

*На правах рукописи*



**Кильдюшкин Даниил Андреевич**

**Создание подходов определения порфиринов в биологических жидкостях пациентов  
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диагностическими целями**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научные руководители:**

кандидат фармацевтических наук, доцент  
кандидат биологических наук

**Петухов Алексей Евгеньевич**  
**Литвин Евгений Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Гаевая Людмила Михайловна** – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел качества и технологии лекарственных средств, лаборатория стандартизации и контроля качества лекарственных средств, ведущий научный сотрудник

**Калёкин Роман Анатольевич** – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований, заведующий лабораторией

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита состоится «20» марта 2024 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор \_\_\_\_\_



Демина Наталья Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Порфирии представляют собой группу орфанных метаболических заболеваний, возникающих в результате нарушения биосинтеза гема. Общей характеристикой данных патологических состояний служит накопление порфиринов преимущественно в тканях, наиболее активных в биосинтезе гема, – печени и костном мозге. В современной классификации принято выделять эритропоэтические и печёночные порфирии, которые характеризуются неврологическими или кожными клиническими проявлениями. Тип порфирии определяется видом промежуточных веществ, накапливающихся в организме. По качественному и количественному составу предшественников гема можно определить тип заболевания и, как следствие, правильно подобрать лечение. Большая часть порфирий имеет наследственный характер передачи.

У некоторых пациентов заболевание может протекать бессимптомно. При исследовании и лечении данной патологии возникают трудности, причинами которых являются низкая диагностируемость и латентность протекания. Решением этих проблем стали разработка и дальнейшее использование универсальных и чувствительных методик обнаружения порфиринов в биоматериале пациентов. Порфириновые острые атаки могут быть инициированы применением подвергающихся метаболизму системой цитохрома P-450 (СYP) групп лекарственных препаратов, как НПВП, барбитураты, некоторые антибиотики, сульфаниламиды, и др. В случае диагностирования спорадической порфирии при помощи разработанных методик следует скорректировать дальнейшую фармакотерапию пациента, поэтому их возможно применять в качестве инструмента персонализированной медицины.

На данный момент существуют различные методы для выявления маркеров порфирий в крови. Иммуноферментный метод обладает высокой чувствительностью и селективностью, но используется только при анализе одного аналита. Генетическое тестирование – один из лучших методов диагностики, но во время его выполнения требуется предварительная подготовка, чтобы определить какое именно заболевание необходимо идентифицировать. Оно также требует много времени на проведение, специализированного оборудования и больших финансовых затрат как на расходные материалы, так и на амортизацию оборудования.

Порфирины принадлежат к группе водорастворимых тетрапиррольных макроциклов, которые можно разделять методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Длинная цепь сопряжения в структуре макроцикла обеспечивает максимум полосы поглощения в ультрафиолетовом спектре длинноволновой области (полоса  $Sore \approx 400$  нм). Некоторые порфирины, такие как протопорфирин IX, мезопорфирин IX являются лекарственными

средствами или фармакологически активными метаболитами. Разработка подходов для выявления маркеров порфирий методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием в биологических жидкостях для проведения фармакокинетики и терапевтического лекарственного мониторинга является актуальной задачей.

### **Степень разработанности темы**

В научной литературе можно найти методики анализа биообъектов на содержание порфиринов и их предшественников. В качестве методов используется ВЭЖХ с различными детекторами (масс-селективный, флуоресцентный, ультрафиолетовый), тонкослойная хроматография, иммуноферментный анализ, генетические тесты нового поколения и по Сенгеру, а также химические реакции (с реактивом Эрлиха). Описанные методики способны определять в среднем от 5 до 8 различных порфиринов одновременно.

Однако многие методики не способны дифференцировать различные изомеры порфиринов при анализе, что снижает их диагностическую ценность. Существенными недостатками генетического тестирования являются высокая длительность, стоимость, а также сложность проведения самого анализа. При проведении иммуноферментного анализа, как и теста Уотсона-Шварца возможно определить ограниченное количество аналитов. Применение метода ТСХ ограничивается низкой разрешающей способностью и зависимостью от внешних трудноконтролируемых условий по сравнению с методом ВЭЖХ.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы является разработка и апробирование методик качественного и количественного определения порфиринов в биологических жидкостях организма методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Для достижения цели были определены следующие задачи:

1. Разработать методики качественного и количественного определения лекарственных средств на основе порфиринов, их метаболитов и сопутствующих порфиринов в различных биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ.
2. Провести валидацию разработанных методик количественного определения лекарственных средств на основе порфиринов, их метаболитов и сопутствующих порфиринов в различных биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ.
3. Доказать возможность определения лекарственных средств на основе порфиринов и их метаболитов в присутствии эндогенных порфиринов с помощью разработанных методик.
4. Оценить нормы содержания эндогенных порфиринов в биологических жидкостях в физиологической норме и при патологиях.

5. Применить и оценить разработанные методики в клинической практике, в том числе у пациентов с подозрениями на порфирии с целью последующей оптимизации возможных схем фармакотерапии.

### **Научная новизна**

В результате проведённого исследования автором:

–разработаны высокоселективные методики качественного и количественного определения порфиринов в моче и плазме крови методом ВЭЖХ-УФ.

–проведена валидация методик качественного и количественного определения порфиринов в плазме крови и моче человека методом ВЭЖХ-УФ по основным валидационным требованиям, согласно критериям международных рекомендаций.

–выявлена возможность единовременной идентификации 9 порфиринов в 8 точках нарушения биосинтеза гема, за счёт оптимизации методики с использованием внутреннего стандарта (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX).

–разработан методологический подход к селективному определению лекарственных средств или фармакологически активных метаболитов в присутствии эндогенных порфиринов, что позволяет изучать их фармакокинетику, а также проводить их ТЛМ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанные методики дают возможность эффективно определять порфирины независимо от их природы: эндогенные и экзогенные, и биологической матрицы. Эти методики могут использоваться для проведения терапевтического лекарственного мониторинга ЛС на основе порфиринов для осуществления эффективной и безопасной терапии пациентов.

Методики обнаруживают биохимическую составляющую порфирии для диагностики её типа с диагностической специфичностью равной 79% и чувствительностью – 100% при 95% доверительном интервале с целью коррекции сопутствующей фармакотерапии.

По результатам работы были выведены и экспериментально обоснованы нормы содержания порфиринов в биологических жидкостях, а также были разработаны рекомендации по фармакотерапии пациентов с подозрениями на порфирии, исключая порфириногенные лекарственные средства. Результаты подтверждают перспективность данной темы в совершенствовании диагностики порфирий с помощью хроматографии различных биообъектов пациента, а также использовании в фармакокинетических исследованиях.

