

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

кандидат фармацевтических наук, доцент
Петухов Алексей Евгеньевич

кандидат биологических наук
Литвин Евгений Александрович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Общая характеристика порфирий	15
1.2. Порфирины, как лекарственные вещества или их метаболиты	16
1.3. Роль гема в организме.....	18
1.3.1. Физиологический биосинтез гема	19
1.4. Эпидемиологические данные.....	24
1.5. Печёночные порфирии	25
1.5.1. Острая перемежающаяся (печёночная) порфирия.....	26
1.5.2. Вариегатная порфирия.....	28
1.5.3. Наследственная копропорфирия.....	29
1.5.4. Порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы.....	30
1.5.5. Порфирия кожная медленная.....	31
1.6. Эритропоэтические порфирии	33
1.6.1. Эритропоэтическая протопорфирия.....	33
1.6.2. X-сцепленная доминантная протопорфирия.....	35
1.6.3. Врождённая эритропоэтическая порфирия	36
1.7. Гепатоэритропоэтическая порфирия.....	37
1.8. Структура и физико-химические свойства порфиринов.....	39
1.9. Диагностика порфирий	42
1.9.1. Аналитические методы исследования порфирий	42
1.9.2. Анализ методов пробоподготовки при определении порфиринов в плазме крови и в моче.....	46
1.9.3. Методы отбора проб	48
1.9.4. Нормы содержания порфиринов	49
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51

2.1. Материалы и химические реактивы	51
2.2. Приготовление растворов.....	52
2.3. Оборудование и вспомогательные материалы.....	53
2.4. Подвижная фаза.....	53
2.5. Образцы.....	54
2.6. Сбор образцов.....	54
2.7. Приготовление калибровочных растворов в моче.....	55
2.8. Приготовление калибровочных растворов в плазме крови	55
2.9. Математическая обработка результатов исследования	56
2.10. Валидация биоаналитических методик	56
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ	
ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ В МОЧЕ И ПЛАЗМЕ	
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	
	58
3.1. Определение параметров высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором для хроматографического разделения порфиринов	58
3.2. Условия хроматографирования	61
3.3. Разработка пробоподготовки в различных биоматериалах	62
3.3.1. Пробоподготовка мочи	62
3.3.2. Пробоподготовка плазмы крови	62
3.4. Результаты валидации методик в моче и их обсуждение	62
3.4.1. Валидация и калибровка методик	62
3.4.2. Селективность.....	63
3.4.3. Линейность.....	67
3.4.4. Правильность и прецизионность	72
3.4.5. Влияние биологической матрицы	78
3.4.6. Нижний предел количественного определения и предел обнаружения	80
3.4.7. Аналитическая область методик	81
3.4.8. Стабильность	82
3.5. Результаты валидации методик в плазме и их обсуждение.....	82

3.5.1. Валидация и калибровка методик	82
3.5.2. Селективность.....	82
3.5.3. Линейность.....	85
3.5.4. Прецизионность и правильность	90
3.5.5. Предел обнаружения.....	96
3.5.6. Нижний предел количественного определения и аналитическая область методик.....	96
3.5.7. Стабильность	97
3.5.8. Влияние биологической матрицы	97
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	100
ГЛАВА 4. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРФИРИНОВ	102
4.1. Нормы содержания порфиринов в моче	102
4.1.1. Дизайн исследования мочи с целью установления норм содержания порфиринов	102
4.1.2. Результаты определения порфиринов в моче	102
4.2. Нормы содержания порфиринов в плазме крови.....	104
4.2.1. Дизайн исследования плазмы с целью установления норм содержания порфиринов	104
4.2.2. Результаты определения порфиринов в плазме крови.....	104
4.3. Клиническая и диагностическая ценность методик	107
4.3.1. Подозрения на наличие порфирии у пациентов	107
4.3.2. Использование методик при дальнейшем исследовании лекарственных средств на основе порфиринов	112
4.3.3. Описание параметров специфичности и чувствительности.....	114
4.3.4. Применение методик в рамках персонализированной медицины	115
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	117
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ПРИЛОЖЕНИЕ А	137
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	138
ПРИЛОЖЕНИЕ В	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Порфирии представляют собой группу орфанных метаболических заболеваний, возникающих в результате нарушения биосинтеза гема [12]. 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 [63]. 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 (CYP) групп лекарственных препаратов, как НПВП, барбитураты, некоторые антибиотики, сульфаниламиды, и др [34]. 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 [50]. 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 амортизацию оборудования.

Порфирины принадлежат к группе водорастворимых тетрапиррольных макроциклами, которые можно разделять методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Длинная цепь сопряжения в структуре макроцикла обеспечивает максимум полосы поглощения в ультрафиолетовом спектре длинноволновой области (полоса $S_{0e} \approx 400$ нм) [112]. 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) [41, 100], тонкослойная хроматография, иммуноферментный анализ, генетические тесты нового поколения и по Сенгеру, а также химические реакции (с реактивом Эрлиха) [49, 58, 73, 78]. 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 проведенного 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 счет 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 ее 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 порфирию, 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 EMEA/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 применяются в:

1. В учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «токсикологическая химия» и

«медицинская химия» по направлениям подготовок (специальностей) 33.05.01 Фармация (Акт № 000196 от 08.02.2023) (Приложение А);

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

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспортам 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, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которой должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой 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 объем 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика порфирий

Порфирии – это метаболические заболевания, вызванные наследственными или приобретёнными нарушениями биосинтеза гема. Синтез гема – многостадийный процесс, ферментный блок на любом из его этапов приводит к росту концентрации промежуточных продуктов (порфиринов и/или их предшественников) перед заблокированным участком цепи. Выявление различных порфиринов в плазме, эритроцитах, моче и кале являются базой для диагностического определения дефекта метаболизма, лежащего в основе клинических проявлений заболевания [113]. Каждая порфирия, в зависимости от типа, обладает неврологическими и/или кожными симптомами. В силу неспецифичности и редких проявлений симптомов порфирий затруднены диагностирование и последующий прогноз заболевания [63].

Порфирии классифицируют на эритропоэтические и/или печёночные, в зависимости от основного места накопления промежуточных продуктов биосинтеза гема.

К эритропоэтическим порфириям относятся:

1. Врождённая эритропоэтическая порфирия (СЕР);
2. Эритропоэтическая протопорфирия (ЕРР);
3. X-сцепленная доминантная протопорфирия (ХLДРР).

К печёночным порфириям относятся:

1. Порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы (ADP);
2. Острая перемежающаяся (печёночная) порфирия (AIP);
3. Наследственная копропорфирия (НСР);
4. Вариегатная порфирия (VP);
5. Порфирия кожная медленная (РСТ) [12].

Также существует гепатоэритропоэтическая порфирия (НЕР), которую можно отнести к обеим группам. Порфирии возможно классифицировать на острые и хронические, в таком случае они будут делиться следующим образом:

Острые порфирии:

1. Острая перемежающаяся (печёночная) порфирия.
2. Вариегатная порфирия.
3. Порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы.
4. Эритропоэтическая протопорфирия.
5. Наследственная копропорфирия.
6. X-сцепленная доминантная протопорфирия.

Эти заболевания в первую очередь поражают нервную систему, вызывая эпизодические кризисы, которые зовутся атаками. Основным симптомом такой атаки является боль в животе, часто сопровождающаяся рвотой, гипертонией (повышенным кровяным давлением) и тахикардией (ненормально учащённым пульсом).

К хроническим порфириям относят:

1. Гепатоэритропоэтическая порфирия.
2. Врождённая эритропоэтическая порфирия.
3. Порфирия кожная медленная [12].

При этих видах порфирий атаки не наблюдаются. Для них характерны кожные проявления, также встречающиеся при некоторых острых типах порфирий: VP и НСР. Вместе их иногда классифицируют, как кожные виды порфирий [113].

1.2. Порфирины, как лекарственные вещества или их метаболиты

Порфирины используются в качестве лекарственных веществ или метаболитов пролекарств, поэтому изучение фармакокинетики лекарственных средств на основе порфиринов и проведение ТЛМ имеют важное значение для обеспечения безопасности и эффективности лечения. Эти данные также необходимы для разработки индивидуальных схем лечения, особенно у пациентов

с заболеваниями группы порфирий. ТЛМ позволяет контролировать концентрацию лекарственных средств на основе порфиринов или их фармакологически активных метаболитов в организме пациента. Его проведение может быть особенно важно, так как даже небольшие изменения концентрации могут привести к развитию токсических эффектов, связанных со способностью порфиринов к фотосенсибилизации, или провоцированию острых порфириновых атак.

Лекарственные средства на основе порфиринов используются в медицине при проведении фотодинамической терапии. Этот метод лечения используется для борьбы с определенными видами рака, а также для лечения некоторых кожных заболеваний и инфекций [76]. Фоточувствительные свойства порфиринов являются основой для их использования в фотодинамической терапии. Порфириновые соединения могут абсорбировать свет определенной длины волны и при этом переходить в возбужденное состояние. Этот процесс ведет к выделению реактивных форм кислорода и радикалов, которые повреждают биологические структуры, такие как опухолевые клетки или патогенные микроорганизмы.

При фотодинамической терапии препарат на основе порфиринов вводится в организм пациента, затем выбранная область облучается светом определенной длины волны. Активированный порфирин начинает взаимодействовать со светом, вызывая окислительные процессы, которые разрушают опухолевые клетки или патогенные микроорганизмы.

Важно отметить, что при использовании фотодинамической терапии необходимо тщательно контролировать дозировку препарата и следить за количествами эндогенных порфиринов пациента, чтобы минимизировать риск повреждения окружающих тканей или же провоцирования острых порфириновых атак.

Одним из наиболее известных лекарственных препаратов на основе порфиринов является порфимер натрия. Этот препарат применяется в фотодинамической терапии для лечения различных форм рака, таких как рак кожи, шейки матки, легких, пищевода, мочевого пузыря [75].

Аминолевулиновая кислота также используется при фотодинамической терапии. ALA представляет собой прекурсор протопорфирина IX [27]. Введение ALA приводит к увеличению протопорфирина в опухолевой ткани или других целевых структурах.

В исследовании 2010 года показано, что мезопорфирин IX обладает выраженной неспецифической антимикробной и противогрибковой активностью [71]. При лечении гипербилирубинемии, особенно при наличии генетических нарушений, таких как гемолитическая болезнь новорожденных [96] или синдром Жильбера, препараты на основе порфиринов могут использоваться для снижения уровня билирубина в крови. Предполагается, что мезопорфирин олова может конкурентно и мощно ингибировать активность фермента гемоксигеназы печени и селезенки в течение 24 часов после взаимодействия и, таким образом, блокировать выработку билирубина. Однако данная методика лечения требует большего исследования и оценки эффективности и безопасности перед широким применением в клинической практике.

Эффективность лекарственных средств на основе порфиринов варьируется в зависимости от конкретного применения, однако эти ЛС представляют собой важный инструмент в современной онкологии, дерматологии и в других областях. Для анализа безопасности фармакотерапии группой порфириносодержащих ЛС необходима оценка содержания порфиринов в биожидкостях (моче и плазме).

1.3. Роль гема в организме

Гем необходим для всех клеток и является протетической группой для гемоглобина, миоглобина, цитохрома P450, каталазы и различных других ферментов. Далее будут описаны функции некоторых из них: цитохромы, находящиеся в основном в эндоплазматическом ретикулуме, метаболизируют различные химические вещества, включая лекарственные средства, канцерогены окружающей среды, эндогенные стероиды, витамины, жирные кислоты и простагландины [13]; миоглобин создаёт резерв кислорода, с целью восполнения

временного его недостатка в мышцах; каталаза разлагает пероксид водорода до воды и молекулярного кислорода.

