



Аннотация

Порфирии — заболевания из группы орфанных, которые характеризуются сложностями в диагностике. Распространённость данного заболевания в России насчитывает 7 — 12 / 100 000 здоровых людей, как заключили в Национальном гематологическом сообществе [1]. Они связаны с низкой специфичностью симптомов и латентностью протекания патологии. Целью работы стало создание метода количественного определения порфиринов в моче и крови человека, которые как раз выступают диагностическими маркерами порфирии. Существуют разные методы диагностики этой группы заболеваний, включающих в себя биохимические, ферментативные и генетические тесты. Тест с реактивом Эрлиха не позволяет определить более редкие формы порфирий. Генетические методы затратны и трудоемки. ВЭЖХ позволяет быстро и бюджетно определить порфирины в биологических жидкостях организма: плазме крови, моче, что делает данный метод весьма полезным в диагностике порфирий. Существующие и описанные в литературе методы [2,3] требуют специфических детекторов (МС, флуориметрия) и расходных компонентов (колонок C-18 bonded silica), что налагает ограничения на оборудование.

Цель исследования

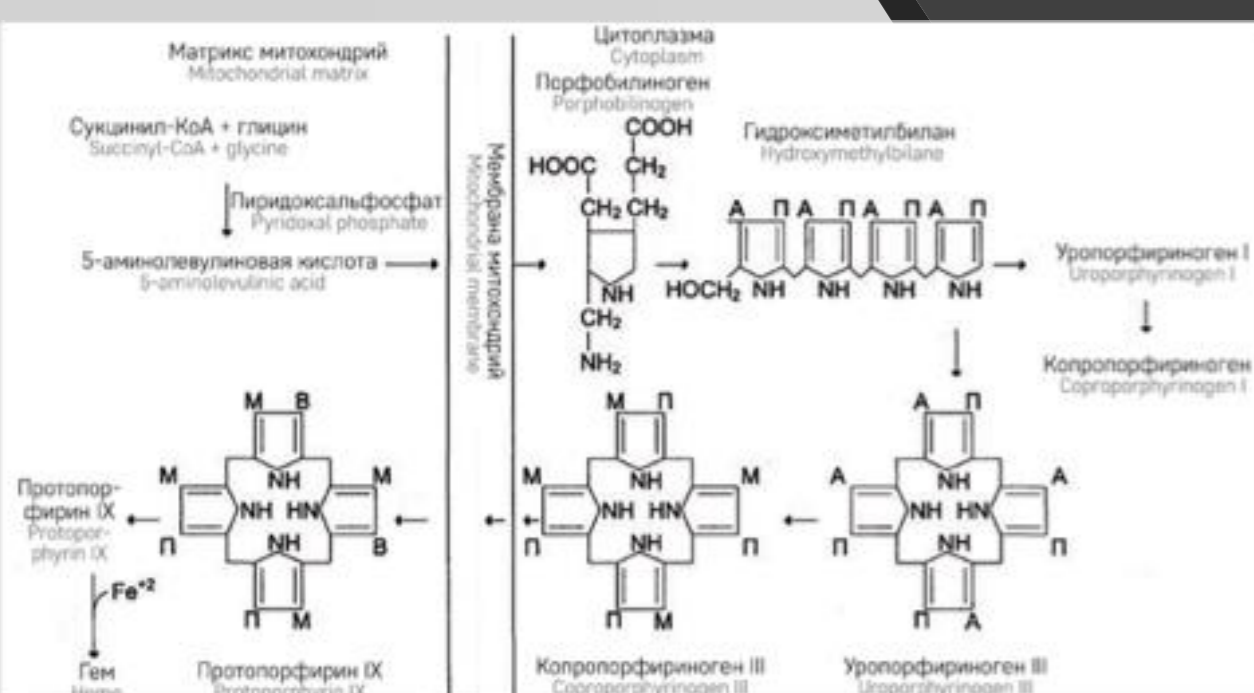
Создание и адаптация метода диагностики порфирий в биологических жидкостях организма на разных стадиях заболевания методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Введение