## **Методология и методы исследования**

Методология исследования была построена на систематизации и анализе литературных данных, а также оценке существующих методик определения порфиринов в плазме крови и моче человека. В диссертационном исследовании была разработана методика отбора биообразцов (моча и кровь), а на основании изученных и описанных физико-химических свойств порфиринов были разработаны оптимальные способы пробоподготовки в исследуемых биожидкостях. Для качественного и количественного определения порфиринов были разработаны методики параллельного обнаружения и определения 9 метаболитов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. При разработке методик были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения компонентов смеси (подвижная и неподвижная фаза, режим элюирования), позволившие достигнуть необходимой селективности и чувствительности методик. Валидация разработанных методик проводилась согласно отечественным и зарубежным руководствам.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Обоснование использования метода ВЭЖХ с УФ-детектированием при анализе порфиринов, согласно их физико-химическим характеристикам.
2. Разработанные биоаналитические методики качественного и количественного определения порфиринов методом ВЭЖХ-УФ.
3. Итоги валидации биоаналитических методик по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, эффективность процесса, нижний предел количественного определения, стабильность, аналитическая область методики и предел обнаружения.
4. Обоснование использования разработанных методик для изучения фармакокинетики лекарственных средств на основе порфиринов и проведения их ТЛМ в присутствии эндогенных порфиринов.
5. Результаты применения методик в клинической практике, также в роли инструмента персонализированной медицины.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность основывается на проведении валидации разработанных биоаналитических методик в согласии с требованиями Руководства ЕМЕА/CHMP/EWP/192217/2009 и рекомендациями FDA Bioanalytical Method Validation (2013). Статистическая обработка полученных данных была проведена с использованием сертифицированного программного

обеспечения: Empower версии 3.0, входящей в пакет Waters, а также Numbers, Microsoft Excel (2010), OriginPRO 7.0, MedCalc и Medstatistic. Экспериментальные данные получены с применением современных инструментальных методов анализа на проверенном оборудовании. Общие выводы отражают полученные результаты исследований и соответствуют поставленной цели и задачам, что делает их достоверными.

Основные положения работы и результаты исследования доложены на: The 5th International Congress on Pharmacy-Updates (Иран, г. Тегеран, 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Педиатрия и фармация XXI века: проблемы и их решения» (Республика Узбекистан, г. Самарканд, 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Фармация. Вызовы времени» (Республика Беларусь, г. Витебск, 2021 г.); I Международной научно-практической конференции «Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Россия, г. Кемерово, 2021 г.)

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 12 от «03» июля 2023 г.

### **Личный вклад автора**

Автор вносит основополагающий вклад на всех этапах исследования: от информационного поиска до проведения исследований и представления полученных результатов в публикациях, докладах, внедрения в учебную и рабочую деятельность. Авторский вклад состоит в обозначении основных целей и задач, их экспериментально-теоретическом выполнении. Лично автором проведены разработка пробоподготовок, валидации методик в различных биологических жидкостях; выведены нормы содержания порфиринов; рассчитана диагностическая ценность методик, а также обосновано применение методик в изучении фармакокинетики порфириносодержащих препаратов; представлены рекомендации относительно лекарственной терапии порфирий. Практическая часть (отбор проб у добровольцев и доноров, хроматографический анализ) проведена в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева) Минздрава России.

### **Внедрение результатов исследования**

Разработанные и оптимизированные методики количественного и качественного определения порфиринов при помощи ВЭЖХ-УФ внедрены и активно применяются в:

1. В учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени

И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «токсикологическая химия» и «медицинская химия» по направлениям подготовок (специальностей) 33.05.01 Фармация (Акт № 000196 от 08.02.2023);

2. В рабочем процессе Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (Акт № б/н от 22.03.23);

3. В рабочем процессе Института иммунологии в Лаборатории фармакологии и клинической разработки № 51 (Акт № 20/07-23 от 20.07.23).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формулам научных специальностей 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология. Результаты, полученные в ходе исследования, согласуются с областью исследования научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия по пункту 4, а с научной специальностью 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология по пункту 20.

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом и тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237.)

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования опубликовано 8 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включённом в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которой должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук; 2 научные статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 2 иные публикации по результатам исследования, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).



## Структура и объём диссертации

Работа изложена на 140 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, описания методов исследования, заключения, выводов, списка литературы, который включает 127 источников, из них 18 на русском языке и 109 на иностранных языках, а также приложений. Основной текст диссертации содержит 71 рисунок и 29 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В настоящей диссертационной работе для исследования был использован хроматограф Waters Acquity UPLC H-CLASS со следующими модулями: диодно-матричным детектором ACQ-PDA eL (Брюссель, Бельгия), термостатом ACQ-СМ (Брюссель, Бельгия), автосэмплером ACQ-FTN и насосным блоком ACQ-QSM (Брюссель, Бельгия).

При пробоподготовке использовалось следующее оборудование: вортекс-шейкер Biosan Multi Plate Shaker (Рига, Латвия), центрифуга Thermo scientific Heraeus Labo Fuge 200 (Уолтем, США), центрифуга с охлаждением и с роторами Eppendorf Centrifuge 5430R (Гамбург, Германия), 1-канальные автоматические пипетки Gilson Pipetman P100 (20 – 100 мкл), P1000 (200 – 1000 мкл) (Франция). А также расходники: наконечники Omnitip на 20, 200 и 1000 мкл (Варшава, Польша), светонепроницаемые пробирки Safe-lock Eppendorf с защёлкой объёмом 1,5 мл (Гамбург, Германия), виалы из тёмного стекла на 2 мл, биохимические пробирки с гелем Sarstedt (Нюмбрехт, Германия).

Были использованы стандарты порфиринов, включающие уропорфин I (уро I), уропорфин III (уро III), гептакарбоксипорфин (гепта), гексакарбоксипорфин I и III (гекса I и III), пентакарбоксипорфин (пента), копропорфин I (копро I), копропорфин III (копро III), мезопорфин IX (мезо IX) – АФС лекарственного препарата Stanate®, МНН станнсопорфин, и протопорфин IX (прото IX) – активный метаболит лекарственного препарата Аласенс®, МНН аминоклевулиновая кислота, а также 2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфин IX (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве реагентов применены хлористоводородная кислота, уксусная кислота, аммония гидроксид, ацетонитрил и аммония ацетат аналитической степени чистоты (Sigma-Aldrich, США), а также метанол категории «для ВЭЖХ» (Thermo Fisher Scientific, США). Вода деионизованная, донорская плазма и моча предоставлены ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ.

Разделение порфиринов проводили на колонке Phenomenex Luna® C18(2) 250\*4.6 мм, зернением 5 мкм и с предколонкой-фильтром Waters 0,2 мкм. Температура колонки в процессе анализа поддерживалась на уровне комнатной:  $25 \pm 2$  °С.

Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали. Подвижная фаза подавалась градиентом со скоростью потока, равной 0,9 мл/мин (здесь и далее указан процент фазы В): 0мин – 20%; 2мин – 20%; 25мин – 100%; 30мин – 100%; 31мин – 20%; 33мин – 100%; 35мин – 100%; 36мин – 20%; 41мин – 20%.

#### *Приготовление калибровочных растворов и пробоподготовка в моче*

Растворы порфиринов для калибровки готовились из стандартных стоковых растворов порфиринов с исходной концентрацией 2 мкМ. Стандартные стоковые растворы разводили в донорской моче до получения концентраций: 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ. Далее к 500 мкл калибровочных растворов, прибавляли 500 мкл 2М хлористоводородной кислоты и 50 мкл внутреннего стандарта. Все этапы были проведены в светонепроницаемых эппендорфах. Полученную смесь затем смешивали на вортекс-шейкере в течение 10 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 14000 g. Надосадочную жидкость отбирали и вводили в хроматограф. Пробоподготовка образцов мочи производилась аналогичным образом с приготовлением калибровочных растворов.