Каждая молекула гемоглобина состоит из четырёх групп гема, окружающих группу глобина, образуя тетраэдрическую структуру. Гем, составляющий всего 4 процента от веса молекулы, состоит из кольцевого органического соединения, известного как порфирин, к которому присоединён атом железа. Этот атом железа связывает кислород, когда кровь движется между лёгкими и тканями. В каждой молекуле гемоглобина четыре атома железа, которые соответственно могут связывать четыре молекулы кислорода. Глобин состоит из двух связанных пар полипептидных цепей [51]. Костный мозг – крупнейший источник гемоглобина. Гем и предшествующий ему протопорфирин железа IX показаны на рисунке 1.

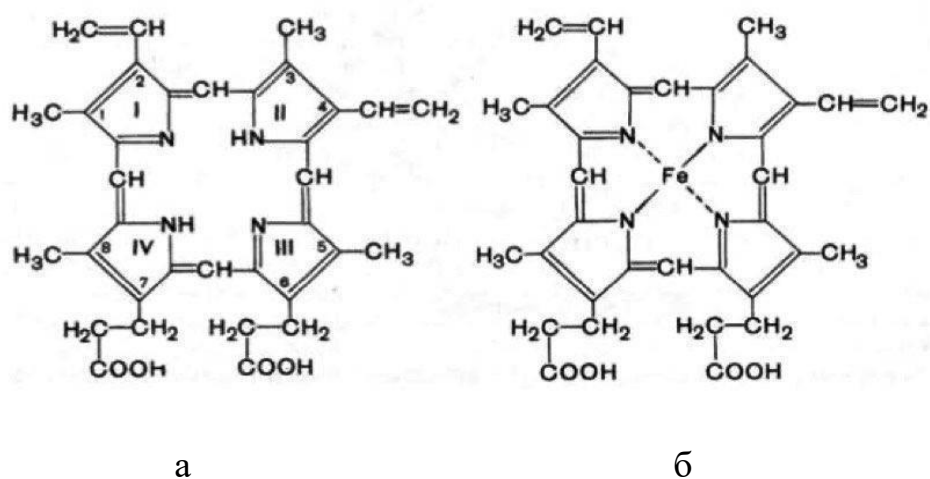


Рисунок 1 – Строение протопорфирин IX (а) и гема (б) [1]

1.3.1. Физиологический биосинтез гема

Каждый из 8 ферментов, участвующих в пути биосинтеза гема, связан с определённым типом порфирии, что отображено в таблице 1. Стадии, происходящие при биосинтезе гема в эукариотических клетках, показаны на рисунке 2. Нарушения, вызываемые при возникновении ферментных блоков, изображены на рисунке 3. Первая и три заключительные стадии биосинтеза

происходят в митохондриях, тогда как четыре промежуточные стадии выполняются в восстанавливающей среде цитозоля. Синтез гема начинается в митохондриях с конденсации сукцинил-КоА с глицином. Эта реакция активируется пиридоксальфосфатом. Отвечающая за эту стадию синтаза аминолевулиновой кислоты (ALAS) является ключевым ферментом всего пути. Экспрессия синтеза ALAS тормозится гемом, т. е. конечным продуктом, и имеющимся ферментом. Это типичный случай торможения конечным продуктом, или ингибирования по типу обратной связи. Молекулы аминолевулиновой кислоты (ALA) проникают в цитоплазму, где их объединение в присутствии ALA-дегидратазы (ALAD) даёт порфобилиноген (PBG), который уже содержит пиррольное кольцо. ALAD ингибируется ионами свинца. Поэтому при острых отравлениях свинцом в крови и моче обнаруживают повышенные концентрации 5-аминолевулината. Четыре молекулы PBG соединяются гидроксиметилбилансинтазой (HMBS), что приводит к образованию линейного тетрапиррола, гидроксиметилбилана (HMB). Далее линейная молекула с участием UROgen III-синтазы (UROS) образует кольцо, которое именуется уропорфириногеном III (UPGIII) [31], который затем окисляется до уропорфирина III. Отсутствие этого фермента приводит к образованию «неправильного» изомера – уропорфириногена I (UPGI) с симметричным строением боковых, ацетатных и пропионатных цепей пиррольного звена. Хотя UPGI может подвергаться декарбоксилированию UROgen-декарбоксилаза (UROD) с образованием гепта-, гекса- и пентакарбоксипорфириногена I и, наконец, копропорфириногена I (CPGI), дальнейший метаболизм невозможен, так как следующий фермент в пути биосинтеза, COPROgen-оксидаза (CPOX), стереоспецифичен для III изомера. UPGI и CPGI окисляются до соответствующих порфиринов. Все ацетильные группы UPGIII декарбоксилируются до метильных групп под действием UROD. Образующийся копропорфириноген III (CPGIII) снова возвращается в митохондрии, который также способен окислять до копропорфирина III. Дальнейшие стадии катализируются ферментами, которые локализованы на/или внутри митохондриальной мембраны. На CPGIII действует CPOX, которая декарбоксилирует и окисляет две пропионовые боковые цепи до

виниловых групп. Получившийся протопорфириноген IX затем проходит стадию окисления PROTOgen-оксидазой (PPOX) до протопорфиринов (для этого ему необходим кислород). Наконец, железо включается в структуру для дальнейшего образования гема при действии фермента феррохелатазы (FECH).

Таблица 1 – Классификация порфирий [14]

Название Name	Мутация в гене (обозначение) Mutated gene (symbol)	Острые симптомы Acute symptoms	Кожные симптомы Cutaneous symptoms
Порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы Delta-aminolevulinic aciduria	ALA-дегидратаза (ALAD) ALA dehydratase (ALAD)	+++	0
Острая перемежающаяся порфирия Acute intermittent porphyria	Гидроксиметилбилан-синтаза (HMBS) Hydroxymethyl-bilane synthase (HMBS)	+++	0
Врождённая эритропоэтическая порфирия Congenital erythropoietic porphyria	UROgen III-синтаза (UROS) UROgen III synthase (UROS)	0	+++
Порфирия кожная медленная Porphyria cutanea tarda	UROgen-декарбоксилаза (UROD) UROgen decarboxylase (UROD)	0	+
Наследственная копропорфирия Hereditary coproporphyria	COPROgen-оксидаза (CPOX) COPROgen oxidase (CPOX)	++	+
Вариегатная порфирия Variegate porphyria	PROTOgen-оксидаза (PPOX) PROTOgen oxidase (PPOX)	++	+
Эритропоэтическая протопорфирия Erythropoietic Protoporphyria	Феррохелатаза Ferrochelataze	0	++
X-сцепленная доминантная протопорфирия X-linked dominant protoporphyria	Синтаза аминолевулиновой кислоты-2 Aminolevulinic acid synthase 2	0	++
Гепатоэритропоэтическая порфирия Hepatoerythropoietic porphyria	UROgen-декарбоксилаза (UROD) UROgen decarboxylase (UROD)	+	++

