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots / J. Claria, B.T. Nguyen, A.L. Madenci, C.K. Ozaki, C.N. Serhan // *Am. J Physiol. Cell Physiol*. – 2013. – V.304. – P.1141–1149. DOI: 10.1152/ajpcell.00351.2012.

48. Sicilia, T. LC-MS/MS methods for the detection of isoprostanes (iPF_{2α}-III and 8,12-iso-iPF_{2α}-VI) as biomarkers of CCl₄-induced oxidative damage to hepatic tissue / T. Sicilia, A. Mally, U. Schauer, A. Pähler, W. Völkel // *J Chromatogr. B.* – 2008. – V.861. – P.48–55. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.11.021.
49. Ju, Z. Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years / Z. Ju, M. Li, J. Xu, D.C. Howell, Z. Li, F.E. Chen // *Acta Pharm Sin B.* – 2022. – V. 12. – № 6. – P. 2790–2807. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.01.002.
50. Rossi, A. The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages. / A. Rossi, C. Pergola, A. Koeberle, M. Hoffmann, F. Dehm, P. Bramanti, L. Sautebin // *Br J Pharmacol.* – 2010. – V. 161. – № 3. – P. 555–570. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00930.x.
51. Casson, R.J. Medical therapy for glaucoma: A review. // *Clin Exp Ophthalmol.* – 2022. – V. 50. – № 2. – P. 198–212. DOI: 10.1111/ceo.13989.
52. Elkady, M. Modified acidic nonsteroidal anti-inflammatory drugs as dual inhibitors of mPGES-1 and 5-LOX / M. Elkady, R. Niess, A.M. Schaible, J. Bauer, S. Luderer et al. // *J Med. Chem.* – 2012. – V.55. – P.8958–8962. DOI: 10.1021/jm3010543.
53. Chattopadhyay, M. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide- and hydrogen sulphide-releasing hybrid is a potent inhibitor of colon cancer cell growth in vitro and in xenograft mouse model / M. Chattopadhyay, R. Kodela, K.R. Olson, K. Kashfi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – V.419. – P.523–528. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.051.
54. Austin, C. Obesity is positively associated with arachidonic acid-derived 5- and 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) / C. Austin, L.M. Sordillo, C. Zhang, J.I. Fenton // *Metabolism.* – 2017. – V.70. – P.177–191. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.01.034.
55. Lynes, M.D. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue / M.D. Lynes, L.O. Leiria, M. Lundh, A.

- Bartelt, F. Shamsi, T.L. Huang, H. Takahashi, M.F. Hirshman, C. Schlein, A. Lee et al. // *Nat. Med.* – 2017. – V.23. – P.631–637. DOI: 10.1038/nm.4297.
56. Möller, K. Influence of weight reduction on blood levels of C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and oxylipins in obese subjects / K. Möller, A.I. Ostermann, K. Rund, S. Thoms, C. Blume, F. Stahl, A. Hahn, N.H. Schebb, J.P. Schuchardt // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* – 2016. – V.106. – P.39–49. DOI: 10.1016/j.plefa.2015.12.001.
57. Virtue, S. Prostaglandin profiling reveals a role for haematopoietic prostaglandin D synthase in adipose tissue macrophage polarisation in mice and humans / S. Virtue, M. Masoodi, B.A.M. de Weijer, M. van Eijk, C.Y.L. Mok, M. Eiden, M. Dale, A. Pirraco, M.J. Serlie, J.L. Griffin et al. // *Int. J. Obes.* – 2015. – V.39. – P.1151–1160. DOI:10.1038/ijo.2015.34.
58. Chistyakov, D.V. Plasma oxylipin profiles reflect Parkinson's disease stage / D.V. Chistyakov N.V. Azbukina, A.V. Lopachev, S.V. Goriainov, A.A. Astakhova, E.V. Ptitsyna, M.G. Sergeeva // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2024. – V. 171. – P. 106788. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2023.106788.
59. Zhao, H. Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling / H. Zhao, C. Wang, N. Zhao, W. Li, Z. Yang, X. Liu, X. Zhang // *Journal of Chromatography B.* – 2018. – V. 1081–1082. – P. 101–108. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.01.025.
60. Zhang, J. Targeted fatty acid metabolomics to discover Parkinson's disease associated metabolic alteration / J. Zhang, L. Liu, L. Zhang, S. Chen, Y. Chen, C. Cai // *Journal of Mass Spectrometry.* – 2021. – V. 56. – № 10. DOI: 10.1002/jms.4781.
61. Klatt-Schreiner, K. High Glucosylceramides and Low Anandamide Contribute to Sensory Loss and Pain in Parkinson's Disease / K. Klatt-Schreiner, L. Valek, J.S. Kang, A. Khlebtovsky, S. Trautmann, L. Hahnefeld, I. Tegeder // *Movement Disorders.* – 2020. – V. 35. – № 10. – P. 1822–1833. DOI: 10.1002/mds.28186.

62. Yoshida, Y. Hydroxyoctadecadienoic acid and oxidatively modified peroxiredoxins in the blood of Alzheimer's disease patients and their potential as biomarkers / Y. Yoshida, A. Yoshikawa, T. Kinumi, Y. Ogawa, Y. Saito, K. Ohara, H. Yamamoto, Y. Imai, E. Niki // *Neurobiol. Aging.* – 2009. – V.30. – P.174–185. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.012.
63. Morris, J.K. Oxylipin Profiling of Alzheimer's Disease in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Elderly / J.K. Morris, B.D. Piccolo, C.S. John, Z.D. Green, J.P. Thyfault, S.H. Adams // *Metabolites.* – 2019. – V. 9. – № 9. – P. 177. DOI: 10.3390/metabo9090177.
64. Peña-Bautista, C. Lipid peroxidation biomarkers correlation with medial temporal atrophy in early Alzheimer Disease / C. Peña-Bautista, R. López-Cuevas, A. Cuevas, M. Baquero, C. Cháfer-Pericás // *Neurochem Int.* – 2019. – V. 129. – P. 104519. DOI: 10.1016/j.neuint.2019.104519.
65. Yu, D. Inverse Relationship between Serum Lipoxin A4 Level and the Risk of Metabolic Syndrome in a Middle-Aged Chinese Population / D. Yu, Z. Xu, X. Yin, F. Zheng, X. Lin, Q. Pan, H. Li // *PLoS One.* – 2015. – V.10. – P.e0142848. DOI: 10.1371/journal.pone.0142848.
66. Grapov, D. Type 2 Diabetes Associated Changes in the Plasma Non-Esterified Fatty Acids, Oxylipins and Endocannabinoids / D. Grapov, S.H. Adams, T.L. Pedersen, W.T. Garvey, J.W. Newman // *PLoS One.* – 2012. – V.7. – P.e48852. DOI: 10.1371/journal.pone.0048852.
67. Kumar, N. 15-Lipoxygenase metabolites of α -linolenic acid, [13-(S)-HPOTrE and 13-(S)-HOTrE], mediate anti-inflammatory effects by inactivating NLRP₃ inflammasome / N. Kumar, G. Gupta, K. Anilkumar, N. Fatima, R. Karnati, G.V. Reddy, P.V. Giri, P. Reddanna // *Sci. Rep.* – 2016. – V.6. – P.31649. DOI: 10.1038/srep31649.
68. Chocholoušková, M. Reversed phase UHPLC/ESI-MS determination of oxylipins in human plasma: a case study of female breast cancer / M. Chocholoušková, R. Jirásko, D. Vrána, J. Gatěk, B. Melichar, M. Holčapek

- // Anal. Bioanal. Chem. – 2019. – V.411. – P.1239–1251. DOI: 10.1007/s00216-018-1556-y.
69. Chistyakov, D.V. Multi-Omics Approach Points to the Importance of Oxylipins Metabolism in Early-Stage Breast Cancer / D.V. Chistyakov, M.V. Guryleva, E.S. Stepanova, L.M. Makarenkova, E.V. Ptitsyna, S.V. Goriainov, M.G. Sergeeva // *Cancers*. – 2022. – V. 14. – № 8. – P. 2041. DOI: 10.3390/cancers14082041.
70. Zhang, L. Serum polyunsaturated fatty acid metabolites as useful tool for screening potential biomarker of colorectal cancer / L. Zhang, B. Chen, J. Zhang, J. Li, Q. Yang, Q. Zhong, S. Zhan, H. Liu, C. Cai // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. – 2017. – V.120. – P.25–31. DOI: 10.1016/j.plefa.2017.04.003.
71. Zhang, J. Distinct differences in serum eicosanoids in healthy, enteritis and colorectal cancer individuals / J. Zhang, Q. Yang, J. Li, Y. Zhong, L. Zhang, Q. Huang, C. Cai // *Metabolomics*. – 2018. – V. 14. – № 1. – P. 4. DOI: 10.1007/s11306-017-1293-9.
72. Guo, J. Serum metabolite signatures in normal individuals and patients with colorectal adenoma or colorectal cancer using UPLC-MS/MS method / J. Guo, Y. Pan, J. Chen, P. Jin, S. Tang, H. Wang, J. Sheng // *J Proteomics*. – 2023. – V. 270. – P. 104741. DOI: 10.1016/j.jprot.2022.104741.
73. Hada, M. Prediagnostic Serum Levels of Fatty Acid Metabolites and Risk of Ovarian Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial / M. Hada, M.L. Edin, P. Hartge, F.B. Lih, N. Wentzensen, D.C. Zeldin, B. Trabert // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2019. – V. 28. – № 1. – P. 189–197. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0392.
74. Yao, X. Effects of thyroid hormone status on metabolic pathways of arachidonic acid in mice and humans: A targeted metabolomic approach / X. Yao, R. Sa, C. Ye, D. Zhang, S. Zhang, H. Xia, Y. Wang, J. Jiang, H. Yin, H.