Порфирии — группа гетерогенных заболеваний, вызванных дефектами ферментов биосинтеза гема. Нарушение последовательности синтеза гема приводит к образованию и накоплению промежуточных продуктов: порфиринов и/или их предшественников (рис 1). Эти субстраты накапливаются в крови и тканях, усиленно выделяются с мочой и калом. Порфирии — редко встречающиеся заболевания. Самым распространённым типом является острая перемежающаяся порфирия - 1/75 000 жителей европейских стран [4]. Они имеют неспецифическую симптоматику и часто протекают в латентной форме. Вследствие этого своевременная диагностика порфирий затруднена. Требуется разработка или адаптация быстрого и специфичного метода диагностики по наличию порфиринов в биоматериале. Для этого необходимо:

1. Разработать методику определения порфиринов в анализируемых биожидкостях методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.
2. Валидировать разработанную методику количественного определения анализируемых веществ в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ.
3. Определить референтные значения маркёров изучаемого заболевания у пациентов в рамках изученной выборки.
4. Сделать вывод о целесообразности применения методики.

Рис 1. Схема биосинтеза гема [5]



Материалы и методы исследования

Принцип. Обращённофазная высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием

Образцы. Биологический материал: кровь и моча от пациентов ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ, направленных на исследование, а также кровь и моча добровольцев.

Район исследования. Порфирины в диапазонах концентраций 20 нМ — 2 мкМ
Пробоподготовка. К аликвотам мочи добавляли 50 мкл внутреннего стандарта и 500 мкл 2М соляной кислоты. К плазме крови добавляли внутренний стандарт, после чего осаждали ацетонитрилом и отбирали супернатант. К остатку добавляли 1М NH₄OH, встряхивали и осаждали повторно. Супернатанты объединяли и закисляли при помощи 7М соляной кислоты. Образцы вводили в хроматограф в объёме 10 мкл при температуре автосэмплера в 12±1 °С.

Материалы.

Система. Waters Acquity UPLC H-CLASS

Детектор. DAD. λ = 400 нм, Δλ = 1,2 нм

Колонка. Phenomenex Luna® C18(2) 250*4.6, 5 мкм

Подвижные фазы. Фаза А: 1Н ацетат аммония ВЭЖХ-качества в воде, доведённый до рН 5,16 при помощи уксусной кислоты. Фаза В: 100% метанол ВЭЖХ-качества.

Предколонка: фильтр Waters 0,2 мкм

Температура термостата. Комнатная температура: 25±2°С

Анализируемые параметры. Измеряли интенсивность хроматографических пиков по отношению к интенсивности сигнала внутреннего стандарта. Измеряли время выхода порфиринов с колонки (RT).

Статистическая обработка проводилась при помощи поставляемого ПО к прибору: Empower версии 3.0

Результаты исследования и их обсуждение

Разработанная методика показывает высокую селективность и чувствительность и позволяет определить девять порфиринов и внутренний стандарт (рис. 2—4). Метод показывает линейность в диапазоне концентраций порфиринов 20 нМ — 2 мкМ, а также характеризуется стабильностью и правильностью. Это делает представленную методику пригодной в диагностике порфирий. Время анализа одной пробы составляет 41 минуту.

Выводы:

На данный момент метод успешно применяется в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ [6]. В будущем нами планируется дальнейшее распространение данного метода в лабораторной, а также клинической практиках. По итогу мы рассчитываем получить один из универсальных и широко используемых способов выявления порфирий, чтобы увеличить процент диагностирования данной группы патологических нарушений на ранних стадиях.