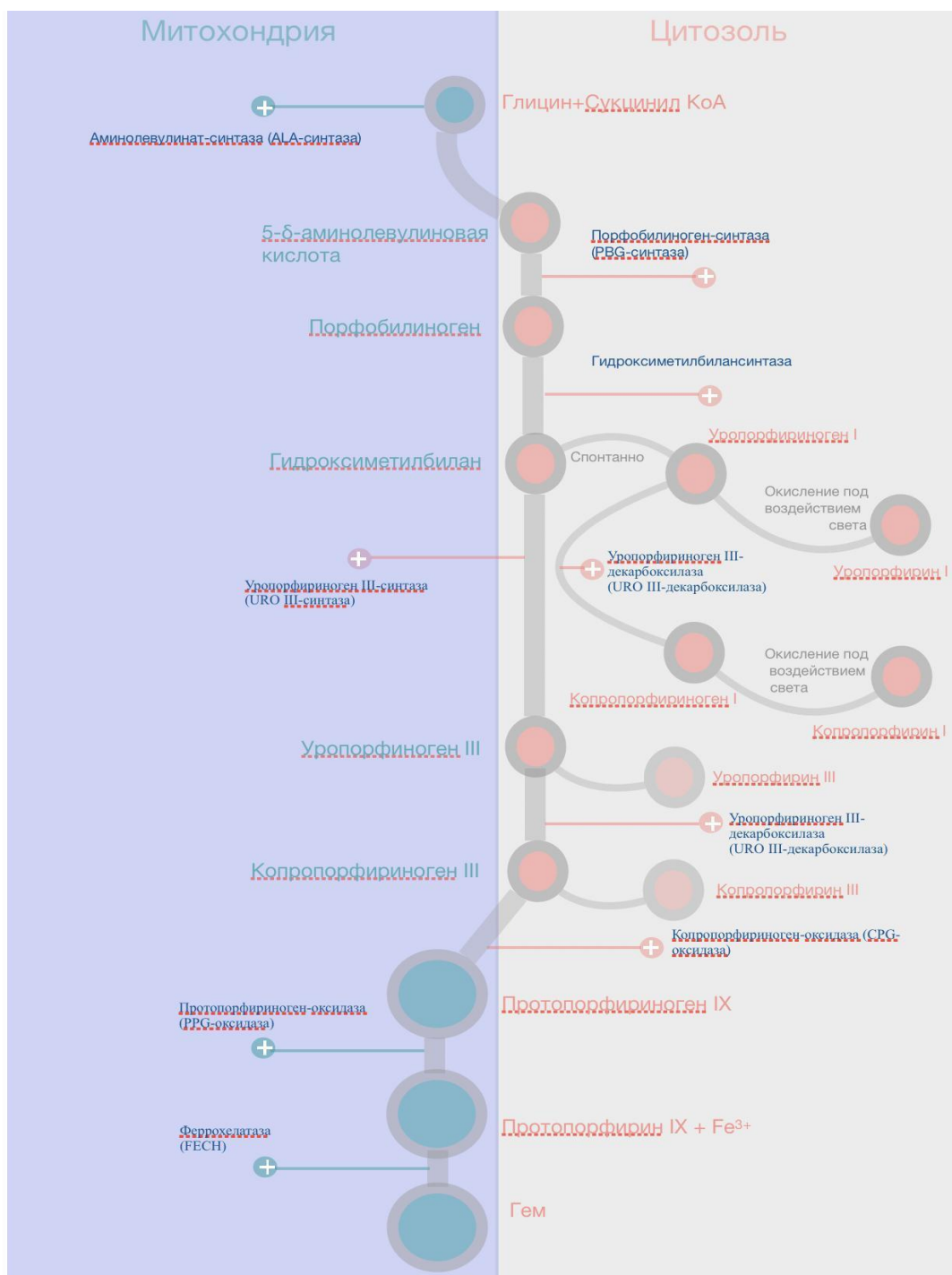


Рисунок 2 – Биосинтез гема

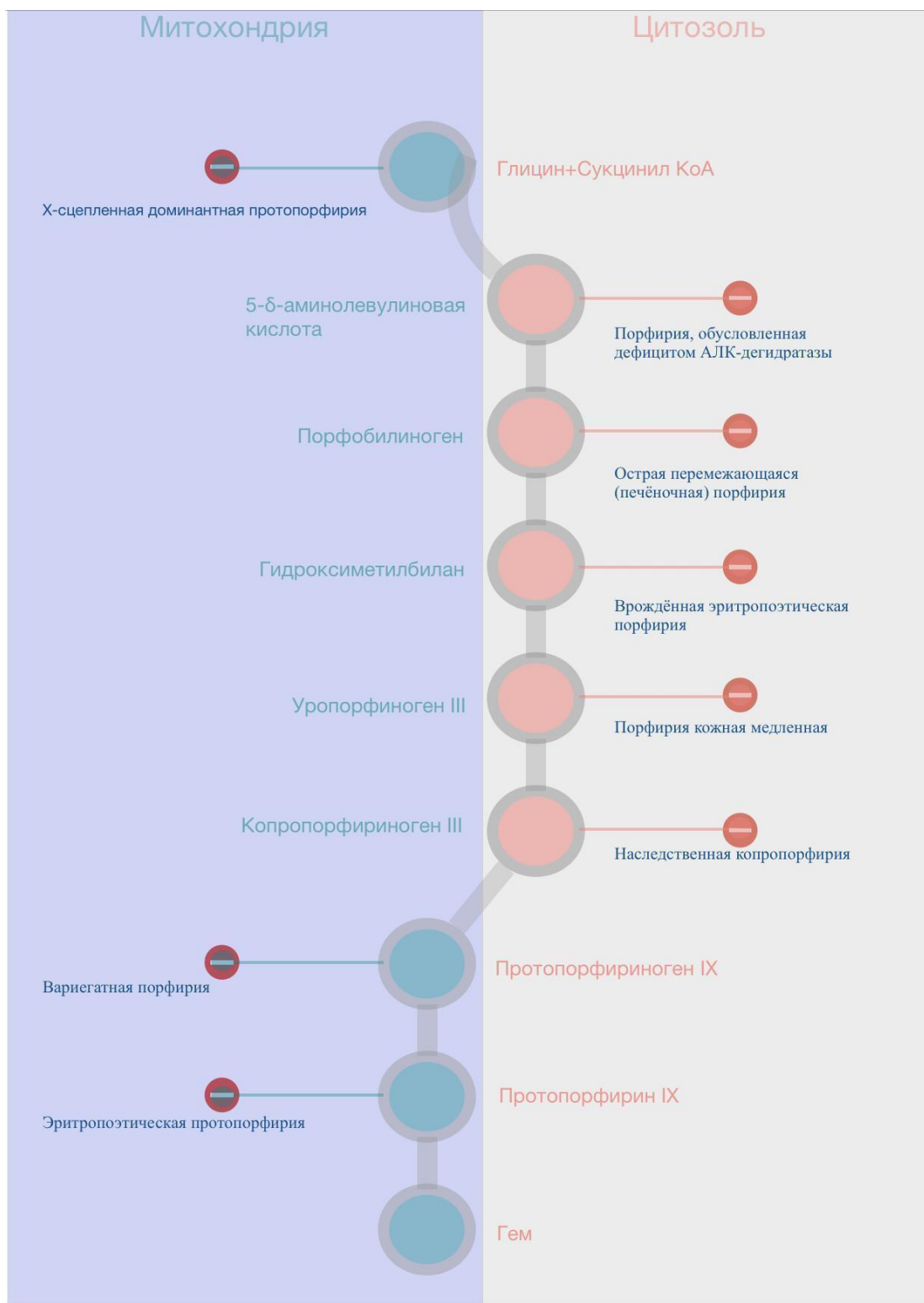


Рисунок 3 – Локализация нарушений в пути биосинтеза гема

1.4. Эпидемиологические данные

Порфирии считаются редкими заболеваниями во всём мире [113]. В США от различных типов порфирий страдают менее 200 000 человек населения. Однако их распространённость трудно оценить. Самым распространённым типом острой порфирии в Европе является AIP. Заболевание встречается у всех этнических групп в большинстве европейских стран [28, 93]. Распространённость AIP составляет 1/75 000 жителей; в северной Швеции 1/1000 из-за «эффекта основателя» [56, 102] и в Финляндии 3/100 000 [121]. Распространённость AIP в Аргентине составляет около 1/125 000 жителей [24]. VP наиболее часто регистрируется в ЮАР (1/300 жителей) из-за эффекта основателя [19, 125]. Распространённость VP в Финляндии оценивается в 2/100 000 жителей [121]; в Аргентине – 1/600 000 [24]. Наследственная копропорфирия (HCP) встречается редко. Точная частота неизвестна. Одно исследование показало, что около одного из 5 000 000 человек в Европе страдают от данного заболевания [121]. ADP встречается крайне редко, и к настоящему времени описано до 10 случаев [115]. Приобретённый PCT - наиболее частая кожная порфирия: распространённость PCT среди европейского населения оценивается в 1/5 000 – 25 000 жителей [121]. Распространённость EPP колеблется от 1/71 500 в Нидерландах до 1/200 000 в Уэльсе [121]. В Швеции распространённость EPP составляет 1/180 000 [52], в Словении – 1,75 на 100 000 [53]. CEP – очень редкое заболевание, на сегодняшний день выявлено и зарегистрировано всего около 150 случаев [115]. Расчёт распространённости острой перемежающейся порфирии в Польше основан на количестве пациентов, зарегистрированных в базе данных лаборатории, исследующей порфирии, Института гематологии и трансфузиологии. Это 1,8 на 100 000 жителей [42].

В России порфирия входит в список орфанных (редких) заболеваний, число которых не превышает количества 10/100 000 человек [3]. Распространённость острой порфирии насчитывает 7 – 12/100 000, как заключили в Национальном гематологическом сообществе. В то же время встречаемость людей с

бессимптомным течением, но носительством дефектов в генах, приводящих к острым порфириям, составляет 50 – 100/100 000 здоровых человек [5].

1.5. Печёночные порфирии

Клинические симптомы различных видов печёночных порфирий (AIP, VP, HCP, ADP и PCT) возникают по всей нервной системе, в её вегетативной, периферической и центральной частях. Одной из проблем при выявлении данных заболеваний является неспецифичность клинических симптомов, что может указывать на другие заболевания, кроме порфирии, такие как отравления различными металлами [123]. Это препятствует точной постановке диагноза, подбору верной лекарственной терапии, что приводит к ухудшению состояния пациента. Диагноз следует предполагать у пациентов с рецидивирующими или продолжительными эпизодами необъяснимой боли в животе, особенно когда это связано с неврологическими осложнениями, психическими расстройствами или гипонатриемией [65].

Начало приступа печёночных порфирий может быть вызвано множеством провоцирующих факторов, таких как: лекарственные препараты (НПВП, барбитураты, некоторых антибиотики, сульфаниламиды, и др.), химические соединения, в частности краски, лак, органические растворители, пестициды. Вызывать атаки может излишнее употребление алкоголя, стресс, дефицит калорий, чрезмерные физические нагрузки, эндо- и экзогенные гормоны, изменение гормонального профиля у женщин, а также сопутствующие бактериальные или вирусные инфекции (гепатиты и др.) [4, 33]. Указанные провоцирующие факторы позволяют называть некоторые виды порфирий (AIP и др.) лекарственными, ввиду большой зависимости здоровья пациента от порфириногенных ЛС. Для помощи специалистам, занимающихся терапией людей с подтверждёнными диагнозами данной группы заболеваний, был создан сайт, где возможно проверить любое МНН препарата на предмет его порфириногенности [16, 116].

Приступы острых порфирий начинаются с сильной, генерализованной боли в животе (присутствует более чем в 90% случаев), иногда с боли, иррадиирующей в другие части тела, особенно в спину и ноги, голову и шею, и часто сопровождающаяся тошнотой, рвотой (в 45 – 85% случаев), запором (50 – 80%) или диареей (гораздо реже, лишь в 5 – 12% случаев) [102, 107]. Повышенное артериальное давление и тахикардия почти всегда присутствуют, но в остальном результаты обследования обычно нормальные. Психические изменения, включая возбуждение, депрессию, бессонницу и спутанность сознания, часто возникают в связи с острой болью, а также могут присутствовать на продромальных стадиях приступа. Приём порфириногенных препаратов вызывают полномасштабный приступ, парез и паралич конечностей и мышц туловища, дыхательную недостаточность (5 – 12%), аксональную невропатию, судороги и синдром задней обратимой энцефалопатии, потерю сознания и иногда смерть [95].

При VP и НСР симптомы, выраженные кожными поражениями, могут возникать вместе с острым приступом или же без него. В клинической картине РСТ острые приступы отсутствуют. Кожные симптомы никогда не возникают при AIP и ADP [102].

1.5.1. Острая перемежающаяся (печёночная) порфирия

AIP – аутосомно-доминантная острая печёночная порфирия, возникающая в результате полунормального уровня активности HMBS (EC 4.3.1.8). Локализация данного вида порфирии представлена на рисунке 3. HMBS – третий фермент в этом метаболическом пути. Он катализирует конденсацию четырёх молекул PBG в линейный тетрапиррол, HMB (OMIM 609806) при помощи серии дезаминирований. Активность фермента измеряется при помощи сопряжённой реакции, которая превращает HMB в UPGI, циклический тетрапиррол [98], обладающий собственными флуоресцентными свойствами, но не имеющий физиологической пользы в организме.

У большинства пациентов с АИР дефицит HMBS возникает как в эритроидных, так и в гепатоцитах (так называемый классический АИР). Примерно у 5% пациентов с АИР активность HMBS в эритроцитах нормальна, но снижена в других тканях (так называемый неэритроидный АИР). Две формы АИР клинически неотличимы и характеризуются эпизодическими приступами боли в животе, желудочно-кишечной дисфункцией и неврологическими нарушениями, включая периферическую невропатию [109].

Однако самого по себе дефицита недостаточно для проявления симптомов заболевания, и у большинства людей с мутацией гена HMBS симптомы АИР не развиваются [107]. Для проявления симптомов необходимы дополнительные провоцирующие факторы, например лекарственные, экологические или гормональные. Женщины во время определенных фаз менструального цикла или на ранних сроках беременности сильно подвержены острым атакам. Применение препаратов, воздействующих на ферменты CYP450 или на ALAS печени, также способно вызывать острый приступ у больного. Такие атаки начинаются в течение ближайших суток после применения порфириногенных ЛС [18]. Для актуализации информации о таких ЛС следует обращаться к соответствующим ресурсам и базам данных [16, 116].

Изменение фермента может привести к накоплению в организме различных порфиринов. Чаще приступы АИР случаются у молодых женщин, нежели у мужчин, исключая гомозиготные случаи [93]. При приступе АИР с мочой выделяются PBG, ALA и уропорфиринов с преобладанием последних. Во время острого приступа сразу после мочеиспускания моча у пациента с АИР обычно тёмно-красного или тёмно-коричневого цвета, также может потемнеть из-за воздействия солнца. Количество PBG и ALA в моче остаётся повышенным даже во время ремиссии [107].

1.5.2. Вариегатная порфирия

VP представляет собой аутосомно-доминантную печёночную порфирию, с клиническими проявлениями кожной порфирии (с хроническими волдырями на коже) и острой порфирии (с тяжёлыми эпизодическими невровисцеральными симптомами), вследствие чего и было названо вариегатной [62, 111]. Эта порфирия возникает в результате недостаточной активности PPOX, седьмого фермента в пути биосинтеза гема (ЕС 1.3.3.4), который катализирует окисление протопорфириногена IX до протопорфирина IX [62]. Локализация данного вида порфирии представлена на рисунке 3. Окисление осуществляется путём удаления шести атомов водорода (ОМІМ 600923). Продукт реакции представляет собой порфирин (окисленная форма), в отличие от нескольких предыдущих продуктов, которые являются порфириногенами (восстановленные формы). PPOX является интегральным белком, расположенным на внутренней мембране митохондрий. PPOX ингибируется билирубином, что, возможно, объясняет снижение уровня активности фермента при болезни Жильбера [99]. Считается, что этот комплекс участвует в координации импорта субстратов, протопорфирина IX и железа, чтобы предотвратить «свободную» ассоциацию внутри митохондриального матрикса, поскольку присущие каждому из субстратов свойства делают их потенциально токсичными. Мутации в гене *PPOX* приводят к 50% нормальной ферментативной активности, вызывая вариегатную порфирию.

Помимо острых приступов, характерных для всех острых печёночных порфирий, около 20% пациентов с VP могут также иметь повышенную светочувствительность кожи с выраженными проявлениями на ней, такими как волдыри, рубцы, эрозии и гиперпигментация. Примерно у 60% пациентов с VP поражения кожи являются единственным клиническим проявлением [102]. Острые приступы реже при VP, нежели при АІР; они встречаются менее чем у 20% пациентов с этим типом порфирии.

Симптомы и тяжесть VP могут сильно различаться от человека к человеку. До полового созревания и/или после менопаузы симптомы проявляются редко [91, 102].