- Ying // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2015. – V.118–119. – P.11–18. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.005.
75. El-Refaey, H. Use of oral misoprostol in the prevention of postpartum haemorrhage / H. El-Refaey, P. O'Brien, W. Morafa, J. Walder, C. Rodeck // *Br. J Obstet. Gynaecol.* – 1997. – V.104. – P.336–339. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1997.tb11464.x.
76. Colas, R.A. Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue / R.A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan // *AJP Cell Physiol.* – 2014. – V.307. – P.C39–C54. DOI: 10.1152/ajpcell.00024.2014.
77. Willenberg, I. Targeted metabolomics of the arachidonic acid cascade: current state and challenges of LC-MS analysis of oxylipins / I. Willenberg, A.I. Ostermann, N.H. Schebb // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – V.407. – P.2675–2683. DOI: 10.1007/s00216-014-8369-4.
78. Golovko, M.Y. An improved LC-MS/MS procedure for brain prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave irradiation and liquid-liquid extraction / M.Y. Golovko, E.J. Murphy // *J Lipid Res.* – 2008. – V.49. – P.893–902. DOI: 10.1194/jlr.D700030-JLR200.
79. Fitzpatrick, F.A. Albumin-catalysed metabolism of prostaglandin D₂ / F.A. Fitzpatrick, M.A. Wynalda // *J Biol. Chem.* – 1983. – V.258. – P.11713–11718. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)44287-6.
80. Schmidt, R. LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E₂ and D₂ in microdialysis samples of rats / R. Schmidt, O. Coste, G. Geisslinger // *J Chromatogr. B.* – 2005. – V.826. – P.188–197. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.09.001.
81. Maddipati, K.R. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media / K.R. Maddipati, S.L. Zhou // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2011. – V.94. – P.59–72. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2011.01.003.
82. Cao, H. An improved LC-MS/MS method for the quantification of prostaglandins E(2) and D(2) production in biological fluids / H. Cao, L. Xiao,

- G.Y. Park, X. Wang, A.C. Azim, J.W. Christman, R.B. van Breemen // *Anal. Biochem.* – 2008. – V.372. – P.41–51. DOI: 10.1016/j.ab.2007.08.041.
83. Caligiuri, S.P.B. Dietary Flaxseed Reduces Central Aortic Blood Pressure Without Cardiac Involvement but Through Changes in Plasma Oxylipins / S.P.B. Caligiuri, D. Rodriguez-Leyva, H.M. Aukema, A. Ravandi, W. Weighell, R. Guzman, G.N. Pierce // *Hypertension.* – 2016. – V.68. – P.1031–1038. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07834.
84. Yuan, Z.-X. Lipidomic profiling of targeted oxylipins with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Z.-X. Yuan, S. Majchrzak-Hong, G.S. Keyes, M.J. Iadarola, A.J. Mannes, C.E. Ramsden // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – V.410. – P.6009–6029. DOI: 10.1007/s00216-018-1222-4.
85. Drake, S.K. Potential Interferences from Blood Collection Tubes in Mass Spectrometric Analyses of Serum Polypeptides / S.K. Drake, R.A.R. Bowen, A.T. Remaley, G.L. Hortin // *Clin. Chem.* – 2004. – V.50. – P.2398–2401. DOI: 10.1373/clinchem.2004.040303.
86. Ito, R. Determination of tris(2-ethylhexyl)trimellitate released from PVC tube by LC–MS/MS / R. Ito, N. Miura, H. Iguchi, H. Nakamura, M. Ushiro, N. Wakui, K. Nakahashi, Y. Iwasaki, K. Saito, T. Suzuki et al. // *Int. J Pharm.* – 2008. – V.360. – P.91–95. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.020.
87. Schauer, K.L. Mass Spectrometry Contamination from Tinuvin 770, a Common Additive in Laboratory Plastics / K.L. Schauer, C.J. Broccardo, K.M. Webb, P.A. Covey, J.E. Prenni // *J Biomol. Tech.* – 2013. – V.24. DOI: 10.7171/jbt.13-2402-004.
88. Haned, Z. Migration of plasticizers from poly(vinyl chloride) and multilayer infusion bags using selective extraction and GC–MS / Z. Haned, S. Moulay, S. Lacorte // *J Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V.156. – P.80–87. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.011.
89. Yang, J. Quantitative Profiling Method for Oxylipin Metabolome by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry / J.

- Yang, K. Schmelzer, K. Georgi, B.D. Hammock // *Anal. Chem.* – 2009. – V.81. – P.8085–8093. DOI: 10.1021/ac901282n.
90. Hennebelle, M. Altered soluble epoxide hydrolase-derived oxylipins in patients with seasonal major depression: An exploratory study / M. Hennebelle, Y. Otoki, J. Yang, B.D. Hammock, A.J. Levitt, A.Y. Taha, W. Swardfager // *Psychiatry Res.* – 2017. – V.252. – P.94–101. DOI: 10.1016/j.psychres.2017.02.056.
91. Hewawasam, E. A stable method for routine analysis of oxylipins from dried blood spots using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / E. Hewawasam, G. Liu, D.W. Jeffery, B.S. Muhlhausler, R.A. Gibson // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* – 2018. – V.137. – P.12–18. DOI: 10.1016/j.plefa.2018.08.001.
92. Yang, P. Quantitative high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 2- and 3-series prostaglandins in cultured tumor cells / P. Yang, E. Felix, T. Madden, S.M. Fischer, R.A. Newman // *Anal. Biochem.* – 2002. – V.308. – P.168–177. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00218-X.
93. Oe, T. Quantitative analysis of amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients by immunoaffinity purification and stable isotope dilution liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry / T. Oe, B.L. Ackermann, K. Inoue, M.J. Berna, C.O. Graner, V. Gelfanova, R.A. Dean, E.R. Siemens, D.M. Holtzman, M.R. Farlow, I.A. Blair // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2006. – V.20. – P.3723–3735. DOI: 10.1002/rcm.2787.
94. Tsikas, D. Quantitative analysis of biomarkers, drugs and toxins in biological samples by immunoaffinity chromatography coupled to mass spectrometry or tandem mass spectrometry: A focused review of recent applications // *J. Chromatogr. B.* – 2010. – V.878. – P.133–148. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.11.008.

95. Le Faouder, P. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites / P. Le Faouder, V. Baillif, I. Spreadbury, J.P. Motta, P. Rousset, G. Chene, C. Guigne, F. Tercé, S. Vanner, N. Vergnolle, J. Bertrand-Michel, M. Dubourdeau, N. Cenac // *J Chromatogr. B.* – 2013. – V.932. – P.123–133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.06.014.
96. Martin-Venegas, R. Rapid simultaneous analysis of cyclooxygenase, lipoxygenase and cytochrome P-450 metabolites of arachidonic and linoleic acids using high performance liquid chromatography/mass spectrometry in tandem mode / R. Martin-Venegas, R. Casillas, O. Jáuregui, J.J. Moreno // *J Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – V.56. – P.976–982. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.06.018.
97. Liakh, I. Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples / I. Liakh, A. Pakiet, T. Sledzinski, A. Mika // *Molecules.* – 2019. – V.24. – P.1639. DOI: 10.3390/molecules24081639.
98. Kole, P.L. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods / P.L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala // *Biomed. Chromatogr.* – 2011. – V.25. – P.199–217. DOI: 10.1002/bmc.1560.
99. Mesaros, C. Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / C. Mesaros, S.H. Lee, I.A. Blair // *J Chromatogr. B.* – 2009. – V.877. – P.2736–2745. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.011.
100. Новгородцева, Т.П. Роль нарушения липидного обмена в формировании метаболического синдрома / Т.П. Новгородцева, Ю.К. Караман, Н.В. Жукова, Е.Г. Лобанова, М.В. Антонюк // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* – 2011. – Т.44. – №1. – С.64-67.
101. Новгородцева, Т.П. Состав жирных кислот и уровень их метаболитов при частично контролируемой бронхиальной астме на фоне комплексного лечения с применением миллиметровой терапии / Т.П. Новгородцева, К.К. Ходосова, Т.А. Гвозденко, М.В. Антонюк, А.В. Юренко, О.В.

- Переломова, Т.Н. Клепацкая // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2018. – Т.1. – №69. – С.36-42. DOI: 10.12737/article_5b975490da7d45.64596344.
102. Денисенко, Ю.К. Ассоциация метаболизма жирных кислот с системной воспалительной реакцией при хронических заболеваниях органов дыхания / Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, Н.В. Жукова, М.В. Антонюк, Е.Г. Лобанова, Е.П. Калинина // Биомедицинская химия. – 2016. – Т.62. – №3. – С.341-347. DOI: 10.18097/PBMC20166203341.
103. Новгородцева, Т.П. Жирные кислоты крови в формировании и коррекции метаболического синдрома / Т.П. Новгородцева, Ю.К. Денисенко, М.В. Антонюк, Н.С. Юбицкая, Е.Г. Лобанова, Н.В. Жукова // Терапевтический архив. – 2016. – Т.88. – №8. – С.30-34. DOI: 10.17116/terarkh201688830-34.
104. Miller, D.K. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for measurement of leukotrienes and prostaglandins / D.K. Miller, S. Sadowski, D. DeSousa, A.L. Maycock, D.L. Lombardo, R.N. Young, E.C. Hayes // J Immunol. Methods. – 1985. – V.81. – P.169–185. DOI: 10.1016/0022-1759(85)90202-9.
105. Tsikas, D. Assessment of Urinary F₂-Isoprostanes in Experimental and Clinical Studies: Mass Spectrometry Versus ELISA / D. Tsikas, M.-T. Suchy // Hypertension. – 2012. – V.60. – P.199315. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.199315.
106. Grates, H.E. Quantification of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by colorimetric competitive enzyme linked immunosorbent assay / H.E. Grates, R.M. McGowen, S.V. Gupta, J.R. Falck, T.R. Brown, D.M. Callewaert, D.M. Sasaki // J Biosci. – 2003. – V.28. – P.109–113. DOI: 10.1007/BF02970140.
107. Dahl, J.H. Rapid quantitative analysis of 8-iso-prostaglandin-F_{2α} using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with an enzyme immunoassay method / J.H. Dahl, R.B. van Breemen // Anal. Biochem. – 2010. – V.404. – P.211–216. DOI: 10.1016/j.ab.2010.05.023.