#### *Приготовление калибровочных растворов и пробоподготовка в плазме крови*

Стандартные растворы порфиринов были приготовлены посредством разведения 2Н HCl из стандартных стоковых растворов, были получены концентрации 312,5 нМ, 625 нМ, 1250 нМ, 2500 нМ, 5000 нМ и 10000 нМ. После чего чистую донорскую плазму смешивали с подкисленными растворами стандартов до получения концентраций 31,25 нМ, 62,5 нМ, 125 нМ, 250 нМ, 500 нМ и 1000 нМ. К 200 мкл плазмы добавляли 50 мкл ВС и смешивали, после чего проводили седиментацию белков плазмы добавлением ацетонитрила объёмом 200 мкл. Далее отделяли супернатант и растворяли осадок 100 мкл гидрата аммиака 1Н и 100 мкл ацетонитрила. Смесь перемешивали и осаждали повторно, после чего объединяли супернатанты. Добавляли 50 мкл HCl (концентрированной) к объединённой смеси стандартов и полученный раствор размешивали на вортекс-шейкере в течение 10 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 14000 g. Образцы вводили в хроматограф в объёме 10 мкл при температуре автосэмплера в  $12 \pm 1$  °С со скоростью потока подвижной фазы 0,9 мл/мин. Время хроматографирования одной пробы составило 41 минуту.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании физико-химических свойств порфиринов и существующих методов их определения был сделан научно обоснованный выбор в пользу метода ВЭЖХ, как наиболее достоверного и селективного метода хроматографии при качественном и количественном анализе. Также был выбран УФ-детектор, который является распространенным, простым в эксплуатации и достаточно чувствительным инструментом при выявлении данного типа веществ. В отличие от описанных методов, таких как NGS-анализ, тест Уотсона-Шварца, ВЭЖХ не имеет таких ограничений, как: наличие узкопрофильных специалистов, высокая стоимость анализа, низкая точность анализа, длительность проведения анализа, сложность воспроизведения.

### **Определение параметров высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором для хроматографического разделения порфиринов**

Процесс определения наиболее подходящей смеси органических растворителей включал несколько этапов. Из-за того, что порфирины являются среднеполярными веществами, то в качестве растворителей использовались полярные соединения, такие как ацетонитрил, метанол и раствор аммония ацетата в воде, доведённый до pH 5,16 при помощи уксусной кислоты в различных соотношениях и смесях. В качестве подвижной фазы сперва была опробована смесь ацетонитрила и метанола в отношении 50:50 с изократическим режимом элюирования. Результат применения такой смеси был признан неудовлетворительным, так как было обнаружено расщепление пика. Во время следующей попытки была осуществлена замена режима элюирования с изократического на градиентный при использовании той же смеси веществ. Время выхода наименее гидрофобного порфирина (уропорфирина I) было определено на 17,6 минуте.

В итоге в качестве подвижной фазы выступил двухкомпонентный градиент:

А – 1М раствор аммония ацетата в воде, доведённый до pH 5,16 при помощи уксусной кислоты; В – 100% метанол.

Было получено более качественное разделение пиков различных стандартов со временем выхода у уропорфирина I в районе 11,5 минут, в связи с чем такое сочетание растворителей при градиентном элюировании было признано оптимальным.

### **Валидация**

Руководства по валидации биоаналитических методик отечественных и международных изданий послужили теоретической базой выбора основных валидационных параметров, таких как: селективность, предел обнаружения, нижний предел количественного определения,

аналитическая область методик, стабильность, линейность, правильность, прецизионность и эффективность процесса.

Для разработанных биоаналитических методик качественного и количественного определения порфиринов в биологических жидкостях (моче и плазме крови) была проведена оценка по критериям валидационных параметров.

### Селективность

Для валидации селективности были проанализированы все 9 стандартов индивидуальных порфиринов вместе с внутренним стандартом (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX). Установлено, что в приведённых условиях в моче и в плазме эндогенные соединения не мешают обнаружению анализируемых веществ и внутреннего стандарта, что и предопределяет высокую селективность и является конкурентным преимуществом методик. Примеры хроматограмм для мочи и для плазмы крови представлены на рисунке 1.

Разработанные методики способны разделить изомеры не только уропорфина (уропорфирин I и уропорфирин III), но и копропорфина (копропорфина I и копропорфирин III), что изображают хроматограммы на рисунке 2 с соответствующими временами удержания (RT, мин).

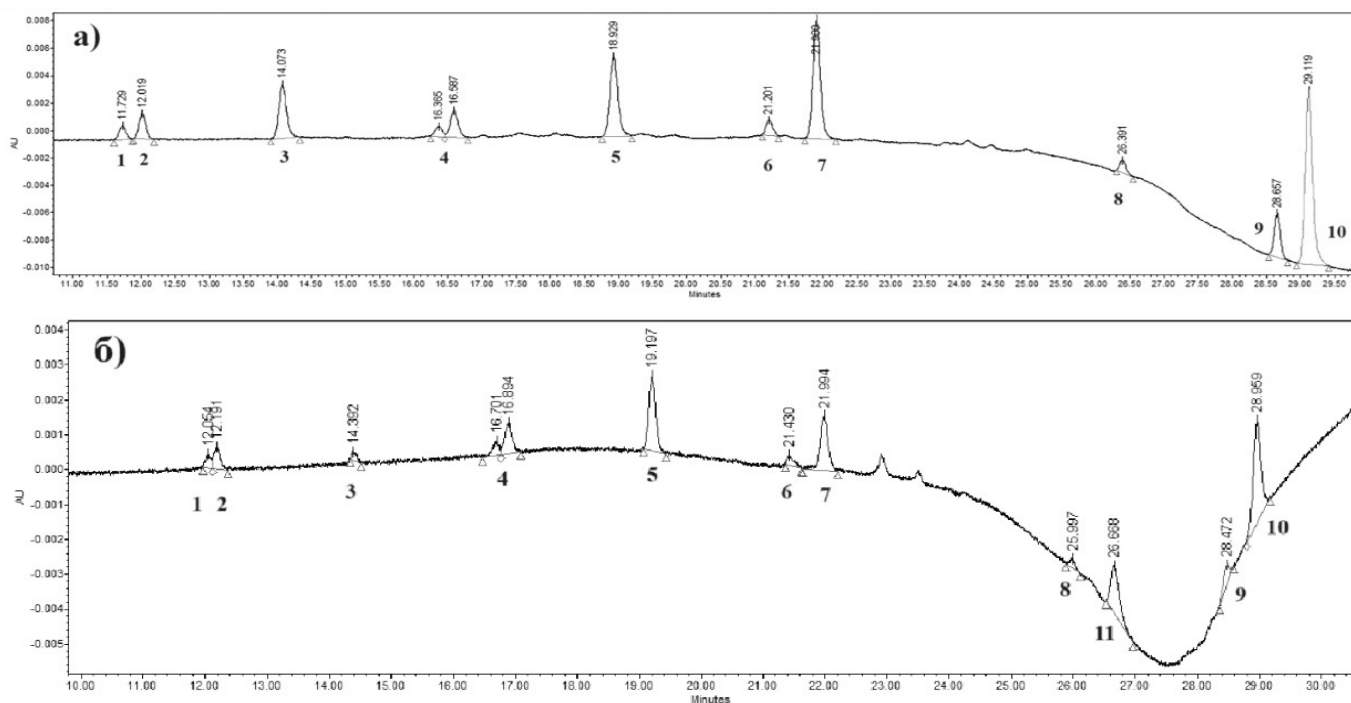


Рисунок 1 – Хроматограммы стандартов порфиринов а) – в моче при индивидуальных концентрациях 95 – 500 нМ; б) – в плазме крови при индивидуальных концентрациях 50 нМ: 1 – уропорфирин I; 2 – уропорфирин III; 3 – гептакарбоксилпорфирин I; 4 – гексакарбоксилпорфирин I; 5 – пентакарбоксилпорфирин I; 6 – копропорфирин I; 7 – копропорфирин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX); 9 – мезопорфирин IX; 10 – протопорфирин IX, 11 – гем