Клинические симптомы VP включают заметно повышенное содержание протопорфирина IX и копропорфирина III в кале с преобладающей концентрацией протопорфирина. PGB, ALA и порфирины в моче также повышены, особенно копропорфирин III. Во время ремиссии мочевые PGB, ALA и уропорфирин III могут быть нормальными, тогда как уровни протопорфирина IX и копропорфирина III в кале остаются повышенными. Специфической для VP является флуоресценция плазмы (макс. При 624 – 628 нм) [102, 107].

1.5.3. Наследственная копропорфирия

Наследственная копропорфирия (HCP) – редкое нарушение обмена веществ, характеризующееся дефицитом фермента CPOX. Локализация данного вида порфирии представлена на рисунке 3. Шестой фермент в пути биосинтеза гема, CPOX (EC 1.3.3.3), ассоциирован с внутренней мембраной митохондрий в клетках млекопитающих, требует молекулярный кислород и не связывается с металлами [80, 101]. Фермент катализирует декарбоксилирование двух из четырёх групп пропионовой кислоты копропорфириногена III (на кольцах А и В) с образованием двух виниловых групп протопорфириногена IX (OMIM 612732).

HCP наследуется как аутосомно-доминантный признак из-за мутаций CPOX [77], на клиническое проявление которых влияют экологические и метаболические факторы. Этот тип порфирии встречается реже, чем AIP или VP. Клинические симптомы редко возникают до полового созревания и очень похожи на VP и AIP, за исключением светочувствительности, которая может развиваться у пациентов HCP, но гораздо реже, чем при VP [127]. Для проявления симптоматики, свойственной HCP, одного дефицита недостаточно, и у людей с мутацией гена CPOX клиническая картина HCP не всегда развивается [90]. Симптомы могут

появиться из-за дополнительного воздействия факторов, о которых упоминалось ранее.

Как и при VP, около 20% пациентов НСР также имеют поражения кожи. Поражения кожи – единственное клиническое проявление у 5% пациентов НСР в Германии [45]. Некоторые поражённые люди испытывают острые приступы или эпизоды, которые развиваются в течение нескольких дней. Курс и тяжесть приступов сильно различаются от человека к человеку. В некоторых случаях, особенно при отсутствии надлежащей диагностики и лечения, заболевание может вызвать опасные для жизни осложнения [90].

Во время приступа НСР основной биохимической аномалией в моче и фекалиях является заметно повышенное содержание копропорфирина, особенно изомера III, PBG, ALA [127]. Значения уропорфирина в моче также увеличиваются. В период ремиссии показатели мочи и кала могут быть нормальными.

1.5.4. Порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы

ADP – самый редкий тип наследственной порфирии [44, 122]. Этот тип порфирии является результатом мутации в гене *ALAD*, что приводит к дефициту ALAD (EC 4.2.1.24), который катализирует вторую стадию пути биосинтеза гема [32]. Локализация данного вида порфирии представлена на рисунке 3. ALAD конденсирует две молекулы ALA с образованием одной молекулы монопиррольного PBG (OMIM 125270) [82]. По сравнению с уровнями ALAS или HMBS, уровни активности ALAD в гепатоцитах и эритроблестах намного выше. Дефицит ALAD наследуется по аутосомно-рецессивному типу, поэтому поражённые гомозиготы имели менее 10% нормальной активности ALAD в эритроцитах, но их клинически бессимптомные родители и другие гетерозиготные родственники имели примерно полунормальные уровни активности и не выделяли повышенные уровни ALA. Частота ADP неизвестна, но частота гетерозиготных людей с менее чем 50% нормальной активности ALAD составила ~ 2% в скрининговом исследовании в Швеции. Начало, тяжесть и тип симптомов могут

сильно различаться у людей с данным типом порфирии, но обычно нарушения происходят в неврологической и желудочно-кишечной системах. Эта патология может частично зависеть от количества остаточной активности фермента у каждого человека. У людей с более значительным дефицитом ферментов могут быть более серьёзные симптомы и более раннее начало проявления симптомов. При частичной недостаточности симптомы будут более лёгкими, а у некоторых течение заболевания будет бессимптомным.

Активность ALAD подавляется многими химическими веществами или соединениями, такими как свинец или сукцинилацетон. Клинические симптомы ADP сходны с аналогичными у других острых печёночных порфирий, кроме светочувствительности или поражений кожи [87].

Применимо к этой патологии описан случай в Германии, в котором порфирины стула оставались в пределах нормы, а уровни PBG и копропорфирина в моче были увеличены [122].

1.5.5. Порфирия кожная медленная

Порфирия кожная медленная (PCT) вызывается сниженной активностью UROD, пятого фермента в пути биосинтеза гема (EC 4.1.1.37), который катализирует последовательное удаление четырёх карбоксильных групп из боковых цепей UPGIII с образованием четырёх метильных групп SPGIII (OMIM 613521) [35]. Место возникновения данного вида порфирии представлена на рисунке 3. Частично декарбоксилированные промежуточные продукты окисляются до соответствующих порфиринов и выводятся из клетки в плазму. Эти промежуточные продукты в основном продуцируются в печени и выводятся через плазму, мочу и стул.

PCT является уникальной среди порфирий, поскольку кожные и биохимические проявления являются результатом приобретённого печёочно-специфического ингибирования ферментов как в спорадических (тип I), так и в наследственных (типы II и III, тип III – НЕР) формах. Приобретённый (тип I) PCT

выявляется в 75% случаев, в основном у мужчин. Пациенты с PCT I типа имеют более низкую активность UROD в печени, но нормальную активность ферментов эритроцитов. У этих пациентов нет мутаций в гене, ответственного за синтез UROD. Наследственный (тип II) PCT встречается в 25% случаев. Пациенты, страдающие PCT II типа, имеют мутации гена *UROD*, а также сниженную активность UROD в печени и эритроцитах. Он наследуется по аутосомно-доминантному типу с низкой частотой клинических проявлений, поэтому не всегда имеется анамнез родственников [105, 117]. У большинства людей с этой генетической мутацией PCT не развивается; мутация является предрасполагающим фактором, и для развития заболевания требуются дополнительные факторы. Факторы риска включают в себя чрезмерное употребление алкоголя, инфекции вирусов гепатитов В и С и ВИЧ, эстрогены и гемохроматоз. Обычно они приводят к перегрузке печени железом, основным причинным фактором PCT [117]. Эта порфирия также может быть результатом воздействия определённых полигалогенированных ароматических углеводов, одним из наиболее заметных происшествий можно считать вспышку в Турции в 1950-х годах, вызванную употреблением в пищу пшеницы, обработанной фунгицидом гексахлорбензолом (ГХБ) [54]. Как правило, PCT развивается в среднем и позднем возрасте.

Характерными симптомами PCT являются поражения кожи на открытых участках (тыльная сторона рук, шея и лицо) в виде волдырей с серозной жидкостью, эрозий, рубцов и гиперпигментации. У пациентов с PCT могут развиваться цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома [110]. Пациенты с симптомами PCT имеют значительно более высокие значения порфиринов в моче, фекалиях и плазме, особенно уропорфирина III в моче. PGB в моче имеет нормальные значения; ALA также в норме или немного повышена. При ремиссии PCT уровень порфиринов в моче, плазме и фекалиях нормализуется. Пациенты с симптомами I и II типа имеют сниженную активность UROD в печени (примерно 25% от нормального значения). Активность UROD эритроцитов нормальна при PCT I типа

и снижается примерно на 50% при РСТ II типа как симптоматическом, так и бессимптомном [110].

1.6. Эритропоэтические порфирии

При эритропоэтических порфириях (EPP, CEP и XLDPP) кожная светочувствительность обычно проявляется в раннем детстве, но в редких случаях она может развиваться позже и во взрослой жизни [8, 102].

1.6.1. Эритропоэтическая протопорфирия

Заключительным этапом биосинтеза гема является введение двухвалентного железа в протопорфирин IX с образованием гема (OMIM 612386, EC 4.99.1.1.) [26, 86]. Эта реакция катализируется ферментом FECH, которая связана с внутренней стороной митохондриальной мембраны. Феррохелатаза использует протопорфирин IX, а не его восстановленную форму, в качестве субстрата. Для получения гема требуется восстановленная двухвалентная форма железа, а не трёхвалентная форма. На место Fe^{2+} могут вставать и другие металлы (например, Zn^{2+} и Co^{2+}) [40]. Протопорфирин IX сильно ингибируют ионы: Hg^{2+} , Mn^{2+} и Cd^{2+} , но слабо ингибирует Pb^{2+} .

Кластер железо-сера (2Fe-2S) был обнаружен в рекомбинантной феррохелатазе человека и мыши. Его считают важным для активности фермента [40, 86]. Предполагаемое место связывания железа с серой находится на C-конце в 30-аминокислотной области, которая содержит четыре молекулы цистеина. Катионы металлов, связываясь с серой, ингибируют функциональность феррохелатазы.

Снижение ферментативной активности также происходит из-за мутаций в кодирующей области гена *FECH* [38]. Клинически EPP проявляется, когда из-за мутации феррохелатазы снижается экспрессия нормального фермента [69]. EPP – наиболее частая эритропоэтическая порфирия и занимает третье место по

распространённости после PCT и AIP. В большинстве случаев заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу. В малом проценте случаев он аутосомно-рецессивный, при этом поражённые люди наследуют мутацию кодирующей области от каждого родителя [74]. Локализация данного вида порфирии представлена на рисунке 3.

Дефицит FECH приводит к чрезмерному накоплению свободного протопорфирина в эритроцитах, ретикулоцитах, эритробластах, печени, плазме и коже.

Данная патология характеризуется аномальной чувствительностью к солнцу (светочувствительностью), которая может вызывать сильную боль, жжение и зуд на подверженной солнечному свету коже. Иногда поражения на коже могут появляться и от искусственного источника света. Симптомы могут возникать сразу или вскоре после пребывания на солнце. Также могут возникнуть отёчность и покраснение поражённых участков. Рубцевание и образование волдырей возникает редко. Гидрофобный протопорфирин IX образует кристаллы в гепатоцитах и желчных каналах, которые замедляют отток желчи в печени. Холелитиаз, вызванный желчными камнями, содержащими протопорфирин IX, вызывает быстро прогрессирующую и необратимую холестатическую печёночную недостаточность у 2% пациентов с EPP [102]. Печёночная недостаточность поражает 5% пациентов [84]. У многих наблюдается дефицит железа с микроцитарной анемией и низким уровнем витамина D [43].

Основное биохимическое проявление у пациентов с симптоматическим EPP – массивное увеличение количества протопорфирина IX в эритроцитах. В фекалиях содержание протопорфирина IX также превышено. Активность FECH снижается до 10–35% от нормального значения у пациентов с симптомами. У бессимптомных носителей дефицит FECH составляет около 50% [43].

1.6.2. X-сцепленная доминантная протопорфирия

У людей с целью доставки кислорода к тканям для поддержания нормального гомеостаза ежедневно вырабатывается примерно 2 триллиона эритроцитов. Для нормального эритропоэза, процесса образования красных кровяных телец из стволовых клеток костного мозга, необходимо непрерывное поступление гема. Определяющую роль в регуляции биосинтеза гема играет эритроид-специфическая изоформа ALAS (ALAS2) [66]. Эритропоэз становится возможным из-за взаимосвязи между связыванием железа, биосинтезом гема и глобина. XLDPD вызывается мутациями гена *ALAS2* и наследуется по X-сцепленному доминантному типу. Локализация данной порфирии представлена на рисунке 3. Удаление с-концевых аминокислот *ALAS2* приводит к увеличению активности *ALAS2* и накоплению протопорфирина [39]. На посттранскрипционном уровне трансляция мРНК *ALAS2* сильно зависит от внутриклеточной концентрации железа [106]. Эта особенность важна для предотвращения токсического накопления высокореактивных порфиринов и их предшественников во время дефицита железа. Повышенная активность *ALAS2* вызывает накопление пропоторфирина IX и цинк-пропоторфирина IX в эритроцитах пациентов с XLDPD [85]. XLDPD составило примерно 2% случаев фенотипа EPP в британском исследовании [83].