Контакты

Даниил Андреевич Кильдюшкин

e-mail: kildan@mail.ru

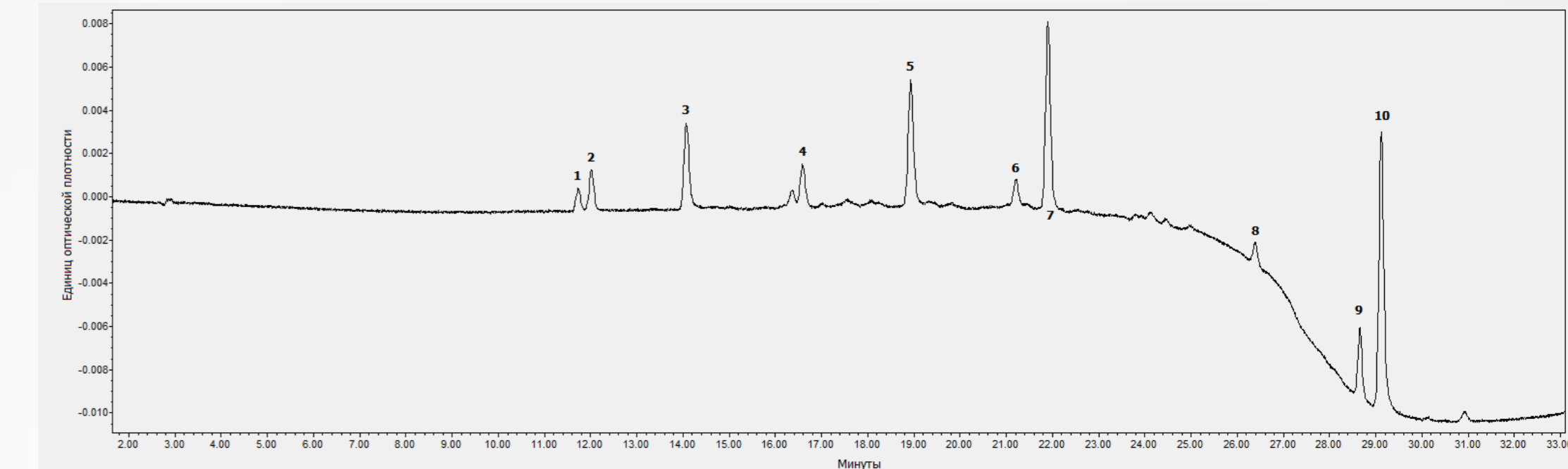


Рис. 2. Хроматограмма стандартов порфиринов в донорской моче: 1 – уропорфирин I; 2 – уропорфирин III; 3 – гептакрбоксилпорфирин I; 4 – гексакрбоксилпорфирин I; 5 – пентакарбоксилпорфирин I; 6 – копропорфирин I; 7 – копропорфирин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX); 9 – мезопорфирин IX; 10 – протопорфирин IX