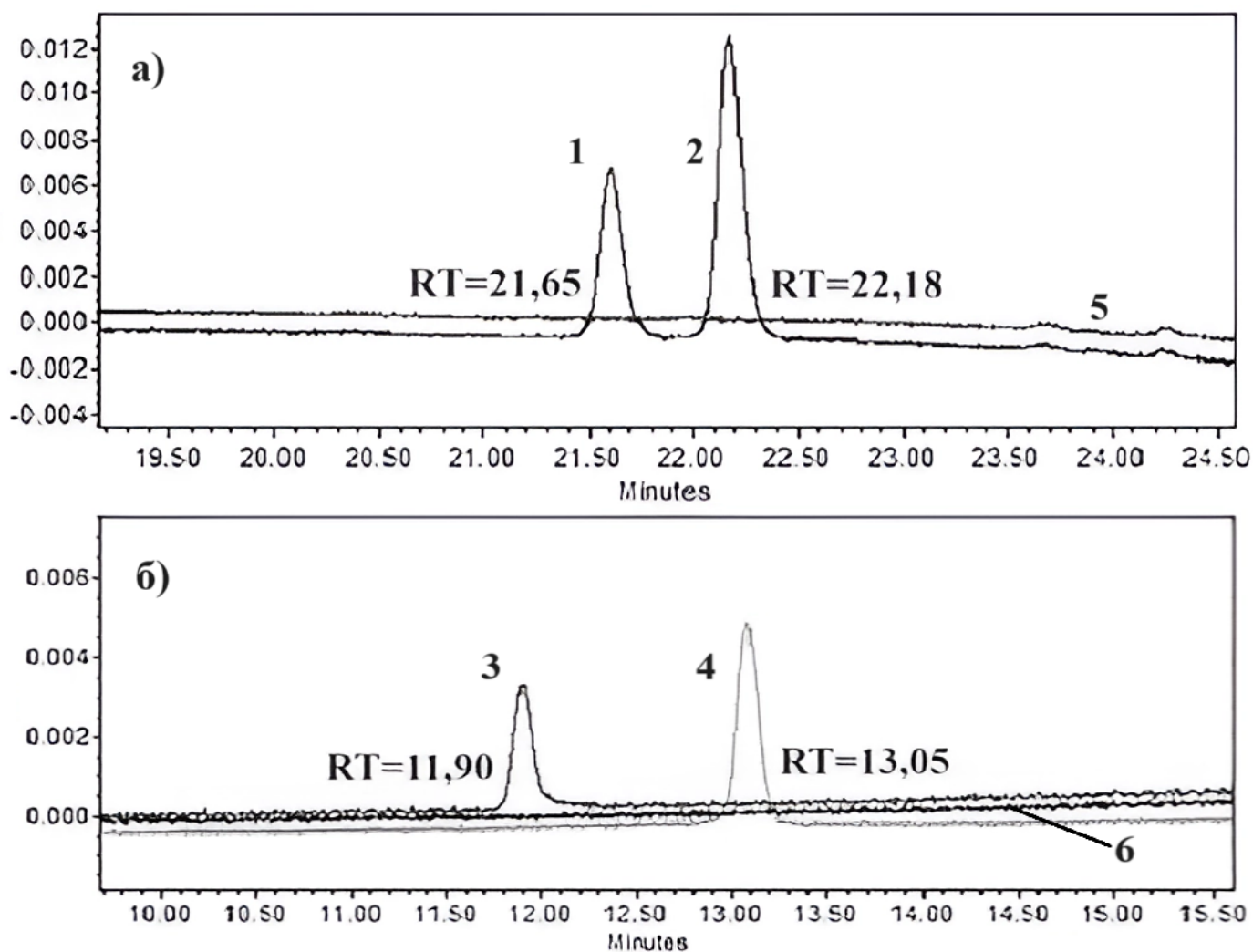


Рисунок 2 – Хроматограммы а) – стандартов копропорфиринов I (1) и III (2) в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (5); б) – стандартов уропорфиринов I (3) и III (4) в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской плазмой (6)

### *Линейность*

В рамках валидации параметра «Линейность» в моче и в плазме крови был проведён анализ 9 донорских образцов с прибавлением стандартных растворов (по 6 повторов для каждого из образцов) уропорфирина I, уропорфирина III, гептакарбоксихпорфирина, гексакарбоксихпорфирина (изомеры I и III для плазмы крови), пентакарбоксихпорфирина, копропорфирина I, копропорфирина III, мезопорфирина IX и протопорфирина IX до получения следующих концентраций: 0 нМ; 31,25 нМ; 62,5 нМ; 125 нМ; 250 нМ; 500 нМ и 1000 нМ соответственно. Итоги проверки валидационного параметра отображены на рисунке 3 для мочи и на рисунке 4 для плазмы крови.