X-сцепленная доминантная протопорфирия – чрезвычайно редкое генетическое заболевание, которое клинически неотличимо от EPP. При световом облучении накопленные порфирины приводят к образованию активных форм кислорода и, в итоге, к повреждению клеток, что является основой симптомов светочувствительности у пациентов с XLDPD. Боль, которая может показаться несоразмерной видимым поражениям кожи, может сохраняться в течение нескольких часов или дней после начальной фототоксической реакции. Светочувствительность сохраняется на всю жизнь. Частые случаи, связанные с острой фотосенсибилизацией, могут приводить к различным хроническим изменениям кожи, такие как лихенификация, кожистые псевдовезикулы, бороздки вокруг губ [29]. Чаще тяжёлая форма заболевания возникает у мужчин. XLDPD

может развиваться бессимптомно у женщин. Диагноз X-сцепленной доминантной протопорфирии может быть поставлен после анализов крови, которые могут выявить возросшие уровни протопорфирина IX. Также помощью при отделении XLDPР от ЕРР может послужить более высокое соотношение протопорфирина, связанного с цинком, и протопорфирина, не содержащего металлов. Доступные варианты лечения XLDPР остаются исключительно поддерживающими, симптомными [92].

1.6.3. Врождённая эритропоэтическая порфирия

СЕР представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее из-за почти полного дефицита UROS, четвёртого фермента в пути биосинтеза гема (ЕС 4.2.1.75), который катализирует превращение линейного НМВ (ОМІМ 606938) в циклический UPGIII [46], локализация данного нарушения изображена на рисунке 3. Это происходит путём инверсии пиррольного кольца D и его замыканием с образованием асимметричного изомера UPGIII [31]. Ферментативный дефект возникает из-за мутации как в кодирующих, так и промоторных участках гена *UROS* [37], из-за чего образуется UPGI. Это соединение может метаболизироваться до CPGI, который не участвует в дальнейшем метаболизме, так как CPGI не является субстратом для СРОХ. Только изомеры типа III являются предшественниками гема, эта реакция придаёт стереоспецифичность, которая сохраняется на протяжении оставшейся части биосинтеза гема.

Дефицит UROS приводит к перепроизводству и накоплению патогенных изомеров уропорфирина I и копропорфирина I. Одним из симптомов этого расстройства, наряду с гемолитической анемией и спленомегалией (гиперспленизмом), порфиринурией [46], лейкопенией и тромбоцитопенией, является гиперчувствительность кожи к солнечному свету и некоторым видам искусственного света, например, люминесцентным лампам. После воздействия света фотоактивированные порфирины образуют волдыри, которые могут

разрываться, что может привести к дальнейшему заражению. Эти инфицированные поражения могут привести к рубцеванию, потере костной массы и деформациям. Руки и лицо являются наиболее часто поражаемыми участками [88]. В ультрафиолете зубы принимают розовато-коричневое окрашивание (эритродонтия) в связи с отложением в эмали и дентине порфиринов. Чрезмерное количество порфиринов имеет тенденцию накапливаться в различных тканях, особенно в костях, что приводит к остеолизу, остеопорозу и деформации костей. Заболевание проявляется довольно рано, вскоре после рождения. У младенцев, поражённых СЕР, красные флуоресцентные подгузники являются хорошим диагностическим маркёром [37]. Никаких различий в клинических симптомах СЕР у мужчин и женщин не наблюдалось. Средняя продолжительность жизни большинства пациентов составляет 40 – 60 лет.

У пациентов с СЕР заметно увеличиваются количество различных типов порфиринов (уропорфирина I, гептакарбоксипорфирина, копропорфирина I, гексакарбоксипорфирина и пентакарбоксипорфирина в моче, а также копропорфирина I в стуле) [46].

1.7. Гепатоэритропоэтическая порфирия

Гепатоэритропоэтическая порфирия – чрезвычайно редкое генетическое заболевание, характеризующееся дефицитом фермента уropорфириноген декарбоксилазы. Мутации обеих копий гена UROD человека вызывают этот дефицит, следовательно, заболевание наследуется как аутосомно-рецессивный признак, место вызываемого ферментного блока представлено на рисунке 3. У большинства поражённых людей наблюдается значительный дефицит этого фермента, и заболевание начинается обычно в младенчестве или раннем детстве [97]. Однако у некоторых людей может быть лёгкая форма, которую нельзя диагностировать до зрелого возраста [89]. Мутации UROD, вызывающие НЕР, часто не приводят к полной потере активности фермента. Активность UROD у пациентов с НЕР колеблется от 3 до 28% от нормы. В основном повышенная

выработка порфиринов происходит в печени. Однако протопорфирин цинка накапливается в костном мозге и заметно повышается в эритроцитах [61], как и при всех других аутомно-рецессивных порфириях, за исключением СЕР, при котором уропорфирин I и копропорфирин I обычно являются наиболее распространёнными порфиринами в эритроцитах [46]. Симптомы обычно начинаются в младенчестве и включают крайне сильную светочувствительность, различные поражения кожи (волдыри, эрозии и рубцы) на участках, подверженных воздействию солнца, эритродонтия и моча от розового до красного цвета [103]. Также часто встречается гипертрихоз на поражённой коже. Сообщалось также о лёгкой анемии и аномальном увеличении печени и/или селезёнки (гепатоспленомегалия). Лёгкие случаи НЕР могут оставаться нераспознанными до зрелого возраста и могут быть клинически неотличимы от РСТ. Кожная светочувствительность обычно более выражена при НЕР, чем при РСТ [103] и по тяжести протекания близка к таковой при СЕР.

В медицинской литературе зарегистрировано менее 100 случаев НЕР. Некоторые данные свидетельствуют, что этим заболеванием может быть поражён 1 из 20 000 человек, если основываться на данных о наследственной РСТ.

Таким образом, по представленным патологиям, все известные сведения можно представить в виде таблицы 2.

Таблица 2 – Главные клинические проявления при различных типах порфирий [48]

Тип порфирии	Главные клинические проявления			
	Острые приступы	Ломкость кожи, волдыри	Острая болезненная фоточувствительность	Нервно-висцеральные симптомы
АIP (острая перемежающаяся (печёночная) порфирия)	Да	Нет	Нет	Да
VP (вариегатная порфирия)	Да	Да	Нет	Да
НСР (наследственная копропорфирия)	Да	Да	Нет	Да

Продолжение Таблицы 2

ADP (порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы)	Да	Нет	Нет	Да
PCT (порфирия кожная медленная)	Нет	Да	Нет	Нет
EPF (эритропоэтическая протопорфирия)	Нет	Нет	Да	Нет, исключая больных с тяжёлой гепатобилиарной патологией
SEP (врождённая эритропоэтическая порфирия)	Нет	Да	Нет	Нет
XLDPP (X-сцепленная доминантная протопорфирия)	Нет	Редко	Да	Нет
HEP (гепатоэритропоэтическая порфирия)	Нет	Да	Да	Нет

После сбора анамнеза необходима лабораторная диагностика биоматериала пациентов на предмет наличия определенных порфиринов, соответствующих конкретным заболеваниям из группы порфирий. Соответствие характеристических биомаркёров с порфирией представлено в таблице 1.

1.8. Структура и физико-химические свойства порфиринов

Порфирины – соединения, производные порфина, состоящие из четырёх пирролов, которые соединяются четырьмя метиновыми группами по α -положениям [70]. На рисунке 4 представлена его структура. Порфирины обнаружены в природе, также могут быть получены искусственно.

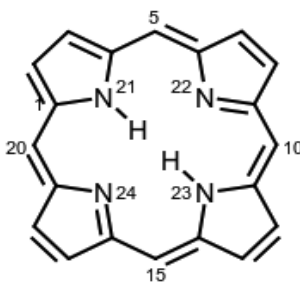


Рисунок 4 – Порфирин (Порфин) [70]

Приведём примеры некоторых из них:

Протопорфирин IX содержит порфиновое ядро, тетрапиррольный макроцикл с выраженным ароматическим характером. Это твёрдое вещество бурого цвета, растворяющееся в воде, с максимальной длиной волны поглощения в 505 нм [23], изображено на рисунке 5.

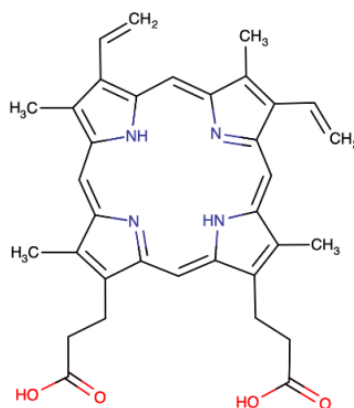


Рисунок 5 – Протопорфирин IX [47]

Копропорфирин III – одно из промежуточных звеньев в биосинтезе гема; бесцветное, твёрдое вещество, растворимое в воде [118], представленное на рисунке 6.

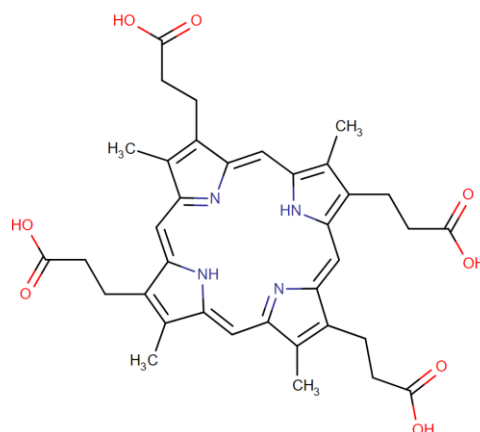


Рисунок 6 – Копропорфирин III [118]

Уропорфирин III является прекурсором протопорфирина, также самая распространённая форма уропорфириногена. Данное вещество не окрашено, растворимо в воде [119], и его химическая структура отображена на рисунке 7.

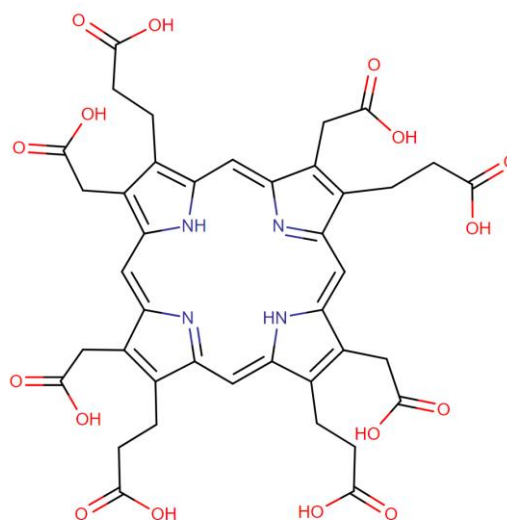


Рисунок 7 – Уропорфирин III [119]

Протопорфириноген IX является прямым предшественником протопорфирина IX. Как и большинство порфириногенов, он бесцветен. Это твёрдое и растворимое в воде вещество [120]. Его структура изображена на рисунке 8.

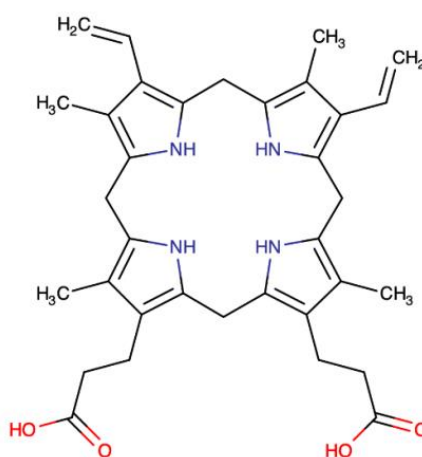


Рисунок 8 – Протопорфириноген IX [120]

Особые свойства порфиринов:

1. наличие мощной хромофорной группы, которая даёт окрашивание в видимом спектре от розового до коричневого;
2. безметалловые основания порфиринов обладают интенсивной полосой поглощения на уровне ≈ 400 нМ [112];
3. наличие протяжённой сопряжённой электронной системы;
4. комплексообразующие свойства, что делает возможным образование металлопорфиринов;
5. макроциклический эффект;
6. кислая природа веществ.