108. Lee, C.-Y.J. Rapid preparation of human urine and plasma samples for analysis of F₂-isoprostanes by gas chromatography-mass spectrometry / C.-Y.J. Lee, A. Jenner, B. Halliwell // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V.320. – P.696–702. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.06.015.
109. Tsikas, D. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans // *J Chromatogr. B.* – 1998. – V.717. – P.201–245. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00210-2.
110. Hammes, W. Simultaneous determination of prostaglandin E₁, prostaglandin E₀ and 15-keto-prostaglandin E₀ in human plasma by gas chromatography/negative-ion chemical-ionization tandem mass spectrometry / W. Hammes, U. Büchsler, P. Kinder, H. Bökens // *J Chromatogr. A.* – 1999. – V.847. – P.187–202. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00166-1.
111. Milne, G.L. Measurement of F₂-isoprostanes and isofurans using gas chromatography–mass spectrometry / G.L. Milne, B. Gao, E.S. Terry, W.E. Zackert, S.C. Sanchez // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – V.59. – P.36–44. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.030.
112. Tsukamoto, H. Simultaneous quantification of prostaglandins, isoprostane and thromboxane in cell-cultured medium using gas chromatography–mass spectrometry / H. Tsukamoto, T. Hishinuma, T. Mikkaichi, H. Nakamura, T. Yamazaki, Y. Tomioka, M. Mizugaki // *J Chromatogr. B.* – 2002. – V.774. – P.205–214. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00220-9.
113. Il'yasova, D. Epidemiological marker for oxidant status: Comparison of the ELISA and the gas chromatography/mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-isoprostane / D. Il'yasova, J.D. Morrow, A. Ivanova, L.E. Wagenknecht // *Ann. Epidemiol.* – 2004. – V.14. – P.793–797. DOI: 10.1016/j.annepidem.2004.03.003.
114. Murphy, R.C. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells / R.C. Murphy, S. Hammarström, B. Samuelsson // *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – V.76. – P.4275–4279. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4275.
115. Yue, H. Determination of bioactive eicosanoids in brain tissue by a sensitive reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection / H. Yue, K.I. Strauss, M.R. Borenstein, M.F. Barbe, L.J. Rossi, S.A. Jansen // J Chromatogr. B. – 2004. – V.25. – P.267–277. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.12.027.
116. Van der Noot, V.A. Capillary electrophoresis of cytochrome P-450 epoxygenase metabolites of arachidonic acid / V.A. Van der Noot, M. Van Rollins // Anal. Chem. – 2002. – V.74. – P.5859–5870. DOI: 10.1021/ac0259109.
117. Van Rollins, M. Simultaneous resolution of underivatized regioisomers and stereoisomers of arachidonate epoxides by capillary electrophoresis / M. Van Rollins, V.A. Vander Noot // Anal. Biochem. – 2003. – V.313. – P.106–116. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00503-1.
118. Dahl, S.R. Detecting pM concentrations of prostaglandins in cell culture supernatants by capillary SCX-LC-MS/MS / S.R. Dahl, C.R. Kleiveland, M. Kassem, T. Lea, E. Lundanes, T. Greibrokk // J Sep.Sci. – 2008. – V.31. – P.2627–2633. DOI: 10.1002/jssc.200800184.
119. Rinne, S. Fast and simple online sample preparation coupled with capillary LC-MS/MS for determination of prostaglandins in cell culture supernatants / S. Rinne, C. Ramstad Kleiveland, M. Kassem, T. Lea, E. Lundanes, T. Greibrokk // J Sep. Sci. – 2007. – V.30. – P.1860–1869. DOI: 10.1002/jssc.200700064.
120. He, C. Dynamic eicosanoid responses upon different inhibitor and combination treatments on the arachidonic acid metabolic network / C. He, Y. Wu, Y. Lai, Z. Cai, Y. Liu, L. Lai // Mol Biosyst. – 2012. – V. 8. – № 5. – P. 1585. DOI: 10.1039/c2mb05503a.
121. Селезнева, К.С. Изомерспецифический анализ метаболитов арахидоновой кислоты при неалкогольном стеатогепатите и алкогольном

- поражении печени у больных ожирением / К.С. Селезнева, В.А. Исаков, К.И. Эллер, С.В. Горяинов, О.О. Кириллова, Т.Б. Сенцова // Вопросы питания. – 2014. – Т.83. – № 5. – С.12-19.
122. Yue, H. A liquid chromatography/mass spectrometric method for simultaneous analysis of arachidonic acid and its endogenous eicosanoid metabolites prostaglandins, dihydroxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and epoxyeicosatrienoic acids in rat brain tissue / H. Yue, S.A. Jansen, K.I. Strauss, M.R. Borenstein, M.F. Barbe, I.J. Rossi, E. Murphy // J Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – V.43. – P.1122–1134. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.10.009.
123. Xu, Y.J. Exploratory investigation reveals parallel alteration of plasma fatty acids and eicosanoids in coronary artery disease patients / Y.J. Xu, W.E. Ho, F. Xu, T. Wen, C.N. Ong // Prostaglandins Lipid Mediat. – 2013. – V.106. – P.29–36. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2013.08.003.
124. Cabral, M. Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth / M. Cabral, R. Martín-Venegas, J.J. Moreno // Int. J Biochem. Cell Biol. – 2013. – V.45. – P.1620–1628. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.05.009.
125. Liu, X. 11-Oxoeicosatetraenoic acid is a cyclooxygenase-2/15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase-derived antiproliferative eicosanoid / X. Liu, S. Zhang, J.S. Arora, N.W. Snyder, S.J. Shah, I.A. Blair // Chem. Res. Toxicol. – 2011. – V.24. – P.2227–2236. DOI: 10.1021/tx200336f.
126. Mesaros, C. Analysis of epoxyeicosatrienoic acids by chiral liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using [¹³C]-analog internal standards / C. Mesaros, S.H. Lee, I.A. Blair // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2010. – V.24. – P.3237–3247. DOI: 10.1002/rcm.4760.
127. Mulugeta, S. Identification and absolute configuration of dihydroxy-arachidonic acids formed by oxygenation of 5S-HETE by native and aspirin-acetylated COX-2 / S. Mulugeta, T. Suzuki, N.T. Hernandez, M. Griesser,

- W.E. Boeglin, C. Schneider // *J Lipid Res.* – 2010. – V.51. – P.575–585. DOI: 10.1194/jlr.M001719.
128. Schroeder, C.P. Eicosanoid metabolism in squamous cell carcinoma cell lines derived from primary and metastatic head and neck cancer and its modulation by celecoxib / C.P. Schroeder, P. Yang, R.A. Newman, R. Lotan // *Cancer Biol. Ther.* – 2004. – V.3. – P.847–852. DOI: 10.4161/cbt.3.9.1037.
129. Van den Ouweland, J.M.W. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory / J.M.W. Van den Ouweland, I.P. Kema // *J Chromatogr. B.* – 2012. – V.883–884. – P.18–32. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.11.044.
130. Wenk, M.R. The emerging role of lipidomics // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2005. – V.4. – P.594–610. DOI: 10.1038/nrd1776.
131. Brown, H.A. Lipidomics and bioactive lipids: Mass spectrometry-based lipid analysis / H. Alex Brown. – San Diego, California: Academic Press, 2007. – 432 p.
132. Han, X. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses / X. Han, K. Yang, R.W. Gross // *Mass Spectrom. Rev.* – 2012. – V.31. – P.134–178. DOI: 10.1002/mas.20342.
133. Wheelock, C.E. Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases / C.E. Wheelock, V.M. Goss, D. Balgoma, B. Nicholas, J. Brandsma, P.J. Skipp, D. Burg, A. D'Amico, I. Horvath, A. Chaiboonchoe, H. Ahmed, S. Ballereau, C. Rossios, K.F. Chung, P. Montuschi, S.J. Fowler, I.M. Adcock, A.D. Postle, S.E. Dahlén, A. Rowe, P.J. Stek, C. Auffray, R. Djukanovic // *Eur. J. Respir.* – 2013. – V.42. – P.802–825. DOI: 10.1183/09031936.00078812.
134. Методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» / под ред. В.Г. Кукуеса, В.П. Фисенко. М., МЗиСР России. 2008.
135. Jelinska, M. Effect of conjugated linoleic acid mixture supplemented daily after carcinogen application on linoleic and arachidonic acid metabolites in rat serum and induced tumours / M. Jelinska, A. Białek, H. Mojska, I.

- Gielecińska, A. Tokarz // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* – 2014. – V.1842. – P.2230–2236. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.08.013.
136. Galvão, A.F. Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment / A.F. Galvão, T. Petta, N. Flamand, V.R. Bollela, C.L. Silva, L.R. Jarduli, K.C.R. Malmegrim, B.P. Simões, L.A.B. de Moraes, L.H. Faccioli // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – V.408. – P.3613–3623. DOI: 10.1007/s00216-016-9445-8.
137. Rund, K.M. Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs / K.M. Rund, A.I. Ostermann, L. Kutzner, J.M. Galano, C. Oger, C. Vigor, S. Wecklein, N. Seiwert, T. Durand, N.H. Schebb // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V.1037. – P.63–74. DOI: 10.1016/j.aca.2017.11.002.
138. 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, E.Y. Zernii // *Metabolomics.* – 2020. – V. 16. – № 2. DOI: 10.1007/s11306-020-1650-y.
139. 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.Y. Petrov, E.Y. Zernii // *Biology.* – 2021. – V.10. – №7. – P.658. DOI: 10.3390/biology10070658.
140. Chen, G. Comprehensive analysis of oxylipins in human plasma using reversed-phase liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with heatmap-assisted selection of transitions / G. Chen, Q. Zhang // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2019. – V.411. – P.367–385. DOI: 10.1007/s00216-018-1446-3.

141. Sanaki, T. Improvements in the High-Performance Liquid Chromatography and Extraction Conditions for the Analysis of Oxidized Fatty Acids Using a Mixed-Mode Spin Column / T. Sanaki, T. Fujihara, R. Iwamoto, T. Yoshioka, K. Higashino, T. Nakano, Y. Numata // *Mod. Chem. Appl.* – 2015. – V.3. – P.1000161. DOI: 10.4172/2329-6798.1000161.
142. Wu, J. Oxylipins, endocannabinoids, and related compounds in human milk: Levels and effects of storage conditions / J. Wu, S. Gouveia-Figueira, M. Domellöf, A.M. Zivkovic, M.L. Nording // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2016. – V.122. – P.28–36. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.11.002.
143. García-Flores, L.A. Aronia - Citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: A lipidomic approach using representative oxylipins in urine // L.A. García-Flores, S. Medina, C. Gómez, C.E. Wheelock, R. Cejuela, J.M. Martínez-Sanz, C. Oger, J.M. Galano, T. Durand, Á. Hernández-Sáez // *Food Funct.* – 2018. – V.9. – P.463–475. DOI: 10.1039/C7FO01409K.
144. Горяинов, С.В. Исследование качественного и количественного состава медиаторов липидного обмена в различных матрицах методов ВЭЖХ-МС/МС / С.В. Горяинов, А.Э. Сандоваль Сесар, В.В. Чистяков, Р.С. Борисов // VII Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». – 2017. – С.135.
145. Montuschi, P. LC/MS/MS analysis of leukotriene B₄ and other eicosanoids in exhaled breath condensate for assessing lung inflammation // *J Chromatogr. B.* – 2009. – V.877. – P.1272–1280. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.01.036.
146. Murphy, R.C. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids / R.C. Murphy, R.M. Barkley, K. Zemski Berry, J. Hankin, K. Harrison, C. Johnson, J. Krank, A. McAnoy, C. Uhson, S. Zarini // *Anal. Biochem.* – 2005. – V.346. – P.1–42. DOI: 10.1016/j.ab.2005.04.042.
147. Chambers, E. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses / E. Chambers, D. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J. Mazzeo // *J Chromatogr. B.* – 2007. – V.852. – P.22–34. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.12.030.