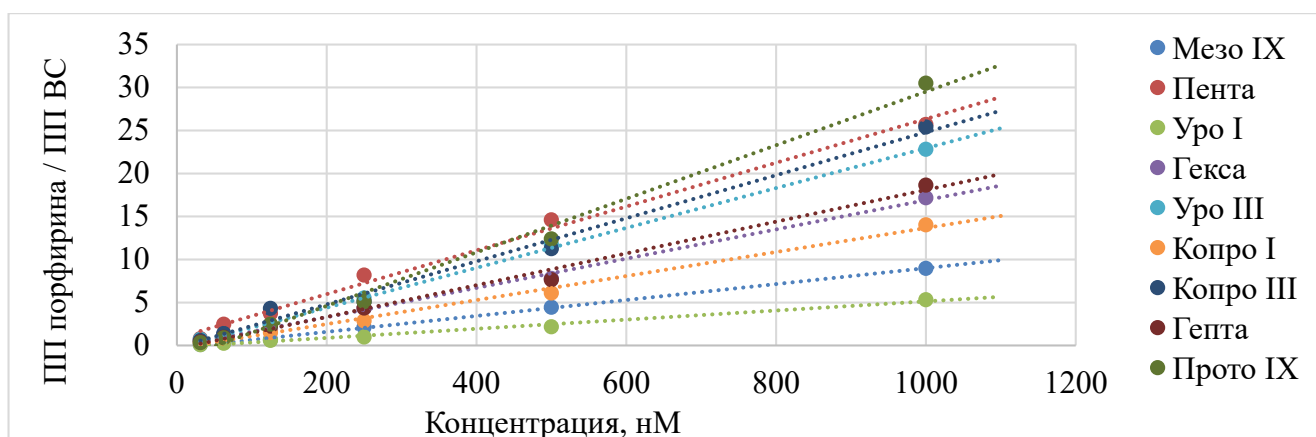


Рисунок 3 – Калибровочные графики стандартов порфиринов в моче

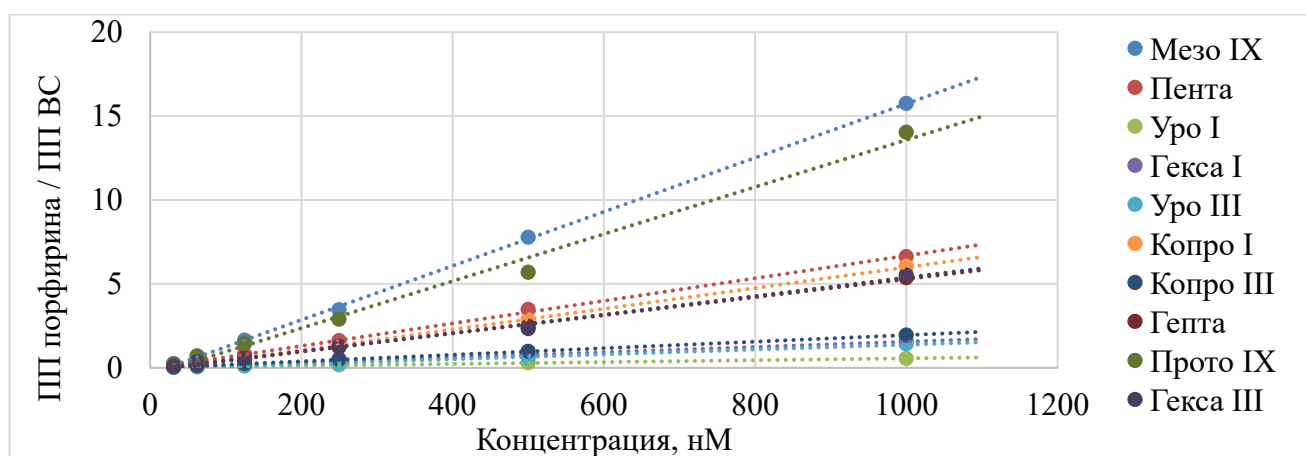


Рисунок 4 – Калибровочные графики стандартов порфиринов в плазме крови

### *Правильность и прецизионность*

Оценка правильности и прецизионности методик была проведена после анализа 9 стандартов в 6 различных концентрациях: 31,25 нМ; 62,5 нМ; 125 нМ; 250 нМ; 500 нМ и 1000 нМ. Каждую пробу хроматографировали 6 раз с целью валидации прецизионности. Было проведено по два анализа в один день с целью определения сходимости. Внутрिलाбораторная прецизионность была оценена по прошествии 3-х дней сдвоенных испытаний стандартов порфиринов. На основании произведённых измерений были рассчитаны: среднее значение ( $\bar{x}$ , нМ), стандартное отклонение (SD, нМ), коэффициент вариации (CV, %), стандартная ошибка среднего (SE, нМ). Относительная погрешность ( $\epsilon$ , %) была рассчитана для оценки параметра правильности. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели прецизионности и правильности для порфиринов в биожидкостях

В моче					В плазме крови					
<i>Истин. конц., нМ</i>	<i>CV, %</i>	<i>Норма CV, %</i>	<i>ε, %</i>	<i>Норма ε, %</i>	<i>Истин. конц., нМ</i>	<i>CV, %</i>	<i>Норма CV, %</i>	<i>ε, %</i>	<i>Норма ε, %</i>	
<b>Мезопорфирин IX</b>										
1000	3,72	< 15	0,78	[-20, 20]	1000	1,73	< 15	0,62	[-20, 20]	
31,25	7,06	< 20	-1,01		31,25	17,39	< 20	5,00		
<b>Пентакарбоксихпорфирин</b>										
1000	3,69	< 15	0,41	[-20, 20]	1000	3,17	< 15	-0,35	[-20, 20]	
31,25	19,84	< 20	-10,18		31,25	14,35	< 20	5,65		
<b>Копропорфирин I</b>										
1000	6,53	< 15	4,31	[-20, 20]	1000	3,69	< 15	0,46	[-20, 20]	
31,25	14,51	< 20	5,42		31,25	15,09	< 20	14,17		
<b>Протопорфирин IX</b>										
1000	2,19	< 15	0,15	[-20, 20]	1000	2,53	< 15	0,04	[-20, 20]	
31,25	12,17	< 20	16,83		31,25	16,55	< 20	6,55		
<b>Уропорфирин I</b>										
1000	3,52	< 15	1,82	[-20, 20]	1000	3,58	< 15	1,05	[-20, 20]	
31,25	7,48	< 20	14,03		31,25	18,46	< 20	-5,93		
<b>Гексакарбоксихпорфирин</b>					<b>Гексакарбоксихпорфирин I</b>					
1000	2,24	< 15	1,46	[-20, 20]	1000	2,21	< 15	0,52	[-20, 20]	
					31,25	17,51	< 20	-15,46		
<b>Гексакарбоксихпорфирин III</b>					1000	2,38	< 15	1,86	[-20, 20]	
31,25	18,38	< 20	17,31		31,25	17,08	< 20	7,03		
<b>Гептакарбоксихпорфирин</b>										
1000	4,84	< 15	3,79	[-20, 20]	1000	4,64	< 15	-0,90	[-20, 20]	
31,25	16,84	< 20	-2,03		31,25	16,02	< 20	19,94		
<b>Уропорфирин III</b>										
1000	5,46	< 15	-2,77	[-20, 20]	1000	3,12	< 15	2,37	[-20, 20]	
31,25	13,94	< 20	17,08		31,25	19,72	< 20	8,75		
<b>Копропорфирин III</b>										
1000	4,41	< 15	1,55	[-20, 20]	1000	3,70	< 15	-2,48	[-20, 20]	
31,25	19,96	< 20	7,44		31,25	16,63	< 20	11,29		

### *Нижний предел количественного определения и предел обнаружения*

Нижний предел количественного определения методик был найден, основываясь на данных линейности, правильности и прецизионности. На уровне 62,5 нМ получилось определять порфирины с высокой точностью.

Предел обнаружения (наименьшая концентрация), при котором с помощью данных методик можно с предельной точностью отделить искомые аналиты от фоновых шумов во время анализа образцов, равняется 31,25 нМ.

### *Аналитическая область методик*

В рамках проведённой работы была определена аналитическая область разработанных методик в границах от 31,25 нМ до 1000 нМ.

### *Стабильность*

Стабильность была подтверждена для стандартных стоковых растворов в моче и плазме каждого из порфиринов (при хранении растворов в течение 3 месяцев при температуре +4 С<sup>0</sup>). Были отдельно установлены кратковременная стабильность для проб, приготовленных в течение суток при использовании на следующий день, а также долговременная, при которой образцы хранились в течение 1 месяца в морозильной камере при температуре -40 С<sup>0</sup> на уровнях концентраций 31,25 нМ, 62,5 нМ, 125 нМ, 250 нМ, 500 нМ и 1000 нМ. В процессе валидации рабочие образцы показали стабильность при дальнейших испытаниях после повторяющихся этапов заморозки-разморозки.

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПОРФИРИНОВ**

Разработанные и валидированные методики по количественному и качественному определению порфиринов успешно внедрены в работу ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ. Была проведена серия исследований у добровольцев с целью установления норм по содержанию порфиринов в моче или плазме здорового человека.

### *Дизайн исследования биоматериалов с целью установления норм содержания порфиринов*

Исследование мочи проводили у 10 добровольцев НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Анализ плазмы крови проводили у 52 добровольцев Центра клинического изучения



лекарственных средств Сеченовского университета, согласно Постановлению Правительства РФ от 22 июня 2019 г. N 797. Все добровольцы – мужчины и женщины в возрасте от 20 до 40 лет.

*Нормы определения порфиринов в моче и плазме*

После анализа изученных данных по нормам содержания порфиринов в моче и плазме крови у западных и отечественных обозревателей, 10 проб для мочи и 52 проб для плазмы, полученных от потенциально здоровых добровольцев, были выведены нормы по содержанию порфиринов, отражённые в таблице 2. После анализа собранных данных по нормам порфиринов и разработки референсных значений в лаборатории прикладной и фундаментальной фармакологии получается, что разработанные методики могут служить качественным подтверждением наличия противопоказания при применении лекарственных средств на основе порфиринов. Для порфиринов со значениями нормы на уровне 0 нМ любой сигнал, отличающийся от шумов, служит сигналом для проведения исследований.