Вышеперечисленные свойства необходимо учитывать при пробоподготовке, так и при выборе метода и условий хроматографического разделения.

1.9. Диагностика порфирий

1.9.1. Аналитические методы исследования порфирий

Правильно подобранный метод анализа порфиринов в биологических жидкостях – необходимый инструмент для проведения качественного исследования. Диагностический метод должен обладать высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью, а также проводиться в относительно короткие сроки. Этим требованиям отвечают ВЭЖХ [41, 100, 124], тонкослойная хроматография (ТСХ), газожидкостная хроматография (ГЖХ), иммуноферментные анализы [49, 50, 58] и тест Уотсона-Шварца.

С применением газожидкостной хроматографии возможно достичь качественного разделения компонентов в пробе, хорошей чувствительности и селективности. Но существующие для ГЖХ ограничения по термостабильности, а также летучести требуют дериватизации исследуемых веществ. Поэтому необходима тщательная пробоподготовка, позволяющая исключить термолабильные эндогенные вещества, несовместимые с ГЖХ [7, 57, 58].

Использование ТСХ обосновано простотой оборудования, техникой проведения, наглядностью и низкой стоимостью [11]. Описан ряд систем тонкослойной хроматографии, которые легко разделяют метильные эфиры порфиринов по количеству кислотных боковых цепей и отделяют изокопропорфирин от копропорфирина [49]. Однако применение данного метода ограничивается низкой разрешающей способностью и зависимостью от внешних трудноконтролируемых условий по сравнению с методом ВЭЖХ [11].

Иммуноферментные тесты обладают высокой чувствительностью и селективностью, требуют малых объёмов исследуемого материала. При АИР эти тесты задействуют для определения порфобилиногендеаминазы эритроцитов.

Для диагностики острой перемежающейся (печёночной) порфирии применяется тест Уотсона-Шварца. Суть метода заключается в обнаружении порфобилиногена при помощи цветной реакции с реактивом Эрлиха. Эта реакция подтверждается сохранением цвета после добавления к смеси хлороформа [78]. При помощи данного метода можно выявить только острую перемежающуюся порфирию и порфирию кожную медленную, также он используется только в качестве диагностического теста. Для подтверждения порфирии применяют другие методы.

Существуют генетические методы анализа, такие как мутационный анализ с использованием классических методов молекулярной генетики или методов молекулярной генетики следующего поколения.

Анализ ДНК посредством секвенирования по Сенгеру считается одним из лучших в диагностике генетических нарушений. Эта технология применяется для проверки результатов ПЦР и используется для получения данных о генетической последовательности [60]. Но всё же перед данным анализом рекомендуется провести биохимическое тестирование и предоставить все доступные данные относительно основных клинических характеристик и мест скопления порфиринов, чтобы определить, какой из генов анализировать. Большинство мутаций определяется по кодирующим областям, местам сплайсинга или в

промоторах генов, вызывающих порфирию, но молекулярно-генетическая гетерогенность не делает его определяющим анализом.

В то время как секвенирование ДНК позволяет идентифицировать вызывающие заболевание мутации почти у всех пациентов с порфирией, природа первичных генетических дефектов у некоторых пациентов с клиническими и биохимическими симптомами остаётся невыясненной. Будущие исследования с применением NGS, посредством секвенирования экзона или всего генома смогут внести вклад в определении других генов, ответственных за транспорт и/или деградацию гема, что может помочь в понимании патофизиологии порфирии и позволить идентифицировать новые мишени для лечения данного заболевания. В настоящее время NGS-анализ используется в основном для исследований, а не для диагностики. Эффективность анализа может быть повышена из-за использования других панелей, предполагающих захват, а не метод ампликона. Только специалисты узкого профиля смогут расшифровать результаты, полученные после проведения NGS анализа, так как отсутствует общая база данных, с проверенными вариантами для анализа [73].

В отличие от перечисленных методов ВЭЖХ не имеет таких ограничений, как:

- наличие узкопрофильных специалистов;
- высокая стоимость анализа;
- низкая точность анализа;
- длительность проведения анализа;
- сложность воспроизведения;
- особых физико-химических ограничений.

Поэтому метод ВЭЖХ применяется при диагностике чаще других [100, 124].

ВЭЖХ – аналитический метод разделения многокомпонентной смеси, основанный на многократных актах сорбции-десорбции и перераспределении этих компонентов между подвижной и неподвижной фазами. В жидкостной хроматографии неподвижной фазой выступает сорбент, а подвижной – жидкость, которая через этот сорбент движется вместе с исследуемым образцом. Разделение

достигается благодаря тому, что компоненты пробы с разными скоростями взаимодействуют с сорбентом при направленном движении в подвижной фазе [2]. Проприетарные формулы сорбентов, набиваемых в колонки, и динамически меняющиеся соотношения растворителей в процессе анализа позволяют разделить изомеры исследуемых соединений.

Высокоэффективная хроматография в сравнении с обычной жидкостной хроматографией обладает более высокой разрешающей способностью и скоростью анализа. В отличие от газовой хроматографии при ВЭЖХ анализ образцов проходит в мягких условиях (от комнатной температуры до 60 °С).

Выделяют нормально-фазовую и обращённо-фазовую ВЭЖХ. В первом случае неподвижная фаза представляет полярный сорбент (силикагель, силикагель с наращенными на нём NH₂- или CN-группами), подходящий для неполярных растворителей: гексан, смеси гексана со спиртами, хлороформ, эфиры. Обращённо-фазовая хроматография, наоборот, задействует гидрофобный сорбент: силикагель с привитыми углеводородными цепями C₄, C₁₈, а подвижной фазой выступает смесь воды, спиртов, слабых кислот и буферных растворов [2]. Обращённо-фазовый режим удобнее в эксплуатации: колонки легче хранить и они быстрее достигают равновесия в системе, а биожидкости организма человека требуют меньших затрат на пробоподготовку.

Качественный анализ в ВЭЖХ можно проводить несколькими способами: использовать информацию об удержании (величины времени и объёма удерживания являются характеристическими); исследовать зоны, полученные при разделении в колонке жидкостного хроматографа, методами спектрального или химического анализа (УФ-детекция, масс-спектрометрия, ИК-спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия и др.); напрямую подключить спектральный анализатор к колонке.

Большой селективностью и чувствительностью обладает флуоресцентный детектор, но чтобы его использовать, вещество должно флуоресцировать. Очень многие субстанции таким свойством не обладают, для этого им нужно произвести дериватизацию. Такие системы очень требовательны к уровню pH и O₂. [36].

Масс-детектор обладает высокой чувствительностью (позволяет анализировать пикомольные количества вещества) и селективностью. При помощи его возможно упростить пробоподготовку и сократить время анализа, но данный метод требует больших затрат на материалы, оборудование и обслуживание [68].

Ультрафиолетовый детектор относится к категории детекторов поглощения, обеспечивающий хорошую чувствительность к светопоглощающим соединениям на уровнях $\sim 210 - 400$ нм (полоса Core) [30]. Он прост в эксплуатации и обеспечивает хорошую устойчивость аналитического метода: не зависит от изменений температурного режима, а также скорости потока. УФ-детектор – часто используемый детектор для анализа ВЭЖХ. [7, 72].

1.9.2. Анализ методов пробоподготовки при определении порфиринов в плазме крови и в моче

Подготовка проб – критически важный шаг при диагностике порфиринов. Образцы, подготавливаемые для анализа с помощью ВЭЖХ, представляют собой как биологические жидкости, так и фрагменты тканей. Всё это требует предварительной обработки образца перед анализом. Пробоподготовка варьируется в зависимости от материала. Она может включать только разбавление и экстракцию, как, например, для мочи. При работе с фрагментами тканей, экскрементов, форменных элементов крови необходимо проведение нескольких этапов: экстракция, концентрирование, очистка, перенос растворителя и химическая модификация.

Осаждение белков – самый простой, быстрый и недорогостоящий способ пробоподготовки плазмы для анализа ВЭЖХ. Преципитация белков может быть достигнута путём создания кислых значений рН, при которых происходит коагуляция белка. Например, к анализируемому биоматериалу добавляют кислоты [64], смешивающиеся с водой органические растворители – ацетонитрил [21, 67] или спирты, соли металлов: цинка, свинца и других [25]. При выборе осаждающего реактива необходимо учитывать природу аналита и возможные реакции –

гидролиз, комплексообразование и нерастворимость веществ в сложившихся условиях. Необходимо учитывать разбавление пробы, чтобы избежать недостаточной чувствительности, изменения хроматографических параметров системы и искажения результатов исследования. В пробе могут оставаться белки, если осаждение белков было выполнено недостаточно эффективно, поэтому целесообразно применить способ центрифугирования или фильтрации после осаждения.

Экстракция при пробоподготовке бывает двух видов:

1. Жидкость-жидкостная экстракция. Она заключается в распределении вещества между двух взаимно нерастворимых жидкостей, для повышения растворимости вещества в экстрагенте может требоваться изменение pH.

2. Твердофазная экстракция. В ней целевое вещество для анализа предварительно сорбируется из матрицы на сорбент (твёрдую неподвижную фазу), а затем экстрагируется растворителем [94].

Существует также метод Dilute and shoot (DnS). Как видно из названия, суть метода заключается в разведении пробы перед введением в аналитический прибор.

К минусам этого метода можно отнести:

- не каждая матрица, содержащая аналит, пригодна для проведения пробоподготовки таким способом;
- из-за разведения и вместе с тем уменьшения концентрации составляющих, существует риск упустить вещество [104];
- содержащиеся в матрице вещества, мешающие скринингу, при разведении не исчезают.

При модификации данного метода добавлением стадии центрифугирования можно добиться уменьшения содержания эндогенных соединений, мешающих определению.

Независимо от пробоподготовки, окончательный образец должен соответствовать следующим условиям перед введением в систему ВЭЖХ:

- иметь ту же фазу, что и исходный образец;

- находиться в растворителе, который аналогичен подвижной фазе или, по крайней мере, совместим с подвижной фазой;
- растворитель должен обеспечивать достаточную стабильность в течение всего периода диагностики;
- без частиц, которые могут повредить систему ВЭЖХ (макрочастицы, способные повредить сорбент, либо рН);
- исследуемое соединение должно быть детектируемо.

Использование надлежащих аналитических методов, оборудования, принципов измерения, концентрации анализируемых веществ и документации необходимы для получения точных и надёжных результатов. Напротив, применение неправильных методов взвешивания, приготовления буфера и подвижной фазы может привести к внесению примесей и потере точности. Отсутствие надлежащего регламента проведения анализа часто приводит к трудностям при проведении исследований. Это происходит после переноса полученной методики анализа из лаборатории, где она была разработана, к конечным пользователям или в лабораторию контроля качества.

1.9.3. Методы отбора проб

Порфирины в моче лучше анализировать в свежей разовой пробе (10 – 20 мл), без применения в дальнейшем консервантов. Собранные пробы обязательно требуется хранить в месте, защищённом от света. Накануне сдачи анализа не рекомендуется употреблять в пищу овощи и фрукты, которые могут изменить цвет мочи, принимать диуретики. Женщинам во время менструации не рекомендуется проводить исследование мочи.

Для анализа плазмы на порфирины рекомендуется использовать 5 мл крови, к которой необходимо прибавить ЭДТА с целью антикоагуляции. Плазму следует отделить максимум в течение суток, потому как существует вероятность загрязнения пробы гемоглобином, способным помешать анализу порфирина. Пробы требуется хранить в светонепроницаемых эппендорфах.

1.9.4. Нормы содержания порфиринов

Качественные и количественные исследования биоматериалов пациентов на предмет подтверждения или опровержения проставленного специалистом диагноза следует сверять с нормами содержания порфиринов. При анализе литературных источников были обнаружены нормы биомаркёров порфирий для мочи [20] и для плазмы [22]. Нормы содержания порфиринов в моче и плазме представлены в виде таблицы 3.