148. Moraes, L.A. An isocratic HPLC method for the quantitation of eicosanoids in human platelets / L.A. Moraes, R.M. Giner, M.J. Paul-Clark, M. Perretti, D. Perrett // *Biomed. Chromatogr.* – 2004. – V.18. – P.64–68. DOI: 10.1002/bmc.349.
149. Bittleman, D.B. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)-induced neutrophil transcellular migration is dependent upon enantiomeric structure / D.B. Bittleman, T.B. Casale // *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* – 1995. – V.12. – P.260–267. DOI: 10.1165/ajrcmb.12.3.7873191.
150. Cabral, M. Differential cell growth/apoptosis behavior of 13-hydroxyoctadecadienoic acid enantiomers in a colorectal cancer cell line / M. Cabral, R. Martin-Venegas, J.J. Moreno // *Am. J Physiol. Gastroenterol.* – 2014. – V.307. – P.664-671. DOI: 10.1152/ajpgi.00064.2014.
151. Blum, M. Chiral lipidomics of monoepoxy and monohydroxy metabolites derived from long-chain polyunsaturated fatty acids // M. Blum, W.H. Schunck, I. Dogan, M. Rothe, M. Karber // *J of Lipid Research.* – 2019. – V.60. – №1. – P.135–148. DOI: 10.1194/jlr.M089755.
152. Schneider, C. Enantiomeric Separation of Hydroxy Eicosanoids by Chiral Column Chromatography: Effect of the Alcohol Modifier / C. Schneider, W.E. Boeglin, A.R. Brash // *Anal. Biochem.* – 2000. – V.287. – №1. – P.186–189. DOI: 10.1006/abio.2000.4847.
153. Fuchs, D. An LC-MS/MS workflow to characterize 16 regio- and stereoisomeric trihydroxyoctadecenoic acids / D. Fuchs, M. Hamberg, C. Magnus Sköld, A.M. Wheelock, C.E. Wheelock // *J of Lipid Research.* – 2018. – V.59. – P.2025–2033. DOI: 10.1194/jlr.D087429.
154. Kodama, S. Enantioseparation of hydroxyeicosatetraenoic acids by hydroxypropyl- γ -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography / S. Kodama, S. Nakajima, H. Ozaki, R. Takemoto, Y. Itabashi, A. Kuksis // *Electrophoresis.* – 2016. – V.37. – P.3196–3205. DOI: 10.1002/elps.201600213.

155. Astakhova, A.A. Regulation of cyclooxygenase 2 expression by agonists of PPAR nuclear receptors in the model of endotoxin tolerance in astrocytes / A.A. Astakhova, D.V. Chistyakov, E.V. Pankevich, M.G. Sergeeva // *Biochemistry (Moscow)*. – 2015. – V.80. – №10. – P.1262–1270. DOI: 10.1134/S0006297915100065.
156. Lopachev, A.V. Neuroprotective effect of carnosine on primary culture of rat cerebellar cells under oxidative stress / A.V. Lopachev, O.M. Lopacheva, D.A. Abaimov, O.V. Koroleva, E.A. Vladychenskaya, A.A. Erukhimovich, T.N. Fedorova // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – V.81. – №5. – P.511–520. DOI: 10.1134/S0006297916050084.
157. 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.
158. 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.
159. Горяинов, С.В. Возможности расширения панели детектируемых методом ВЭЖХ-МС/МС метаболитов полиненасыщенных жирных кислот / С.В. Горяинов, С.А. Эспарса, А.Р. Борисова, Д.В. Чистяков // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2020. – Т.9(4). – С.146. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4(1)-16-161

160. Ala, A. Wilson's disease / A. Ala, A.P. Walker, K. Ashkan, J.S. Dooley, M.L. Schilsky // *The Lancet*. – 2007. – V. 369. – № 9559. – P. 397–408. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60196-2.
161. Kieffer, D.A. Wilson disease: At the crossroads between genetics and epigenetics – A review of the evidence / D.A. Kieffer, V. Medici // *Liver Res*. – 2017. – V. 1. – № 2. – P. 121–130. DOI: 10.1016/j.livres.2017.08.003.
162. Mazi, T.A. Dysregulated Choline, Methionine, and Aromatic Amino Acid Metabolism in Patients with Wilson Disease: Exploratory Metabolomic Profiling and Implications for Hepatic and Neurologic Phenotypes / T.A. Mazi, G.V. Sarode, A. Czlonkowska, T. Litwin, K. Kim, N.M. Shibata, V. Medici // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20. – № 23. – P. 5937. DOI: 10.3390/ijms20235937.
163. Sarode, G. V Metabolomics profiles of patients with Wilson disease reveal a distinct metabolic signature / G.V. Sarode, K. Kim, D.A. Kieffer, N.M. Shibata, T. Litwin, A. Czlonkowska, V. Medici // *Metabolomics*. – 2019. – V. 15. – № 3. – P. 43. DOI: 10.1007/s11306-019-1505-6.
164. Messmer, E.M. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease // *Dtsch Arztebl Int*. – 2015. – V.112. – №5. – P.71–81. DOI: 10.3238/arztebl.2015.0071.
165. Weinreb, R.N. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review / R.N. Weinreb, T. Aung, F.A. Medeiros // *JAMA*. – 2014. – V. 311. – № 18. – P. 1901–1911. DOI: 10.1001/jama.2014.3192.
166. Umeno, A. Comprehensive measurements of hydroxylinoleate and hydroxyarachidonate isomers in blood samples from primary open-angle glaucoma patients and controls / A. Umeno, M. Tanito, S. Kaidzu, Y. Takai, M. Horie, Y. Yoshida // *Sci Rep*. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 2171. DOI: 10.1038/s41598-018-36952-6.
167. Brust, A.K. Effects of Cyclooxygenase Inhibitors on Apoptotic Neuroretinal Cells / A.K. Brust, H.K. Ulbrich, G.M. Seigel, N. Pfeiffer, FH Grus // *Biomark Insights*. – 2008. – V. 3. – P. 387–402. DOI: 10.4137/bmi.s692.

168. Sakai, Y. Cyclooxygenase-2 plays a critical role in retinal ganglion cell death after transient ischemia: real-time monitoring of RGC survival using Thy-1-EGFP transgenic mice / Y. Sakai, T. Tanaka, M. Seki, S. Okuyama, T. Fukuchi, K. Yamagata, H. Abe // *Neurosci Res.* – 2009. – V. 65. – № 4. – P. 319–325. DOI: 10.1016/j.neures.2009.08.008.
169. Goel, M. Aqueous humor dynamics: a review / M. Goel, R.G. Picciani, R.K. Lee, S.K. Bhattacharya // *Open Ophthalmol J.* – 2010. – V. 4. – P. 52–59. DOI: 10.2174/1874364101004010052.
170. Cabrerizo, J. Changes in the Lipidomic Profile of Aqueous Humor in Open-Angle Glaucoma / J. Cabrerizo, J.A. Urcola, E. Vecino // *J Glaucoma.* – 2017. – V. 26. – № 4. – P. 349–355. DOI: 10.1097/IJG.0000000000000603.
171. Pelletier, J.S. Topical application of povidone-iodine/dimethylsulfoxide ophthalmic gel preparation in Dutch-Belted rabbits / J.S. Pelletier, J. Devine, K. Capriotti, S.B. Barone, J.A. Capriotti // *Cutan Ocul Toxicol.* – 2019. – V. 38. – № 3. – P. 221–226. DOI: 10.1080/15569527.2019.1579225.
172. Capriotti, K. Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology / K. Capriotti J.A. Capriotti // *J Clin Aesthet Dermatol.* – 2012. – V. 5. – № 9. – P. 24–26. PMID: PMC3460663.
173. Chistyakov D. V et al. Comparison of PPAR Ligands as Modulators of Resolution of Inflammation, via Their Influence on Cytokines and Oxylipins Release in Astrocytes // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, № 24. P. 9577. DOI: 10.3390/ijms21249577.
174. Defaux, A. Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination / A. Defaux, M.G. Zurich, O. Braissant, P. Honegger, F. Monnet-Tschudi // *J Neuroinflammation.* – 2009. – V. 6. – P. 15. DOI: 10.1186/1742-2094-6-15.
175. Derogis, P.B.M.C. The development of a specific and sensitive LC-MS-based method for the detection and quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acids as a tool for lipidomic analysis / P.B.M.C. Derogis, F.P. Freitas, A.S. Marques, D. Cunha, P.P. Appolinário, F. de Paula,

- S. Miyamoto // PLoS One. – 2013. – V. 8. – № 10. – P. e77561–e77561. DOI: 10.1371/journal.pone.0077561.
176. Matsunobu, T. Thromboxane A synthase-independent production of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid, a BLT₂ ligand / T. Matsunobu, T. Okuno, C. Yokoyama, T. Yokomizo // Lipid Res. – 2013. – V. 54. – № 11. – P. 2979–2987. DOI: 10.1194/jlr.M037754.
177. van't Erve, T.J. Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF(2 α)/PGF(2 α) ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation / T.J. van't Erve, F.B. Lih, M.B. Kadiiska, L.J. Deterding, T.E. Eling, R.P. Mason // Free Radic Biol Med. – 2015. – V. 83. – P. 245–251. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.004.
178. Picq, M. DHA metabolism: targeting the brain and lipoxygenation / M. Picq, P. Chen, M. Perez, M. Michaud, E. Véricel, M. Guichardant, M. Lagarde // Mol Neurobiol. – 2010. – V. 42. – № 1. – P. 48–51. DOI: 10.1007/s12035-010-8131-7.
179. Guichardant, M. Biological relevance of double lipoxygenase products of polyunsaturated fatty acids, especially within blood vessels and brain / M. Guichardant, E. Véricel, M. Lagarde // Biochimie. – 2019. – V. 159. – P. 55–58. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.08.009.
180. Omeragic, A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma agonists exhibit anti-inflammatory and antiviral effects in an EcoHIV mouse model / A. Omeragic, N. Kara-Yacoubian, J. Kelschenbach, C. Sahin, C.L. Cummins, D.J. Volsky, R. Bendayan // Sci Rep. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 9428. DOI: 10.1038/s41598-019-45878-6.
181. Guryleva, M.V. Modulation of the Primary Astrocyte-Enriched Cultures' Oxylin 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.