Таблица 2 – Нормы содержания порфиринов в биожидкостях

<b>В моче</b>				<b>В плазме</b>			
<i>Тип порф.</i>	<i>Нормы разработанных методик, нМ</i>	<i>Нормы по O. Dogan, нМ</i>	<i>Нормы по А.А. Кишкуну, нМ</i>	<i>Тип порф.</i>	<i>Нормы разработанных методик, нМ</i>	<i>Нормы по энциклопедии А.Д.А.М., нМ</i>	<i>Нормы по А.А. Кишкуну, нМ</i>
<b>Уро I</b>	0 – 70,5	< 35	12 – 37	<b>Уро I</b>	Сумма конц. изомеров 0 – 32	Сумма конц. изомеров < 2,4	Нет данных
<b>Уро III</b>	0 – 32	Нет данных		<b>Уро III</b>			
<b>Гепта</b>	0 – 33	< 8	Нет данных	<b>Гепта</b>	0 ~ следовые конц.	Нет данных	Нет данных
<b>Гекса</b>	0 – 32	< 3	Нет данных	<b>Гекса I</b>	Сумма конц. изомеров = 0 ~ следовые конц.	Нет данных	Нет данных
				<b>Гекса III</b>			
<b>Пента</b>	0 ~ следовые конц.	< 6	Нет данных	<b>Пента</b>	0 – 32	Нет данных	Нет данных
<b>Копро I</b>	0 – 32	< 30	75 – 240	<b>Копро I</b>	0 – 40	Сумма конц. изомеров < 30	Сумма конц. изомеров 0,75 – 3,0
<b>Копро III</b>	0 – 32	< 90		<b>Копро III</b>	0 – 32		

Продолжение таблицы 2

<b>Мезо IX</b>	0 ~ следовые конц.	Нет данных	Нет данных	<b>Мезо IX</b>	0 ~ следовые конц.	Нет данных	Нет данных
<b>Прото IX</b>	0 ~ следовые конц.	Нет данных	Нет данных	<b>Прото IX</b>	0 – 280	< 280 – 1070	7,2 – 93,6

В обзоре литературных источников обсуждалось, что у женщин приступы при некоторых порфириях возникают чаще, чем у мужчин. В результате было решено разделить добровольцев на мужскую и женскую группы, но дополнительное разделение и исследование групп по половому признаку в представленной выборке не показало явных различий, которые могли бы повлиять на диагностику порфиринов.

#### *Описание параметров специфичности и чувствительности*

Диагностическая специфичность равна 79%, а чувствительность – 100% при 95% доверительном интервале. Такой высокий процент доказывает, что применение данных методик предупреждает обострения и оценивать риски возникновения латентных порфирий в рамках персонализированной медицины.

По полученным после исследования данным были рассчитаны значения точного критерия Фишера ( $0,00000... < 0,05$ ) и критерия хи-квадрат Пирсона ( $28,364 > 0,001$ ) при помощи Medstatistic, которые обнаруживают наличие сильной взаимосвязи (по нормированному значению коэффициента Пирсона = 0,73) между обнаружением набора порфиринов и вероятностью наличия порфирии.

#### *Использование методик при дальнейшем исследовании лекарственных средств на основе порфиринов*

Фотосенсибилизаторы представлены рядом лекарственных препаратов различных классов и происхождения со спектром поглощения до 600 нм. Разработанные методики позволяют определять те из них, которые обладают интенсивной полосой поглощения на уровне  $\approx 400$  нм. Что также справедливо для исследований фармакокинетики этих препаратов и проведения ТЛМ.

Определение уровня протопорфирина IX, как активного метаболита фотосенсибилизирующего препарата Аласенс® (МНН аминоклевулиновая кислота), в плазме крови способствует оценке эффективности терапии различных онкологий с помощью аминоклевулиновой кислоты, используемой как пролекарство. Содержание мезопорфирина IX

(компонента лекарственного средства станнсопорфин) – эффективность терапии гипербилирубинемии. Разработанная методика позволяет определять лекарственное вещество (мезопорфирин IX) и активный метаболит лекарственного вещества (протопорфирин IX) одновременно в присутствии эндогенных соединений, которые могли бы помешать анализу.

Хроматограммы протопорфирина IX и мезопорфирина IX с использованием ВС в плазме крови доноров с указанными временами удержания (RT, мин) представлены на рисунке 5.

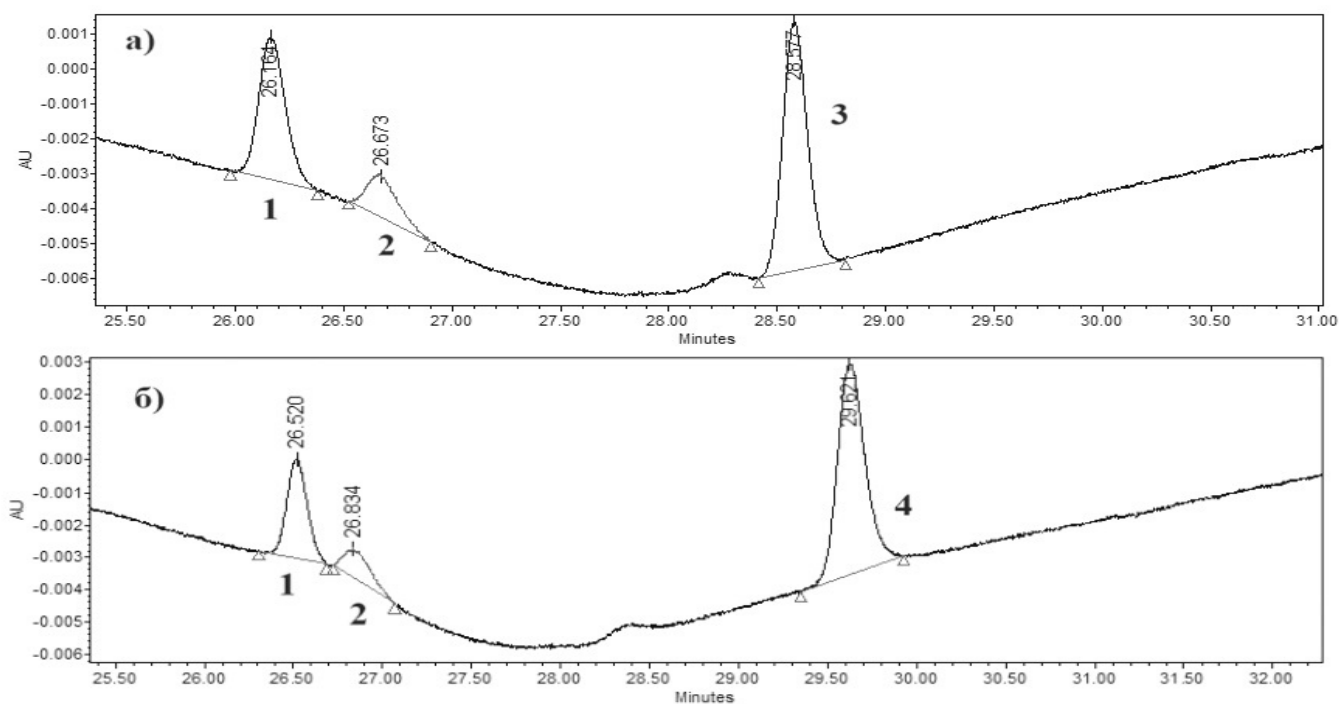


Рисунок 5 – Хроматограммы а) – плазмы крови здорового добровольца с содержанием мезопорфирина IX (3) в сравнении с ВС (1); б) – плазмы крови здорового добровольца с содержанием протопорфирина IX (4) в сравнении с ВС (1)

Примечания: 4 – гем

Даже в случае совместного присутствия мезопорфирина IX и протопорфирина IX методика обладает надлежащей разделяющей способностью, что подтверждается рисунком 6.