Таблица 3 – Нормы содержания порфиринов в моче, представленные в литературных источниках

Тип порфирина	Нормы по содержанию порфиринов в моче, нМ [20]	Нормы по содержанию порфиринов в моче по Кишкуну А.А., нМ [10]	Нормы по содержанию порфиринов в плазме, нМ [22]	Нормы по содержанию порфиринов в плазме по Кишкуну А.А., нМ [10]
Уропорфирин I	< 35	12 – 37	Сумма концентраций изомеров < 2,4	Нет данных
Уропорфирин III	Нет данных			
Гептакарбоксипорфирин	< 8	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Гексакарбоксипорфирин	< 3	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Пентакарбоксипорфирин	< 6	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Копропорфирин I	< 30	75 – 240	Сумма концентраций изомеров < 30	Нет данных 0,75 – 3,0
Копропорфирин III	< 90			
Мезопорфирин IX	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Протопорфирин IX	Нет данных	Нет данных	< 280 – 1070	7,2 – 93,6

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Порфириновые соединения обладают фоточувствительными свойствами и могут быть использованы в фотодинамической терапии для лечения различных заболеваний, включая онкологические и инфекционные. Также существует возможность применения порфиринов для борьбы с гипербилирубинемией. Использование порфиринов в медицине требует дальнейших исследований, особенно в области улучшения безопасности и эффективности их применения при различных заболеваниях.

2. Во время проведённого анализа литературных источников и эмпирического материала был описан путь биосинтеза гема, определены биомаркёры (субстраты), избыточное или дефицитное содержание которых обуславливает вид порфирии.

3. На основании физико-химических свойств порфиринов и существующих методов их обнаружения был сделан научно обоснованный выбор в пользу метода ВЭЖХ, как наиболее достоверного и селективного метода при качественном и количественном анализе. Также был выбран УФ-детектор, который является распространённым, простым в эксплуатации и достаточно чувствительным инструментом при выявлении данного типа веществ.

4. При разработке алгоритма пробоподготовки были изучены свойства биологических жидкостей, используемых во время анализа. В качестве осадительных реагентов был выбран ацетонитрил, который приводит к осаждению (денатурации) белков и других высокомолекулярных веществ в кислой среде. В отличие, к примеру, от метанола, который по завершении пробоподготовки не будет гомологичен фазовому составу.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и химические реактивы

В настоящей диссертационной работе были исследованы следующие биологические соединения:

А) Эндогенные соединения:

1. уропорфирин I (CAS Registry Number 607-14-7; Thermo Fisher Scientific, США),

2. уропорфирин III (CAS Registry Number 18273-06-8; Thermo Fisher Scientific, США),

3. гептакарбоксихлоропорфирин (CAS Registry Number 65406-45-3; Thermo Fisher Scientific, США),

4. гексакарбоксихлоропорфирин I (CAS Registry Number 73913-56-1; Thermo Fisher Scientific, США),

5. гексакарбоксихлоропорфирин III (HMDB ID HMDB0001952; Thermo Fisher Scientific, США)

6. пентакарбоксихлоропорфирин (CAS Registry Number 28100-78-9; Thermo Fisher Scientific, США),

7. копропорфирин I (CAS Registry Number 531-14-6; Thermo Fisher Scientific, США),

8. копропорфирин III (CAS Registry Number 14643-66-4; Thermo Fisher Scientific, США).

Б) Активные фармацевтические субстанции:

1. АФС лекарственного препарата Stanate® (МНН станнсопорфин) – мезопорфирин IX (CAS Registry Number 493-90-3; Thermo Fisher Scientific, США).

В) Активные метаболиты лекарственного препарата Аласенс® (МНН аминолевулиновая кислота):

1. протопорфирин IX (CAS Registry Number 553-12-8; Thermo Fisher Scientific, США).

Г) Внутренний стандарт:

1. 2-винил-4-гидрокси-метил-дейтеропорфирин IX (CAS Registry Number 141407-08-1; Thermo Fisher Scientific, США).

В качестве реагентов применялись следующие соединения:

1. Соляная кислота (Sigma-Aldrich, США),
2. Уксусная кислота (Sigma-Aldrich, США),
3. Аммония гидроксид (Sigma-Aldrich, США),
4. Ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США),
5. Аммония ацетат аналитической степени чистоты (Sigma-Aldrich, США),
6. Метанол категории «для ВЭЖХ» (Thermo Fisher Scientific, США).

Вода деионизованная получена с использованием системы очистки воды Milli-Q Integral 5 в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ. Донорская плазма и моча предоставлена ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва» Минздрава РФ.

2.2. Приготовление растворов

2N HCl: в мерной колбе на 200 мл разводили 33,159 мл концентрированной (37%) соляной кислоты и доводили водой деионизованной до метки.

Фаза А: 77,08 г ацетата аммония (безводного) растворяли в 1 л воды деионизованной и доводили до pH 5,16 с помощью уксусной кислоты ледяной (97%).

1N NH₄OH: в мерной колбе на 200 мл разводили 28,4 мл концентрированного (28%) гидроксида аммония и доводили водой деионизованной до метки.

Стоковые растворы порифиринов готовили, растворяя точную навеску в 100 мл 2N HCl до получения концентрации 20 мкМ. Для изомеров уропорфина масса навесок составила по 16,61 мг для каждого; для гептакарбоксихпорфина – 15,73 мг; для гексакарбоксихпорфина – 14,85 мг; для пентакарбоксихпорфина – 13,97 мг; для изомеров копропорфина – по 13,09 мг для каждого; для

приготовления навески ВС и мезопорфирина IX понадобились навески массой 11,33 мг для каждого из стандартов; для протопорфирина IX – 11,25 мг.

2.3. Оборудование и вспомогательные материалы

Хроматограф Waters Acquity UPLC H-CLASS со следующими модулями: диодно-матричным детектором ACQ-PDA ел (Брюссель, Бельгия), термостатом ACQ-СМ (Брюссель, Бельгия), автосэмплером ACQ-FTN и насосным блоком ACQ-QSM (Брюссель, Бельгия). Неподвижная фаза: колонка 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 ± 2 °С.

Во время пробоподготовки было использовано следующее оборудование: шейкер Biosan Multi Plate Shaker (Рига, Латвия), центрифуга Thermo scientific Heraeus Labo Fuge 200 (Уолтем, США), центрифуга с охлаждением с роторами Eppendorf Centrifuge 5430R (Гамбург, Германия), 1-канальные автоматические пипетки Gilson Pipetman P100 (20 – 100 мкл), P1000 (200 – 1000 мкл) (Франция), а также расходные материалы: наконечники Omnitip на 20, 200 и 1000 мкл (Варшава, Польша), светонепроницаемые пробирки Safe-lock Eppendorf с защелкой объемом 1,5 мл (Гамбург, Германия), виалы стеклянные тёмного стекла на 2 мл, биохимические пробирки с гелем Sarstedt (Нюмбрехт, Германия).

2.4. Подвижная фаза

Подвижная фаза: двухкомпонентный градиент:

Фаза А – 1М раствор аммония ацетата в воде, доведённый до рН 5,16 при помощи уксусной кислоты;

Фаза В – 100% метанол.

Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали. Подвижная фаза подавалась в градиентном режиме со скоростью потока, равной 0,9 мл/мин, что отображено в таблице 4.

Таблица 4 – Процентное содержание фаз в процессе элюирования

Время введения, мин	фаза А, %	фаза В, %
0	80	20
2	80	20
25	0	100
30	0	100
31	80	20
33	0	100
35	0	100
36	80	20
41	80	20

2.5. Образцы

Для проведения валидации данных методик использовались биологические материалы: объединённая моча и объединённая плазма от здоровых добровольцев ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ. Плазму крови для практического использования получили от Центра клинического изучения лекарственных средств Сеченовского университета. Донорскую кровь отбирали в согласии с постановлением Правительства РФ от 22 июня 2019 г. N 797 [17].

2.6. Сбор образцов

Перед сбором биологических образцов за 1 – 2 суток до исследования из рациона пациентов и здоровых добровольцев были исключены любые алкогольные напитки, прекращен прием диуретических препаратов.

Кровь пациентов и добровольцев отбирали в объеме 5 мл в пробирку с ЭДТА, для предотвращения коагуляции. Форменные элементы отделяли на центрифуге при 14000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму крови затем переносили в светонепроницаемую пробирку и хранили до проведения исследования при температуре -40 C^0 не более 2 месяцев.

Одновременно параллельно с кровью отбирали разовую мочу в объеме 50 мл, с измерением и указанием объема суточной мочи. Полученный образец мочи переносили в светонепроницаемую пробирку и хранили до проведения исследования при температуре -40 C^0 не более 2 месяцев.

2.7. Приготовление калибровочных растворов в моче

Стандартные стоковые растворы разводили в донорской моче до получения концентраций: 0,00; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00; 500,00 и 1000,00 нМ. Далее к 500 мкл калибровочных растворов, прибавляли 500 мкл 2М соляной кислоты и 50 мкл 2 мкМ внутреннего стандарта. Все этапы были проведены в светонепроницаемых эппендорфах. Полученную смесь затем перемешивали на шейкере в течение 10 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 14000 g. Надосадочную жидкость отбирали и вводили в хроматограф.

2.8. Приготовление калибровочных растворов в плазме крови

Калибровочные растворы порфиринов готовились разведением стандартных стоковых растворов (SSS) в 2Н HCl. В результате 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 2 мкМ IS и смешивали, после чего проводили седиментацию белков плазмы добавлением ацетонитрила объемом 200 мкл. Далее отделяли супернатант и растворяли осадок 100 мкл гидрата аммиака 1Н и 100 мкл

ацетонитрила. Смесь центрифугировали и осаждали повторно, после чего объединяли супернатанты. Добавляли 50 мкл HCl (концентрированной) к объединённой смеси стандартов и полученный раствор перемешивали в течение 10 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 14000 g.

2.9. Математическая обработка результатов исследования

Математическая и статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась при помощи программного обеспечения Microsoft Excel, Origin 7.0, Medstatistic. Диагностическая чувствительность и специфичность были рассчитаны с применением программного обеспечения MedCalc [79].

Обработка хроматограмм проводилась при помощи поставляемого ПО к прибору: Empower версии 3.0. Калибровочные прямые были построены при помощи программного обеспечения Numbers.

2.10. Валидация биоаналитических методик

Валидация биоаналитической процедуры выполнена, чтобы продемонстрировать, что процедура подходит для предполагаемого использования, а результаты, полученные с помощью определённой аналитической процедуры, являются надёжными и точными. Принципы и практика валидации аналитических процедур охвачены Руководством по валидации биоаналитических методик ЕМЕА/СНМР/ЕWР/192217/2009 [59], рекомендациями FDA Bioanalytical Method Validation (2018) [55], а также Требованиями к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов ЕАЭС [6].

Основными параметрами валидации для оценки биоаналитических методик, которые перечислены в международных и отечественных рекомендациях, выбраны:

- Специфичность/Селективность (Specificity/Selectivity);

- Линейность (Linearity);
- Аналитическая область методики (Range);
- Прецизионность (Precision);
- Правильность (Accuracy);
- Стабильность (Stability);
- Эффективность процесса (Process efficiency);
- Предел обнаружения (Limit of detection);
- Предел количественного определения (Limit of quantification).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ В МОЧЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

3.1. Определение параметров высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором для хроматографического разделения порфиринов

Разработка методик качественного и количественного определения экзогенных и эндогенных порфиринов – это важный этап исследований в области изучения лекарственных средств на основе порфиринов, их фармакологически активных метаболитов, а также диагностики порфириновых нарушений.

При разработке методик основными параметрами послужили: неподвижная фаза (НФ), подвижная фаза (ПФ) и режим элюирования.