182. Jouvène, C. Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Free and Esterified Oxygenated Derivatives from Docosahexaenoic Acid in Rat Brain / C. Jouvène, B. Fourmaux, A. Géoën, L. Balas, T. Durand, M. Lagarde, M. Guichardant // *Lipids*. – 2018. – V. 53. – № 1. – P. 103–116. DOI: 10.1002/lipd.12006.
183. Francos-Quijorna, I. Maresin 1 Promotes Inflammatory Resolution, Neuroprotection, and Functional Neurological Recovery After Spinal Cord Injury / I. Francos-Quijorna, E. Santos-Nogueira, K. Gronert, A.B. Sullivan, M.A. Kopp, B. Brommer, R. López-Vales // *Neurosci*. – 2017. – V. 37. – № 48. – P. 11731–11743. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1395-17.2017.
184. Fredman, G. An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques / G. Fredman, J. Hellmann, J.D. Proto, G. Kuriakose, R.A. Colas, B. Dorweiler, I. Tabas // *Nat Commun*. – 2016. – V. 7. – P. 12859. DOI: 10.1038/ncomms12859.
185. Shchepinov, M.S. Polyunsaturated Fatty Acid Deuteration against Neurodegeneration // *Trends Pharmacol Sci*. – 2020. – V. 41. – № 4. – P. 236–248. DOI: 10.1016/j.tips.2020.01.010.
186. Lynch, D.R. Double blind trial of a deuterated form of linoleic acid (RT001) in Friedreich ataxia / D.R. Lynch, K.D. Mathews, S. Perlman, T. Zesiewicz, S. Subramony, O. Omidvar, M. Midei // *J Neurol*. – 2023. – V. 270, – № 3. – P. 1615–1623. DOI: 10.1007/s00415-022-11501-4.
187. Firsov, A.M. Deuterated polyunsaturated fatty acids inhibit photoirradiation-induced lipid peroxidation in lipid bilayers / A.M. Firsov, M.S.F. Franco, D.V. Chistyakov, S.V. Goriainov, M.G. Sergeeva, E.A. Kotova, M.S. Shchepinov // *Photochem Photobiol B*. – 2022. – V. 229. – P. 112425. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112425.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Среднее значение \pm стандартное отклонение относительных концентраций оксилипинов и ПНЖК КГ и пациентов с БВ.

Соединение	Относительная концентрация, нг/мл		Исходная ПНЖК	Ферментативный путь
	КГ	БВ		
10-HDoHE	0,0121 \pm 0,01	0,0271 \pm 0,0274	DHA	LOX
11,12-DHET	0,1055 \pm 0,068	0,1135 \pm 0,0692	AA	CYP
11-HETE	0,0573 \pm 0,045	0,0918 \pm 0,0754	AA	LOX
12,13-DiHOME	1,1567 \pm 0,717	1,6706 \pm 1,2151	LA	CYP
12-HEPE	0,0131 \pm 0,0097	0,0336 \pm 0,0422	EPA	LOX
12-HETE	0,8281 \pm 0,7086	1,2521 \pm 1,221	AA	LOX
12-HHT	0,0118 \pm 0,0143	0,0464 \pm 0,0372	AA	COX
12-keto-LTB ₄	0,0433 \pm 0,0578	0,0208 \pm 0,0139	AA	LOX
13-HDoHE	0,0093 \pm 0,0112	0,0145 \pm 0,0142	DHA	LOX
13-HODE	1,2115 \pm 1,0144	1,3636 \pm 0,9827	LA	LOX
13-KODE	0,1574 \pm 0,1113	0,1131 \pm 0,1163	LA	LOX
14,15-DHET	0,1221 \pm 0,0739	0,1912 \pm 0,0864	AA	CYP
14-HDoHE	0,0438 \pm 0,0267	0,103 \pm 0,16	DHA	LOX
15-HETE	0,0378 \pm 0,0253	0,0553 \pm 0,0402	AA	LOX
15-HETrE	0,0151 \pm 0,0081	0,0356 \pm 0,0333	DGLA	LOX
16-HDoHE	0,0177 \pm 0,0128	0,0317 \pm 0,0424	DHA	LOX
17,18-DiHETE	0,0647 \pm 0,0536	0,0763 \pm 0,0403	EPA	CYP
19-HETE	0,907 \pm 0,3395	0,7024 \pm 0,2777	AA	CYP
20-HDoHE	0,0132 \pm 0,0136	0,0145 \pm 0,0156	DHA	CYP

20-carboxy-AA	0,1172±0,0994	0,0388±0,0495	AA	CYP
4-HDoHE	0,0248±0,0181	0,0207±0,0239	DHA	LOX
5-HEPE	0,0069±0,0069	0,016±0,0165	EPA	ROS
5-HETE	0,084±0,0591	0,1237±0,1374	AA	LOX
6-trans-LTB ₄ +LTB ₄	0,0064±0,0039	0,0333±0,0671	AA	LOX
8,9-DHET	0,0056±0,0002	0,0111±0,0068	AA	CYP
8-HDoHE	0,0197±0,0123	0,0505±0,0827	DHA	LOX
8-HETE	0,0232±0,0174	0,0272±0,0193	AA	LOX
9,10-DiHOME	1,5115±1,067	1,5454±1,4252	LA	CYP
9-HODE	0,4867±0,1988	0,8474±0,5325	LA	LOX
9-HOTrE	0,0049±0,0049	0,007±0,0027	ALA	LOX
9-KODE	0,0837±0,0541	0,0542±0,0339	LA	LOX
AA	9,5848±7,1545	8,6858±5,5443	-	-
AEA	1,8321±1,5384	2,3297±1,1781	EA	-
DHA	46,2452±36,2903	41,8502±23,264	-	-
EPA	8,5929±9,7091	24,6221±23,2701	-	-
LTE ₄	0,0194±0,0204	0,0912±0,1524	AA	LOX
Lyso-PAF	326,598±156,906	431,223±197,108	-	-
OEA	10,8608±6,6427	16,7657±8,5828	EA	-
PGA ₂	0,0438±0,0251	0,0319±0,0197	AA	COX
PGD ₂	0,0027±0,0023	0,0095±0,0076	AA	COX
PGE ₂	0,0102±0,0101	0,0231±0,0186	AA	COX
PGF _{2a}	0,0045±0,0029	0,0066±0,0036	AA	COX
TXB ₂	0,1087±0,1195	0,4916±0,6527	AA	COX

Таблица П2. Концентрация оксипинов в ВГЖ пациентов с ПОУГ и КГ, нг/мл.

#	Группа	Пол	12,13- DiHOME	12,13- EрOME	13- HODE	13- HOTrE	13- KODE	19- HETE	20- HETE	20-carboxy- LTB ₄	9,10- DiHOME	9,10- EрOME	9- HODE	9- HOTrE	9- KOD E	LT B ₄	AA	DHA	EP A	Lyso- PAF	OE A	TXB ₃
1	КГ	Ж	15,43	NA	59,11	NA	50,38	NA	NA	68,49	6,68	1,24	69,79	NA		NA	52,39	79,6 5	5,50	50,91	5,47	30,5 0
2		Ж	18,37	NA	88,44	NA	96,14	NA	NA	1,08	3,71	10,96	44,30	NA		NA	194,3	59,2 1	5,11	15,69	5,67	3,01
3		М	14,70	NA	89,81	NA	25,67	NA	NA	0,41	8,15	NA	57,58	NA		NA	33,90	58,5 9	3,30	75,51	6,06	0,30
4		Ж	21,43	7,74	95,60	NA	49,79	NA	NA	NA	3,90	NA	69,99	NA		NA	18,02	32,7 3	5,11	29,84	4,45	0,50
5		М	18,25	NA	153,27	NA	96,71	NA	NA	NA	6,41	NA	51,16	NA		NA	8,02	12,2 4	NA	2,19	7,38	0,20
6		Ж	18,97	NA	151,56	NA	46,89	NA	NA	0,50	15,15	NA	87,75	NA		NA	15,77	10,7 3	7,89	5,63	11,3 2	NA
7		Ж	12,80	NA	70,16	NA	29,83	NA	NA	NA	16,14	1,72	51,93	NA		NA	20,10	7,00	NA	15,31	3,16	3,35
8		Ж	12,01	NA	77,58	1,34	27,45	NA	NA	NA	14,73	5,68	46,69	NA		NA	66,93	45,5	NA	6,73	2,72	0,53
9		М	13,78	NA	57,09	NA	7,16	NA	NA	NA	13,37	NA	41,39	NA		NA	8,39	16,5 2	NA	4,92	2,90	0,47
10		М	17,84	0,95	64,58	NA	13,45	NA	NA	NA	19,59	NA	50,08	NA		NA	3,47	2,86	NA	1,38	3,07	NA
11	Ж	15,77	NA	64,31	NA	17,21	NA	NA	NA	15,96	1,80	44,45	NA		NA	2,13	2,29	NA	2,89	2,50	141, 69	
12	Ж	16,19	NA	58,70	NA	18,14	NA	NA	NA	11,47	1,78	41,38	NA		NA	7,80	1,23	2,12	5,03	3,03	NA	
13	Ж	24,64	NA	55,65	NA	22,86	NA	NA	NA	11,46	NA	29,64	NA		NA	20,28	9,96	NA	8,80	6,32	NA	
14	М	16,34	NA	90,16	NA	23,19	NA	NA	NA	19,35	5,71	65,64	NA		NA	132,2 3	38,2 9	NA	7,49	4,55	NA	
15	ПОУГ	Ж	15,46	NA	101,66	NA	48,18	552,63	5,10	NA	11,10	NA	66,55	1,48		4,21	10,06	4,68	9,23	507,73	8,33	NA
16		Ж	12,62	1,83	48,97	NA	32,34	625,05	5,85	NA	10,15	2,44	35,11	NA		14,0 2	31,49	19,4 0	1,54	41,10	3,06	NA
17		Ж	148,51	NA	117,75	NA	170,48	NA	NA	511,42	9,76	NA	66,06	NA		NA	17,04	4,66	0,43	31,23	6,90	187, 57
18		Ж	18,89	NA	46,00	1,36	16,91	526,04	1,37	NA	5,74	NA	36,76	NA		12,4 8	36,58	37,6 3	14,7 5	229,77	3,29	NA