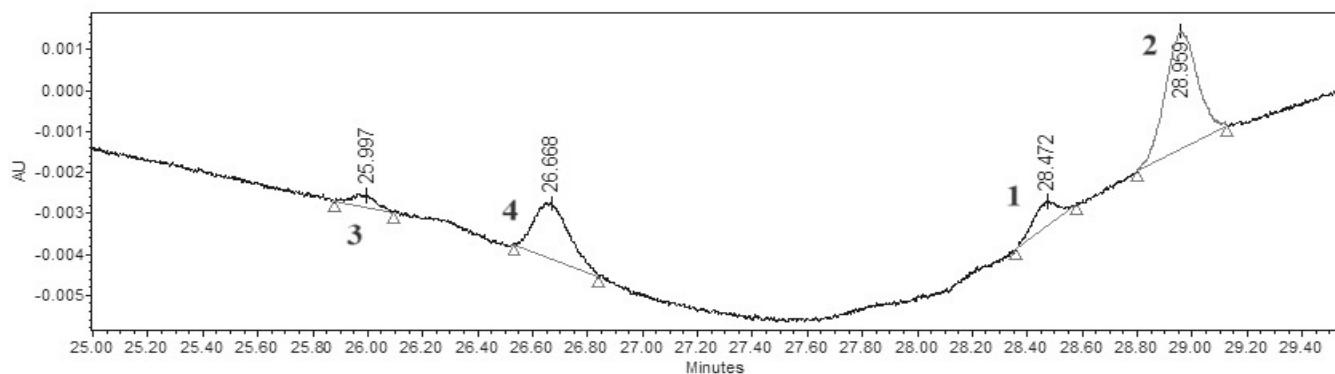


Рисунок 6 – Хроматограмма плазмы крови с содержанием мезопорфирина IX (1) и протопорфирина XI (2) в сравнении с ВС (3)

Примечания: 4 – гем

При обследовании пациентов у клинических специалистов возникают подозрения о наличии порфирии. С целью уточнения наличия или отсутствия порфиринов в биоматериалах пациентов в лаборатории прикладной и фундаментальной фармакологии проводится исследование этих анализитов. Если на анализ присылают образцы с подозрениями на заболевания, сходными по патофизиологии с порфириями, также осуществляется дополнительное исследование на порфирины. На основании полученных результатов в клинике проставляется окончательный диагноз. Необходимо также в случае постановки положительного диагноза порфирии у пациента проверить его родственников на предмет наличия данного типа патологий. В другом случае, если у кого-то из родственников был выявлен какой-либо из типов порфирий, человеку следует провести исследование биоматериалов на наличие порфиринов.

Далее представлены результаты анализов пациентов, чьи биообразцы были присланы в лабораторию для уточнения вида порфиринов. Хроматограммы пациента Y отражена на рисунке 7. Все хроматограммы представлены с указанными временами удержания (RT, мин).

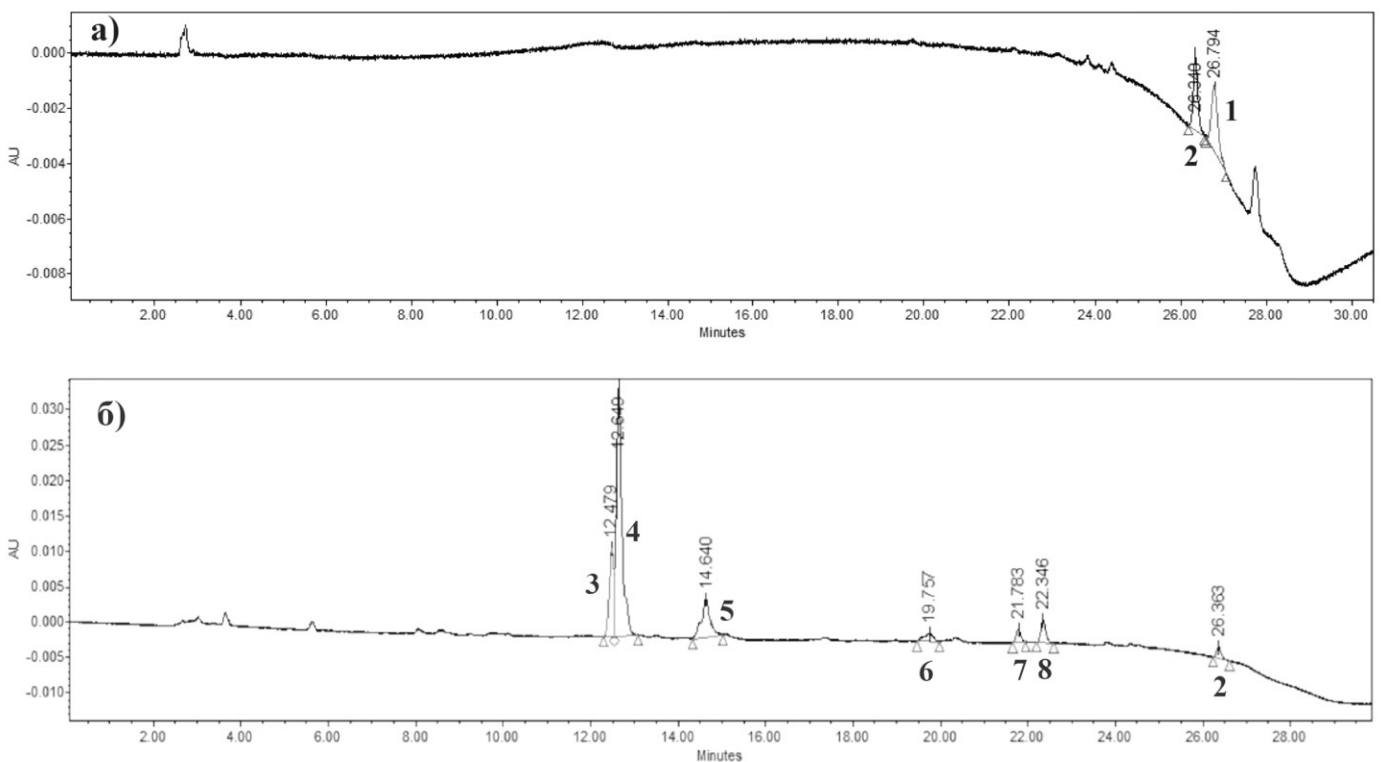


Рисунок 7 – Хроматограммы пациента Y: а) – плазмы крови с сигналами гема (1) и внутреннего стандарта (2); б) – мочи с повышенным содержанием суммы сигналов изомеров уропорфирина I (3) и уропорфирина III (4), гептакарбоксипорфирина (5), пентакарбоксипорфирина (6), копропорфирина I (7) и копропорфирина III (8) в сравнении с ВС (2)

Во избежание возникновения постановки ложноотрицательного диагноза необходимо провести анализ обоих биоматериалов у пациента (мочи и крови). Как видно на хроматограммах пациента Y, картина выхода порфиринов отличается при исследовании различных биоматериалов, а именно в моче обнаруживаются уропорфирин I, уропорфирин III,

гептакарбоксихлорофитин, пентакарбоксихлорофитин, копропорфитин I и копропорфитин III, в то время как в плазме крови их значения вписываются в норму – исследование только плазмы крови дало бы ложноотрицательный результат.

Данные результаты свидетельствуют о необходимости применения всех разработанных методик определения порфиринов в различных биоматериалах пациентов для наилучшей превентивной диагностики, так как предугадать наиболее информативный по наличию в нём порфиринов биоматериал заранее не представляется возможным.

#### *Применение методик в рамках персонализированной медицины*

Разработанный алгоритм использования методик при персонализированной медицине представлен на рисунке 8.