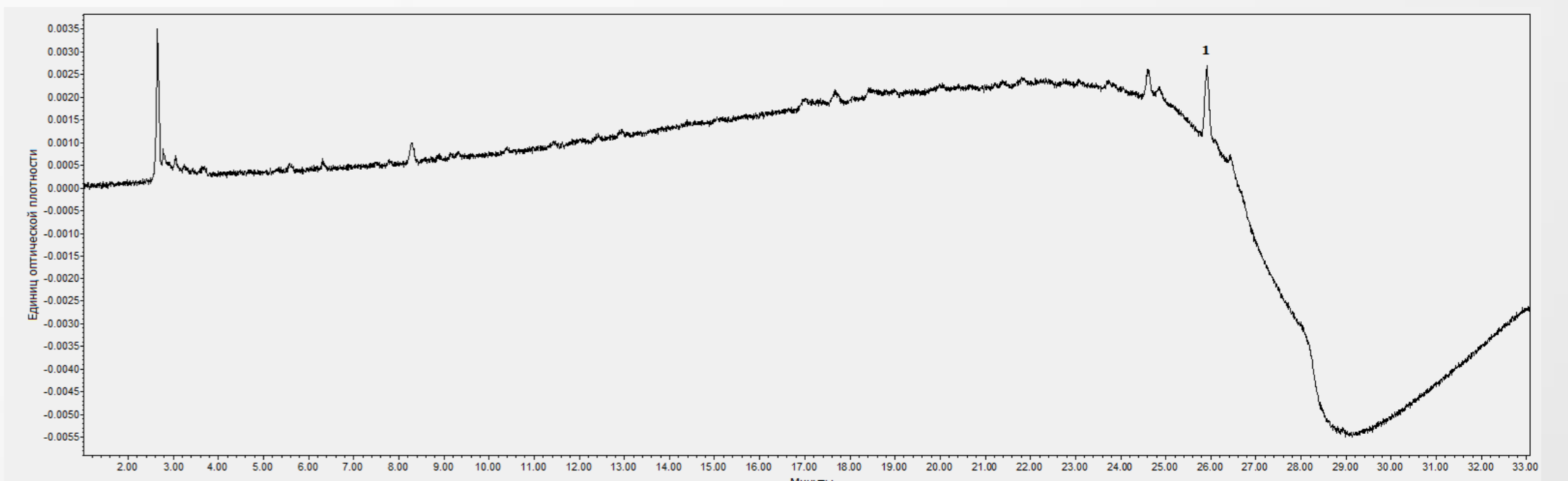


Рис. 3. Хроматограмма контрольной донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта : 1 — внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX)

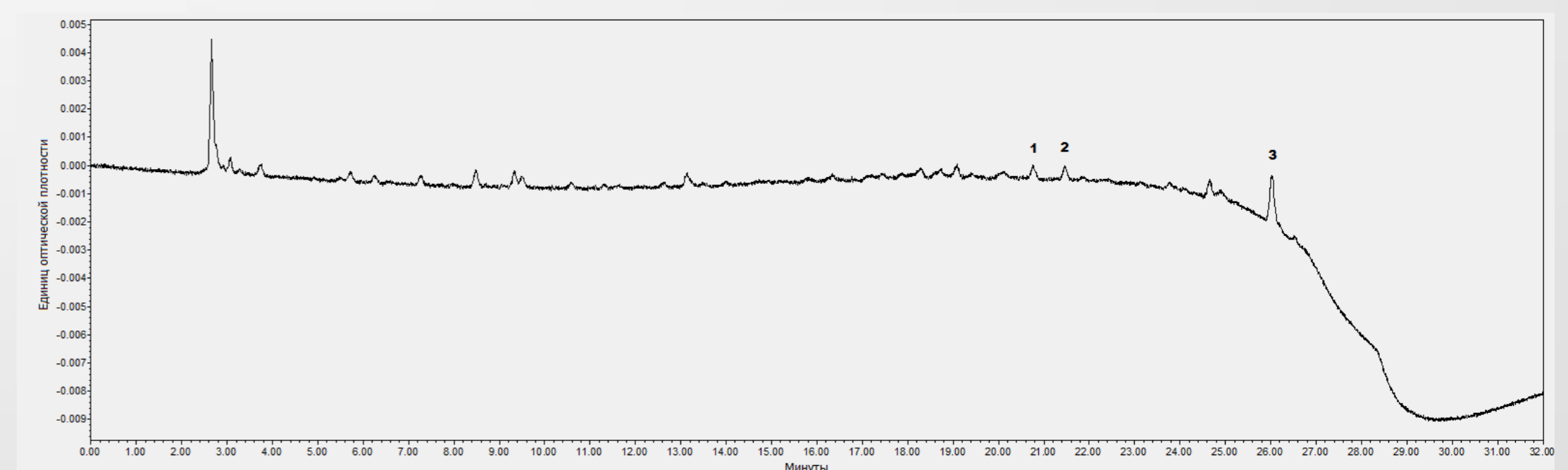


Рис. 4. Хроматограмма мочи пациента с подозрением на копропорфирию: 1 – копропорфирин I; 2 – копропорфирин III; 3 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX)

Список литературы

1. Пустовойт Я.С., Кравченко С.К., Шмаков Р.Г., Савченко В.Г.; «ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОСТРЫХ ПОРФИРИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ», Москва 2018 г.
2. Macours P. Improvement in HPLC separation of porphyrin isomers and application to biochemical diagnosis of porphyrias. Clin Chem Lab Med 2006; 44 (12): 1433–40.
3. Hindmarsh J.T., Oliveras L. Biochemical Differentiation of the Porphyrins Clin Biochem 1999; 32 (8): 609–19.]
4. Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrins. Lancet. 2010 Mar 13;375(9718):924-37. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61925-5. PMID: 20226990.
5. Биохимия: учебник для вузов. Под ред. Северина Е.С. 5-е изд. М.; 2009. 768 с.
6. А.И. Пузикова, Е.А. Литвин, Д.А. Кильдюшкин, А.Е. Друй. «Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в диагностике порфирий», Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (3): 140–144. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-3-140-144