19	Ж	22,28	2,19	94,48	0,28	29,97	NA	NA	NA	10,11	NA	73,01	NA		NA	598,36	12,85	NA	8,78	4,96	NA
20	Ж	16,56	1,23	93,28	1,98	25,95	532,90	3,58	NA	7,09	2,94	50,00	0,30		10,16	16,68	27,43	7,87	309,27	3,12	NA
21	Ж	6,94	NA	59,08	1,67	37,31	703,50	3,59	NA	12,05	NA	39,86	NA		8,50	12,21	16,21	12,63	1783,03	4,92	NA
22	Ж	19,81	2,97	132,76	23,05	26,24	717,48	1,35	NA	17,58	NA	85,36	25,90		14,73	7,91	8,66	NA	33,07	6,25	NA
23	M	138,84	NA	157,50	NA	216,27	NA	NA	NA	19,24	NA	96,35	1,44		NA	105,56	208,80	14,60	343,51	11,74	NA
24	M	15,72	NA	69,20	NA	17,49	NA	NA	NA	16,38	0,95	53,34	NA		NA	1079,33	4,71	NA	16,39	5,12	NA
25	M	10,13	NA	61,39	0,93	22,43	592,01	2,06	NA	14,57	3,43	48,69	0,90		17,56	16,41	33,67	2,98	95,14	5,40	NA
26	M	15,37	NA	97,88	5,10	18,76	612,85	6,63	NA	8,64	NA	39,95	NA		18,82	48,79	104,29	4,26	83,03	5,01	NA
27	M	12,10	NA	66,17	NA	36,60	645,78	11,12	NA	8,59	4,45	57,85	NA		12,32	14,21	23,62	10,10	82,87	6,82	NA
28	M	19,58	NA	108,08	NA	37,31	588,33	1,61	NA	16,46	1,78	60,90	1,91		13,97	17,34	22,23	20,77	633,45	5,58	NA
29	M	14,61	NA	89,87	NA	31,09	623,86	2,62	NA	15,00	NA	33,49	NA		16,47	0,86	4,24	1,76	302,48	4,80	NA
30	Ж	123,43	NA	114,21	NA	172,80	NA	NA	NA	15,13	NA	75,00	NA		NA	2,86	15,85	0,84	19,95	6,03	NA
31	Ж	100,84	NA	104,00	NA	310,50	NA	NA	101,24	15,00	NA	44,99	NA		NA	NA	0,81	1,11	24,00	5,25	42,32
32	Ж	78,00	NA	64,98	NA	154,05	NA	NA	NA	8,95	NA	45,47	NA		NA	15,15	38,85	5,35	21,21	5,35	0,67
33	Ж	7,85	NA	58,12	0,90	32,02	649,04	7,21	NA	11,55	NA	28,93	NA		12,44	17,50	9,21	NA	16,93	3,29	NA
34	Ж	9,62	NA	58,34	NA	19,63	555,71	1,24	NA	4,88	NA	26,29	1,03		8,33	13,02	33,25	2,48	63,11	5,34	NA
35	Ж	142,92	NA	114,04	NA	201,39	NA	NA	0,43	15,75	NA	60,29	NA		NA	5,77	11,09	6,11	46,07	5,60	0,94
36	Ж	97,73	NA	119,45	NA	153,66	NA	NA	NA	13,60	NA	46,48	NA		NA	4,40	13,15	2,38	35,49	5,87	0,36
37	M	163,82	NA	100,24	NA	97,17	NA	NA	3,46	31,65	NA	56,94	NA		NA	15,63	5,81	1,72	19,74	6,78	NA
38	M	104,22	NA	79,68	NA	189,69	NA	NA	NA	19,73	NA	39,52	NA		NA	147,04	280,89	20,87	177,26	7,17	NA

Таблица ПЗ. Концентрация оксипинов в СЖ пациентов с ПОУГ и КГ, нг/мл.

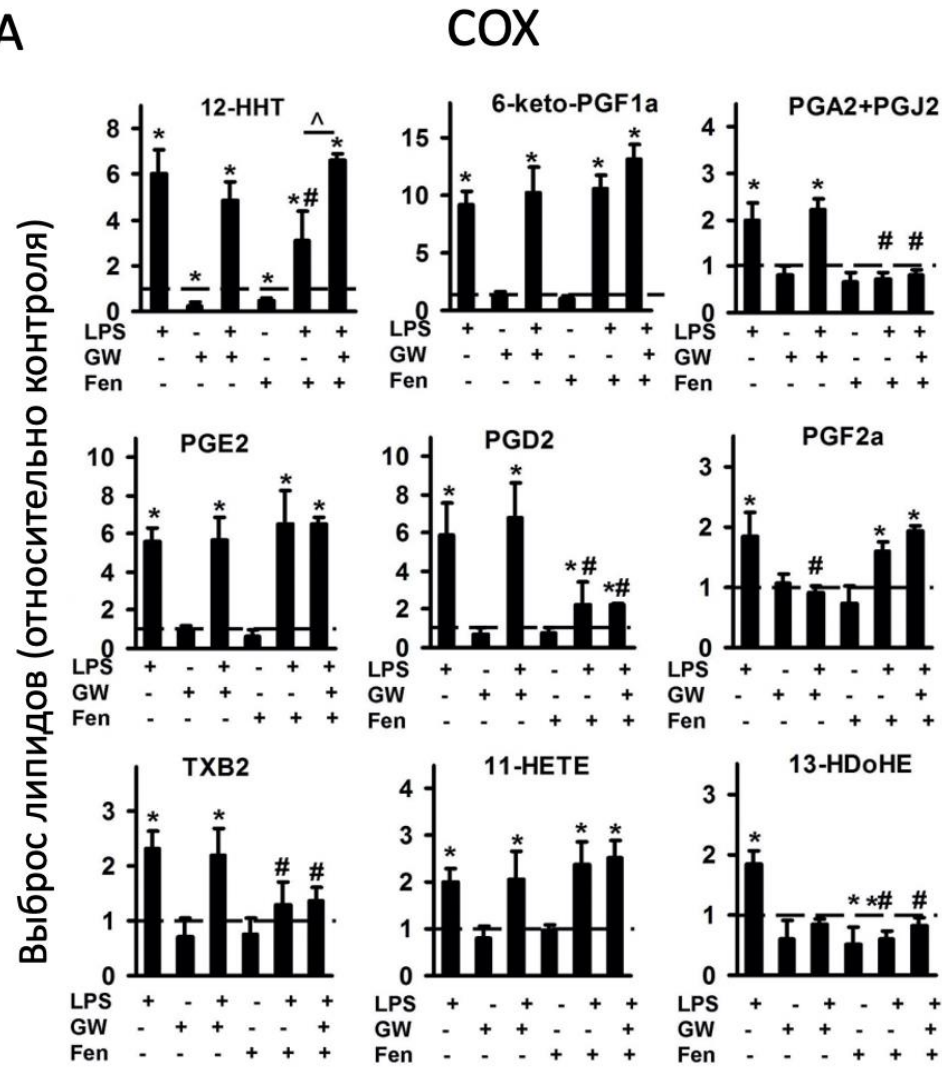
#	Группа	Пол	12,13-DiHOME	12,13-EpOME	13-HODE	13-HOTPE	13-KODE	19-HETE	20-HETE	20-carboxy-LTB ₄	9,10-DiHOME	9,10-EpOME	9-HODE	9-HOTPE	9-KODE	LT B ₄	AA	DHA	EPA	Lyso-PAF	OE A	TX B ₃
1	КГ	Ж	13,82	5,40	234,32	NA	237,63	NA	NA	1,38	11,76	NA	149,14	2,17	102,48	NA	365,11	193,42	24,58	134,96	19,58	0,35
2		Ж	30,79	8,08	280,16	NA	257,76	NA	NA	0,95	11,99	14,49	148,39	NA	64,73	NA	965,96	351,48	280,09	110,12	13,15	NA
3		М	33,47	NA	601,23	NA	342,61	NA	NA	2,07	31,83	27,88	395,52	7,41	170,06	NA	675,39	193,06	58,09	122,03	18,24	2,07
4		Ж	43,05	22,12	471,17	NA	364,73	NA	NA	1,03	28,18	12,61	307,53	1,38	217,78	NA	306,94	199,85	31,65	140,45	23,41	0,36
5		М	64,71	4,06	445,52	NA	156,32	NA	NA	2,04	30,42	5,16	281,83	1,96	121,05	NA	191,53	91,96	34,95	269,40	25,65	NA
6		Ж	30,70	2,15	301,46	NA	142,65	NA	NA	1,05	25,90	8,14	180,81	NA	139,85	NA	493,71	181,70	48,26	203,30	18,25	NA
7		Ж	104,87	7,02	563,99	NA	140,56	NA	NA	NA	148,42	37,76	447,18	NA	244,06	NA	61,00	80,57	10,49	53,75	27,61	0,49
8		Ж	50,48	10,16	273,93	1,00	116,92	NA	NA	NA	42,74	13,09	171,46	NA	106,69	NA	896,95	246,85	98,45	158,89	21,53	NA
9		М	28,12	NA	64,43	NA	53,72	NA	NA	NA	35,82	NA	49,88	NA	71,86	NA	618,76	126,98	35,28	35,51	14,56	0,18
10		М	49,21	19,21	990,21	1,47	205,19	NA	NA	NA	43,26	14,30	780,03	1,49	343,26	NA	2255,01	340,32	81,82	64,17	14,76	0,45
11		Ж	47,83	7,13	547,94	NA	189,57	NA	NA	NA	53,16	37,50	404,77	NA	236,45	NA	823,11	212,30	38,18	24,35	38,48	0,84
12		Ж	24,78	NA	169,35	NA	9,37	NA	NA	NA	31,67	1,30	109,09	1,82	12,10	NA	31,40	8,78	8,33	7,51	8,55	NA
13		Ж	42,45	2,17	44,59	NA	31,81	NA	NA	NA	38,56	1,05	35,89	NA	28,62	NA	613,77	204,16	62,37	37,08	13,48	1,38