Рисунок 8 – Алгоритм применения методик в рамках персонализированной медицины

Клиническим специалистам также были предоставлены рекомендации относительно лекарственной терапии пациентов, которым был поставлен диагноз порфирии или в результате анализа были выявлены превышения норм по содержанию порфиринов, во избежание провоцирования острых атак или других клинических проявлений. Рекомендации включали в себя ограничения по применению следующих групп лекарственных средств: сульфаниламиды; препараты сульфонилмочевины, обладающие сахароснижающим действием; барбитураты; противогрибковые препараты, применяемые для системного лечения; антибиотики, активные в

отношении *M.tuberculosis*; производные спорыньи; антиретровирусные препараты; прогестагены; противосудорожные препараты; НПВП; антидепрессанты; нейролептики.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. По результатам проведения анализа литературных источников и эмпирического материала о свойствах порфиринов и различных методов по их исследованию выбран прецизионный метод – ВЭЖХ с УФ-детектированием. Реализована пробоподготовка исследуемых биоматериалов. Для плазмы крови применяли ацетонитрил для осаждения белков. Для мочи был использован модифицированный метод Dilute-and-Shoot. Оптимизированы условия хроматографического разделения с использованием градиентного элюирования. Количественная идентификация порфиринов была проведена с применением внутреннего стандарта (ксенобиотика, не встречающегося в организме человека), что позволило нивелировать матричное влияние на пробы. В результате были разработаны методики качественного и количественного определения порфиринов с аналитической областью в границах от 31,25 нМ до 1000,0 нМ.

2. Валидированы разработанные методики в соответствии с установленными нормативами отечественных и международных рекомендаций по параметрам:

- селективность – определение 9 порфиринов + ВС, включая изомеры;
- предел обнаружения – составил 31,25 нМ
- нижний предел количественного определения – составил 62,5 нМ;
- линейность методики была доказана в диапазоне от 0 нМ до 1000,0 нМ;
- правильность – относительная погрешность ( $\epsilon$ ) находится в пределах  $[-20\%, 20\%]$  для каждого из порфиринов;
- прецизионность – при концентрации на уровне НПКО ( $CV$ )  $< 20\%$ , при концентрациях выше уровня НПКО ( $CV$ )  $< 15\%$ ,
- стабильность – образцы плазмы крови были стабильны при кратковременном (хранение – сутки при использовании на следующий день) и долговременном (хранение – месяц при температуре  $-40\text{ C}^0$ ) испытаниях, также они оставались устойчивыми после многократных циклов заморозки-разморозки.

3. Была доказана селективность разработанных методик, что подтверждает тот факт, что они могут использоваться при проведении фармакокинетических исследований и ТЛМ лекарственных средств на основе порфиринов в плазме крови и моче пациентов и добровольцев даже в случае присутствия в биообъектах эндогенных порфиринов.

4. Разработанные нормы содержания эндогенных порфиринов имеют ценность не только для диагностики порфирий, но и при выявлении противопоказаний для проведения фармакотерапии лекарственными средствами на основе порфиринов.

5. Применены и оценены разработанные методики в клинической практике. Выявлена достоверная взаимосвязь (по нормированному значению коэффициента Пирсона = 0,73) между обнаружением порфиринов в биоматериале и постановкой соответствующего диагноза. Диагностическая специфичность и чувствительность, соответственно, составили 79% и 100% при 95% доверительном интервале. Разработаны рекомендации по фармакотерапии пациентов с подозрениями на порфирии, с целью исключения развития острых порфириновых атак.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Использование разработанных методик количественного и качественного определения порфиринов в межбольничных диагностических лабораториях позволит оперативно и достоверно выявлять пациентов с порфириями, что поможет назначить персонализированную фармакотерапию сопутствующих заболеваний у таких пациентов.

Целесообразно использовать разработанные методики для превентивной диагностики пациентов с симптомами, схожими при порфириях, перед назначением лекарственных препаратов, способных провоцировать острые порфириновые атаки.

Методы следует применять для терапевтического мониторинга лекарственных препаратов на основе порфиринов, а также изучения их фармакокинетики.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Дальнейшие научные исследования относительно данной работы будут направлены на поиск увеличения разрешающей способности разработанных методик. Также будут рассмотрены возможности эксплуатации других техник хроматографии, помимо ВЭЖХ, и других детекторов.

Также существуют перспективы по идентификации порфиринов в других биоматериалах человека, или же применении методик к пациентам различных возрастных категорий, пола и национальностей при обнаружении у них данной группы заболеваний. Целесообразно увеличить выборку для установления более обоснованных норм содержания эндогенных порфиринов у людей и определения интервалов у порфиринсодержащих лекарственных средств в рамках их терапевтического лекарственного мониторинга. Аналитическая область методики может быть расширена на другие группы макроциклических тетрапиррольных соединений.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кильдюшкин Д.А. Разработка и валидация методики количественного определения порфиринов и их предшественников методом ВЭЖХ с ультрафиолетовой детекцией в плазме крови человека / Д.А. Кильдюшкин, Е.А. Литвин, А.М. Суханова [и др.] // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2023. – Т.57. – №7. – С. 55 – 60. [Scopus]
2. Пузикова А.И. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в диагностике порфирий. / А.И. Пузикова, Е.А. Литвин, Д.А. Кильдюшкин [и др.] // **Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии**. – 2021. – Том 20. – № 3. – С. 140 – 144. [Scopus]
3. Кильдюшкин Д.А. Порфирии эритропоэтического происхождения: особенности и методы терапии заболеваний / Д.А. Кильдюшкин, Е.А. Литвин, А.Е. Петухов // **Лечение и Профилактика**. – 2022. – Т.12. – №2. – С. 57 – 60.
4. Кильдюшкин Д.А. Разработка и валидация методики количественного определения порфиринов методом ВЭЖХ-УФ в моче / Д.А. Кильдюшкин, А.Е. Петухов, Е.А. Литвин // **Фармакокинетика и фармакодинамика**. – 2022. – №2. – С. 36 – 45.
5. Кильдюшкин Д.А. Создание подходов определения порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диагностическими целями / Д.А. Кильдюшкин, Е.А. Литвин // **Научное знание современности**. – 2021. – Т.12. – №60. – С. 23 – 24.
6. Kildyushkin D.A. Determinations of Porphyrins in Biological Fluids of Patients by HPLC for Diagnostic Purposes / D.A. Kildyushkin, E.A. Litvin, A.E. Petuckov // **Updates International Pharmacy Acta Proceedings of Pharmacy Updates 2022**. – 2022. – С. 105.
7. Кильдюшкин Д.А. Создание подходов определения порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диагностическими целями / Д.А. Кильдюшкин, А.Е. Петухов, Е.А. Литвин // **Сборник тезисов VIII Международного молодежного научного медицинского форума «Белые цветы», Казань, Россия, 2021**. – С. 1104 – 1105.
8. Кильдюшкин Д.А. Определение порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом ВЭЖХ с диагностическими целями / Д.А. Кильдюшкин, А.Е. Петухов, Е.А. Литвин // **Материалы I Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора П. В. Кузнецова «Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации», Кемерово, Россия, 2021**. – С. 115 – 119.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВС – внутренний стандарт  
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
 мкл – микролитр  
 нМ – наномолярный  
 НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты  
 НПКО – нижний предел количественного определения  
 ПП – площадь пика  
 ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг  
 ТСХ – тонкослойная хроматография  
 УФ – ультрафиолетовый  
 CV – коэффициент вариации  
 DnS – разбавление и прямой ввод пробы  
 NGS – секвенирование следующего поколения  
 $R^2$  – коэффициент детерминации  
 RT – время удерживания  
 $\varepsilon$  – предел относительной погрешности