1 4		M	39,52	2,55	202,36	NA	205,90	NA	NA	NA	60,29	13,12	185,95	0,39	222,10	NA	1036,25	260,87	36,96	54,63	17,92	NA
1 5		Ж	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1 6		Ж	27,36	1,02	185,03	3,48	93,62	641,18	9,86	NA	25,12	4,06	127,84	NA	73,15	12,27	67,50	23,96	19,65	248,35	11,47	NA
1 7		Ж	144,29	NA	158,86	NA	321,43	NA	NA	NA	30,07	NA	105,35	1,11	249,98	NA	402,68	132,03	83,05	223,20	21,34	NA
1 8		Ж	38,68	NA	279,51	1,42	96,32	179,03	NA	NA	40,44	2,46	220,81	NA	66,09	13,59	621,29	93,10	63,06	2684,09	19,83	NA
1 9		Ж	25,18	NA	241,84	1,31	29,75	NA	NA	NA	17,79	4,38	175,18	NA	25,20	NA	1195,65	NA	NA	77,65	17,02	NA
2 0		Ж	20,83	1,85	168,54	1,47	95,74	693,72	2,21	NA	28,46	8,85	170,01	0,44	52,50	37,19	1830,87	269,05	232,14	1783,29	13,20	NA
2 1	ΠΟΥ Γ	Ж	13,81	NA	155,12	NA	74,28	793,00	2,22	NA	8,91	5,49	118,10	5,87	60,38	25,93	702,46	162,98	54,33	1228,70	12,02	NA
2 2		Ж	56,62	7,66	183,90	NA	120,24	536,97	2,53	NA	35,54	8,35	119,38	0,82	62,71	11,22	207,75	98,72	39,80	501,58	13,76	NA
2 3		M	153,59	NA	160,45	NA	247,19	NA	NA	NA	29,19	NA	105,65	1,87	165,21	NA	157,42	64,64	43,29	97,69	13,70	0,59
2 4		M	33,44	5,32	211,64	NA	74,96	NA	NA	NA	33,55	11,97	152,21	NA	30,25	NA	478,27	111,81	48,59	391,05	17,30	NA
2 5		M	17,48	NA	168,02	9,70	57,19	632,70	NA	NA	26,13	NA	171,94	9,04	42,79	4,54	24,21	35,67	30,55	327,09	12,33	NA
2 6		M	58,60	8,82	131,09	3,84	114,42	588,78	3,14	NA	50,63	15,61	95,90	2,24	68,14	20,23	146,61	63,33	30,28	698,02	14,36	NA
2 7		M	26,86	3,93	231,65	NA	112,19	593,98	0,56	NA	23,15	13,10	135,19	0,50	81,64	21,41	198,89	103,34	25,22	668,10	13,28	NA
2 8		M	22,28	NA	201,34	1,00	69,16	614,08	3,98	NA	13,21	4,58	156,29	NA	48,61	23,05	165,70	106,86	29,32	1383,65	11,06	NA

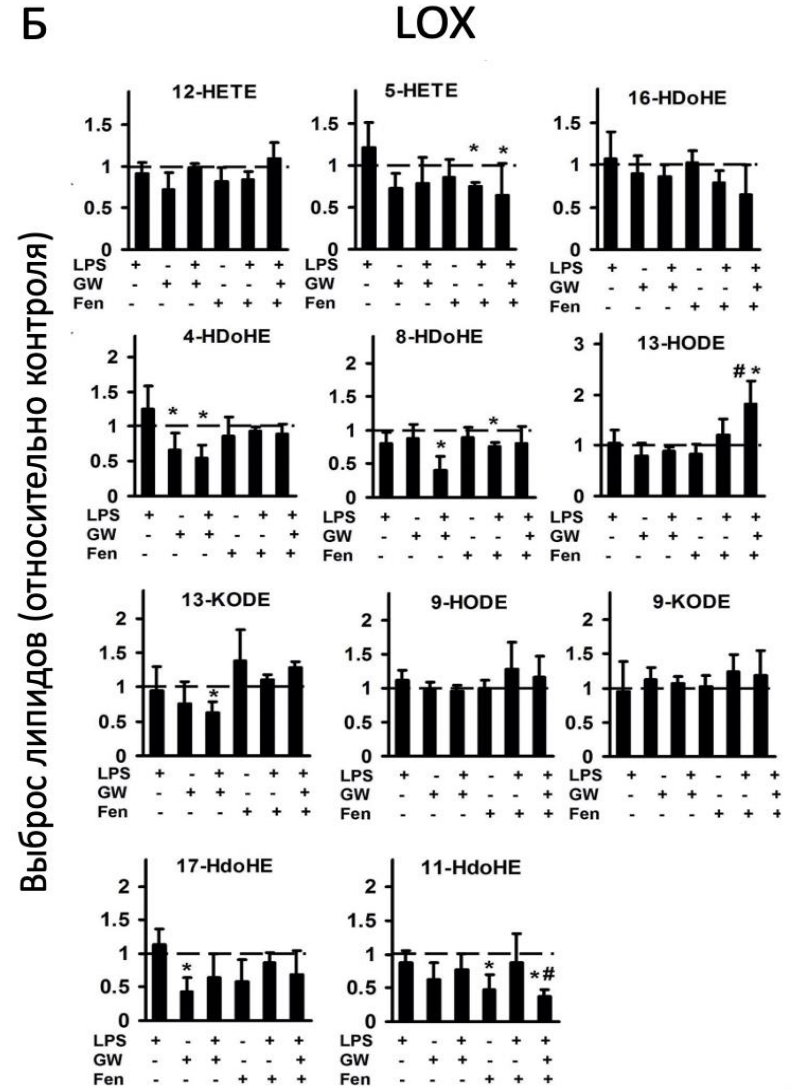
2 9	M	17,76	NA	115,42	NA	33,89	605,97	3,75	NA	7,46	NA	97,91	1,15	14,59	10,18	886,45	193,84	25,31	1868,13	15,36	NA
3 0	Ж	146,85	NA	313,50	NA	287,95	NA	NA	NA	19,73	NA	152,60	2,62	197,68	NA	542,54	206,05	120,38	66,88	22,88	0,82
3 1	Ж	162,29	NA	228,45	NA	230,07	NA	NA	NA	20,54	NA	121,33	2,73	101,74	NA	814,41	194,85	66,60	451,07	15,79	NA
3 2	Ж	105,59	NA	195,24	NA	285,55	NA	NA	NA	13,11	NA	97,43	2,83	260,44	NA	256,12	228,86	122,19	151,52	31,23	0,29
3 3	Ж	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3 4	Ж	25,06	NA	196,09	NA	73,09	650,88	9,58	NA	27,30	5,10	138,51	NA	61,78	17,73	243,86	54,68	21,62	754,78	18,89	NA
3 5	Ж	202,57	NA	641,85	NA	264,39	NA	NA	NA	27,68	NA	286,70	10,87	141,03	NA	156,61	92,55	93,54	100,07	37,90	0,85
3 6	Ж	195,80	NA	274,31	NA	176,91	NA	NA	NA	30,01	NA	108,40	NA	44,87	NA	252,81	95,82	63,34	101,16	23,98	0,87
3 7	M	346,16	NA	221,62	NA	304,22	NA	NA	NA	51,08	NA	125,56	3,01	84,46	NA	1051,37	217,49	111,98	107,72	20,40	1,26
3 8	M	145,29	NA	192,42	NA	319,95	NA	NA	NA	30,21	NA	126,36	NA	205,58	NA	142,52	93,14	58,26	60,06	30,71	NA

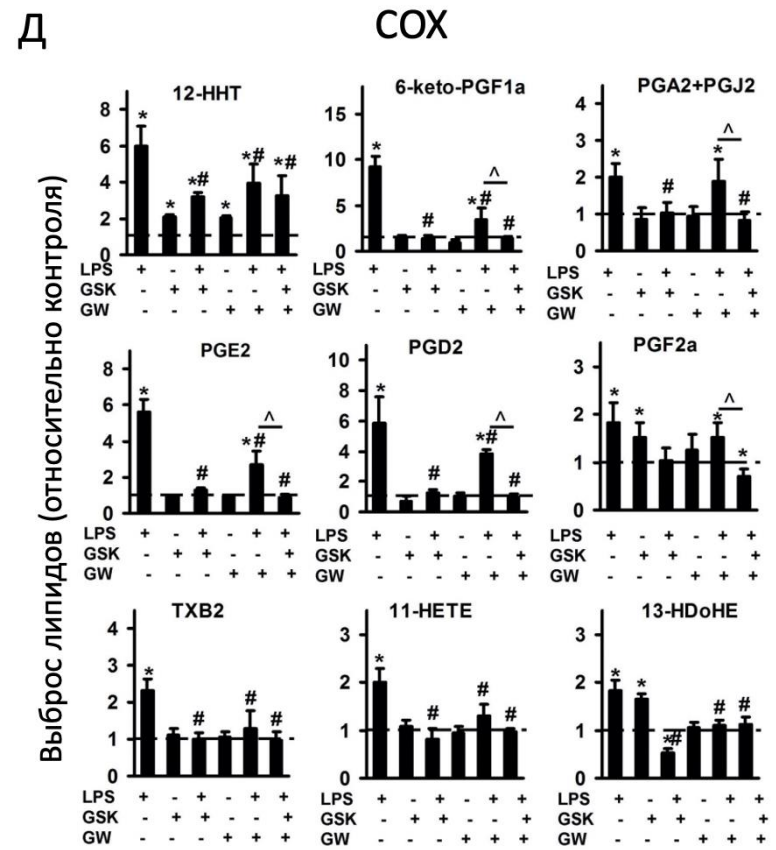
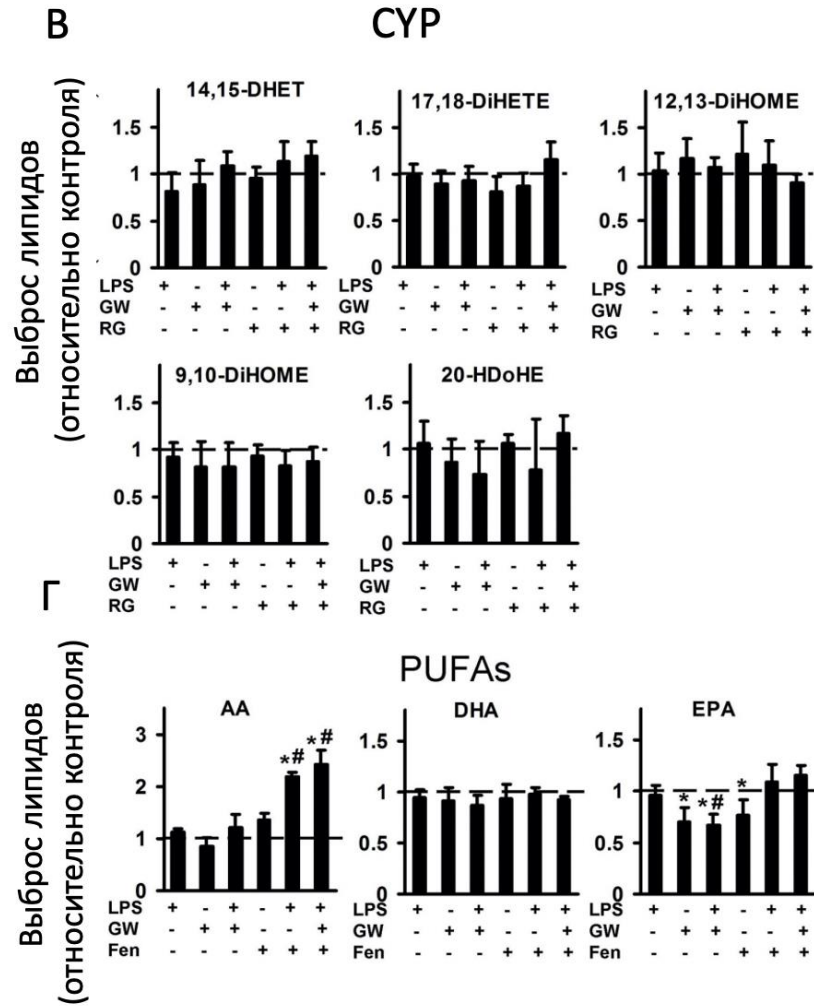
Рисунок П4. Влияние агониста PPAR α фенофибрата и антагониста GW6471, агониста PPAR β GW501516 и антагониста GSK0660, агониста PPAR γ росиглитазона и антагониста GW9662 на высвобождение оксилипинов в LPS-стимулированных астроцитах. Первичные крысиные астроциты предварительно обрабатывали в течение 30 мин GW6471 (GW6, 5 мкМ) или фенофибратом (Fen, 50 мкМ); GSK0660 (GSK, 5 мкМ) или GW501516 (GW5, 25 мкМ); GW9662 (GW9, 5 мкМ) или росиглитазон (RG, 20 мкМ) или в комбинации с ними, а затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 ч. Концентрацию оксилипинов в супернатантах измеряли с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Столбики показывают относительное количество липидных медиаторов, продуцируемых COX (А, Д, И), LOX (Б, Е, К), CYP-пути (В, Ж, Л) и свободные ПНЖК (Г, З, М). Значения представляют собой среднее значение \pm станд. откл. из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$, по сравнению с нестимулированными клетками, # $p < 0,05$, по сравнению с LPS-стимулированными клетками, ^ $p < 0,05$, по сравнению с указанными обработками.

A



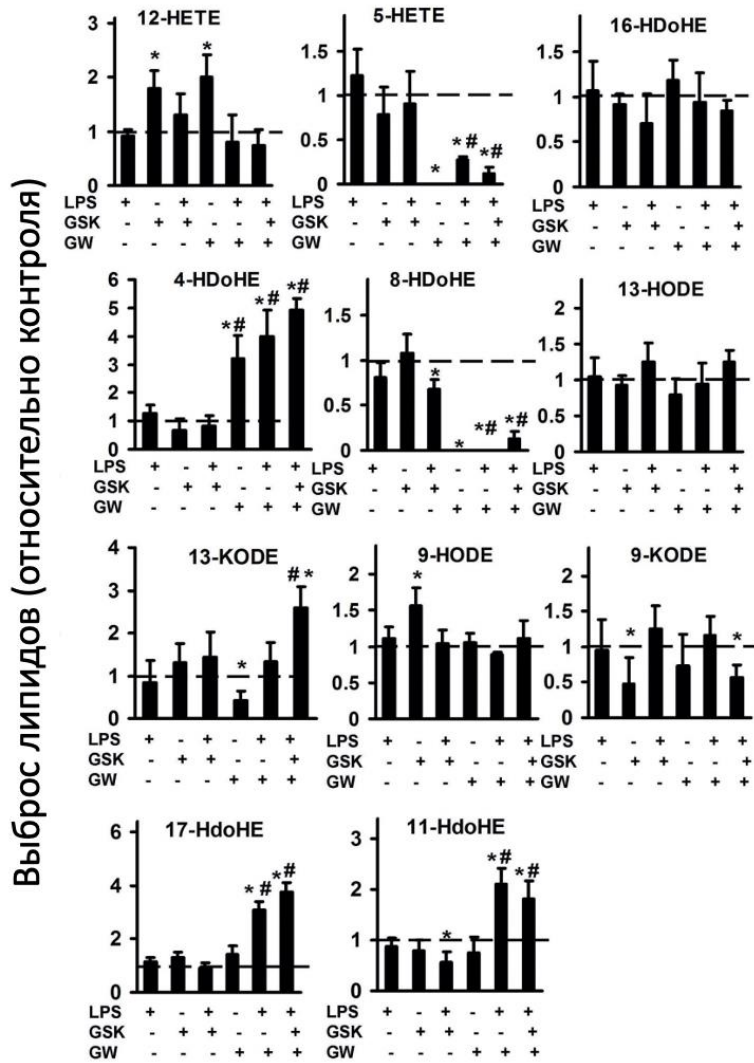
Б





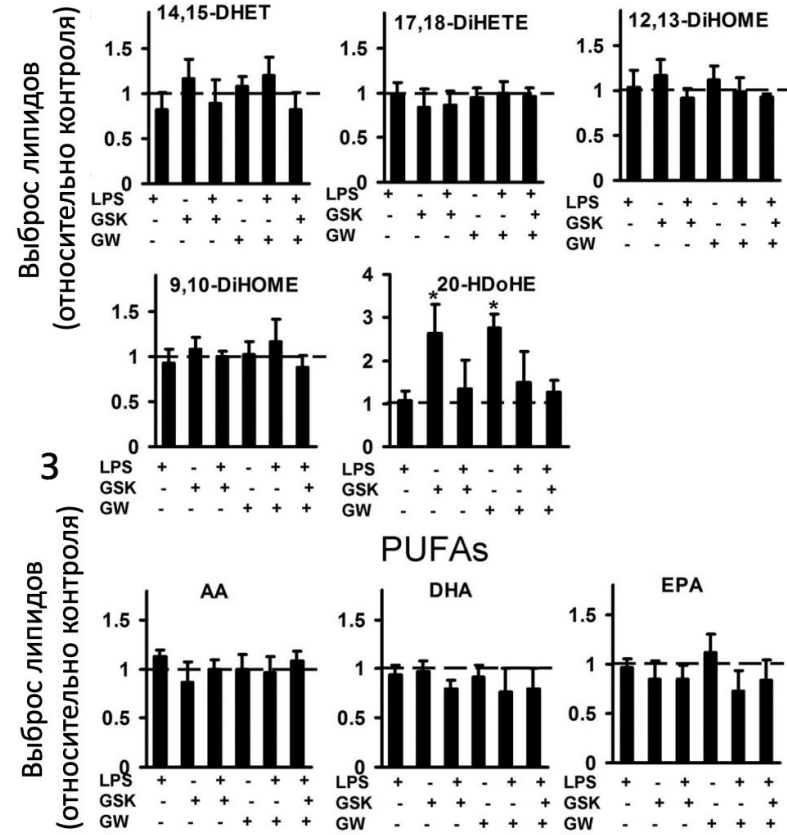
E

LOX

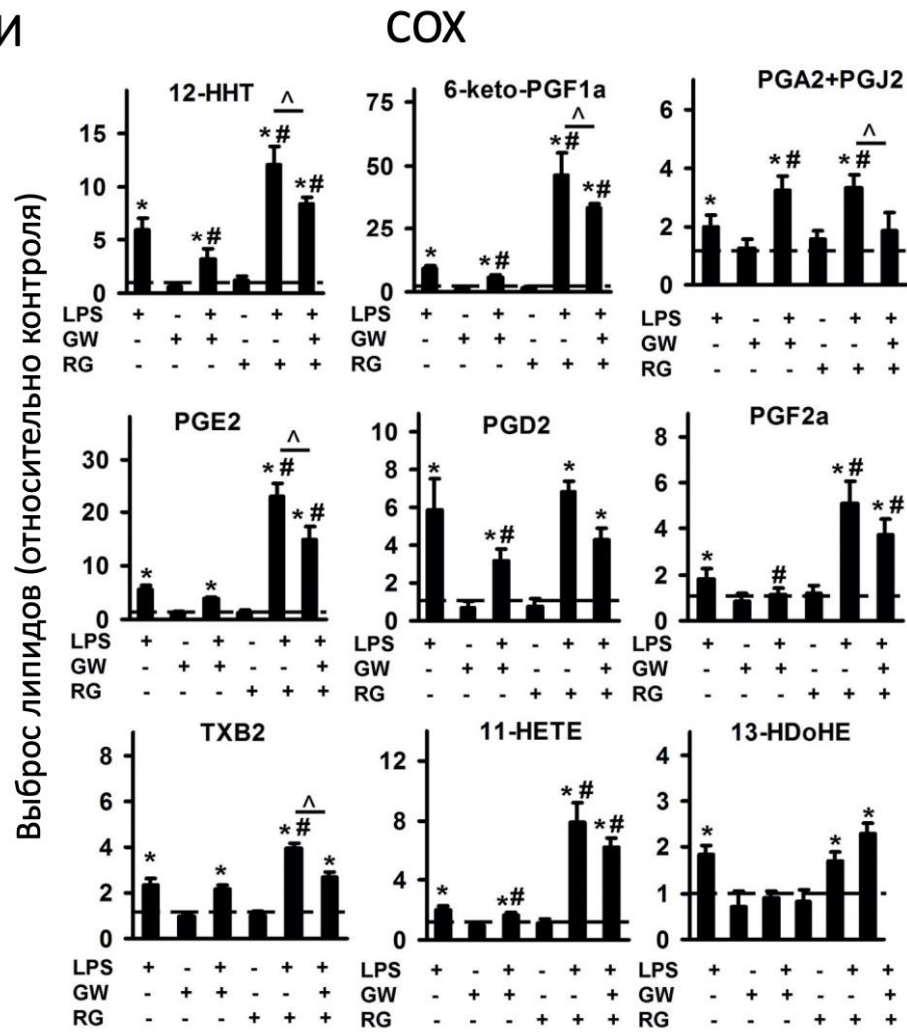


Ж

CYP



И



К