Для оптимального хроматографического определения для данных параметров были соблюдены определённые условия. В качестве неподвижной фазы выступила колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250*4.6 мм, с зернением 5 мкм и с предколонкой-фильтром Waters 0,2 мкм. Порфирины – соединения со средней полярностью, из-за чего они удерживаются на сорбенте C18. Порфирины с большим количеством кислотных остатков элюируются раньше, так как обладают меньшей гидрофобностью.

Процесс выбора 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 рН 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 на примере стандарта копропорфина III, что показано на рисунке 9.

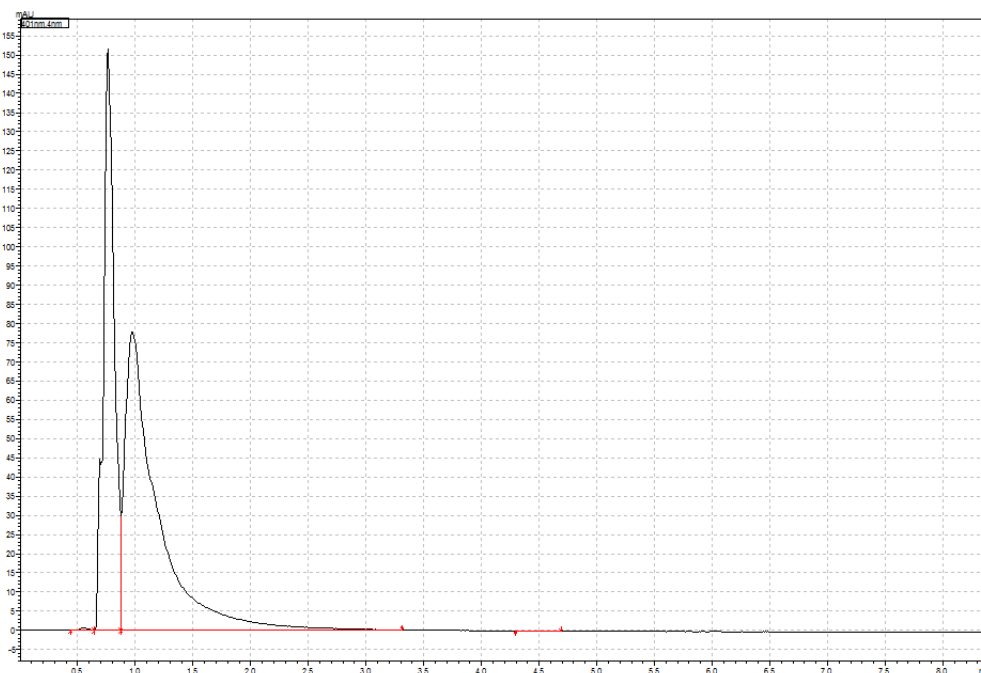


Рисунок 9 – Хроматограмма стандарта копропорфина III при соотношении ацетонитрила и метанола 50:50 при изократическом элюировании

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. Градиент изображен на рисунке 10.



Рисунок 10 – Градиентное элюирование смеси метанола и ацетонитрила

При проведении анализа всего спектра стандартов была получена хроматограмма, изображенная на рисунке 11. Время выхода наименее гидрофобного порфирина (уропорфина I) было определено на 17,6 минуте.

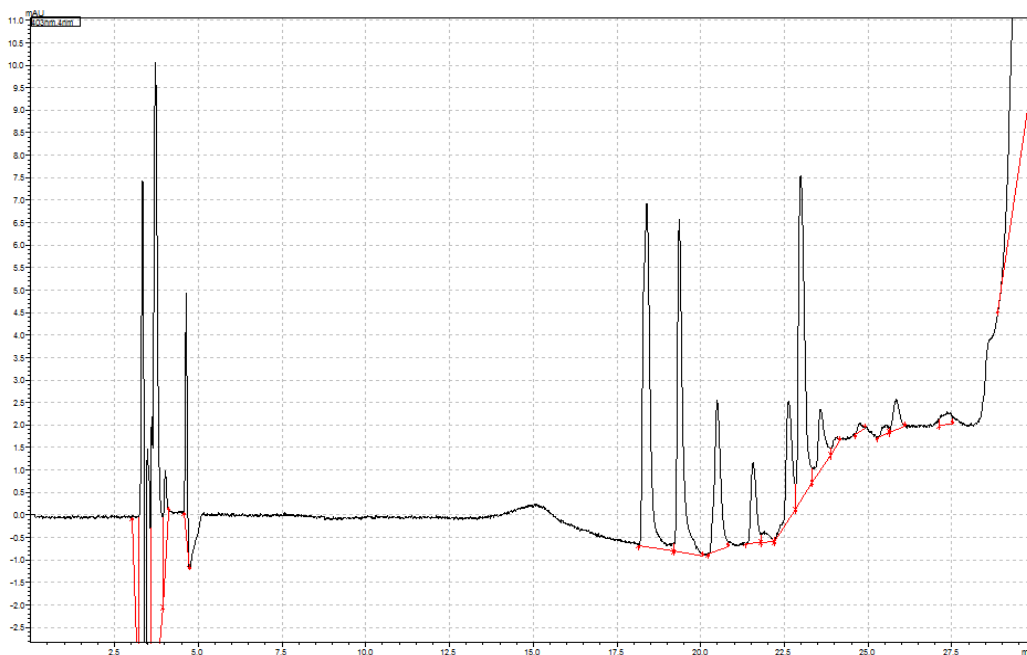


Рисунок 11 – Хроматограмма стандартов порфиринов при градиентном элюировании смесью метанола:ацетонитрила

После замены одного из растворителей (ацетонитрила) на 1М раствор аммония ацетата в воде, доведённый до рН 5,16 при помощи уксусной кислоты и изменения характера градиентного элюирования (рисунок 12), было получено более качественное разделение пиков различных стандартов со временем выхода у уропорфина I в районе 11,5 минут (рисунок 13), в связи с чем такое сочетание растворителей при градиентном элюировании было признано оптимальным.

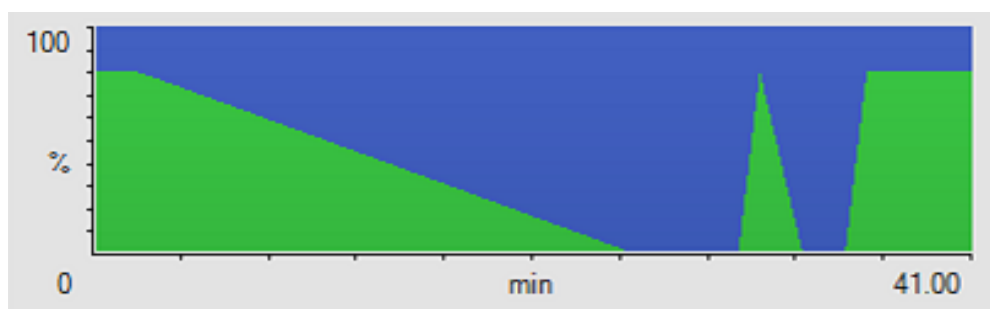


Рисунок 12 – Градиентное элюирование смеси метанола и 1М раствора аммония ацетата в воде с добавлением уксусной кислоты

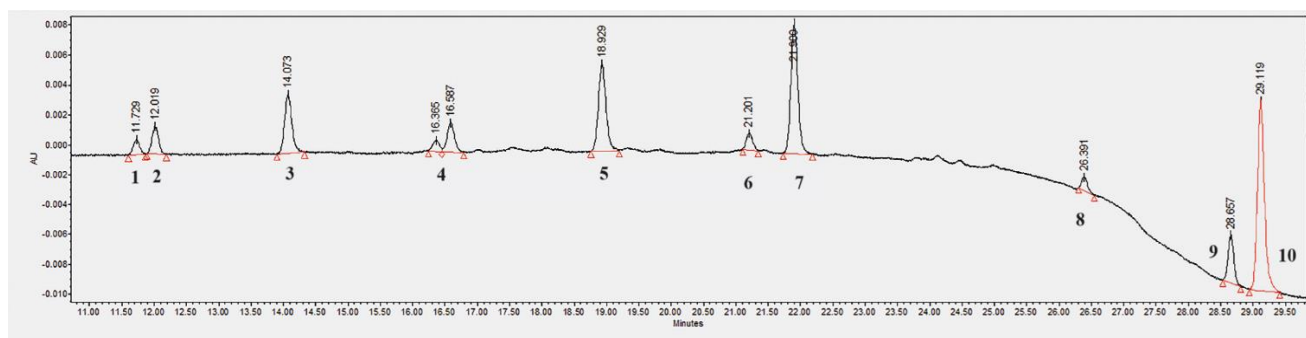


Рисунок 13 – Хроматограмма стандартов порфиринов в моче при индивидуальных концентрациях 95 – 500 нМ

Примечания: Времена удержания (мин) подписаны над пиками. 1 – уропорфирин I; 2 – уропорфирин III; 3 – гептакарбоксипорфирин; 4 – гексакарбоксипорфирин; 5 – пентакарбоксипорфирин; 6 – копропорфирин I; 7 – копропорфирин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX); 9 – мезопорфирин IX; 10 – протопорфирин IX

3.2. Условия хроматографирования

Система – Waters Acquity UPLC H-CLASS.

Детектор – УФ-детектор ACQ-PDA ел. $\lambda = 400$ нм, $\Delta\lambda = 1,2$ 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 м.

Температура термостата: $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Объём вкола – 10 мкл.

Скорость потока – 0,9 мл/мин.

Время анализа – 41 минута.

3.3. Разработка пробоподготовки в различных биоматериалах

3.3.1. Пробоподготовка мочи

Приготовление образцов мочи было выполнено модифицированным за счёт дополнительного центрифугирования методом DnS. К 500 мкл мочи прибавляли 500 мкл 2М соляной кислоты и 50 мкл 2мкМ внутреннего стандарта. Всё проводили в светонепроницаемых пробирках типа «Эппендорф». Далее смесь перемешивали в течение 10 мин, после центрифугировали 10 мин при 14000 g. Надосадочную жидкость также отбирали и вводили в хроматограф.

3.3.2. Пробоподготовка плазмы крови

Пробоподготовка крови проводилась аналогично способу приготовления калибровочных растворов в плазме. Применение ацетонитрила в качестве осаждающего агента позволило очистить супернатант от белков и других эндогенных компонентов плазмы. Добавление гидроксида аммония к осадку позволило растворить его и добавить к первичному супернатанту.

3.4. Результаты валидации методик в моче и их обсуждение

3.4.1. Валидация и калибровка методик

Сперва была проведена валидация методик качественного и количественного определения биомаркёров порфирий в моче [9]. Основными параметрами валидации, используемыми для оценивания аналитического метода послужили: селективность, линейность, прецизионность, правильность, нижний предел количественного определения, эффективность процесса, предел обнаружения, аналитическая область методики и стабильность. Калибровочные кривые строили

по семи точкам для каждого из исследуемых соединений. Данные кривые были построены методом наименьших квадратов.

3.4.2. Селективность

Для валидации селективности были проанализирована смесь 9 стандартов индивидуальных порфиринов вместе с внутренним стандартом (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX), хроматограмма представлена на рисунке 13. Хроматограмма донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта представлена на рисунке 14. Как видно на полученных хроматограммах стандартов порфиринов, изображенных на данных рисунках, свободные порфирины выходят в течение 30 мин. Установлено, что в приведённых условиях в моче эндогенные соединения не мешают определению анализируемого вещества и ВС, что и предопределяет высокую селективность. Также благодаря разработанным методикам получилось разделить изомеры не только уропорфина (уропорфирин I и уropорфирин III), но и копропорфина (копропорфирин I и копропорфирин III), что показано на хроматограммах (рисунки 15 – 18) в разных концентрациях с соответствующими временами удерживания (RT, мин). Не все методики способны на полное разделение вышеперечисленных изомеров [20]. По строению эти изомеры очень близки: они различаются лишь по радикалам в 17 и 18 положениях у уропорфиринов (остаток пропионовой и уксусной кислот) [114, 126] и копропорфиринов (метил и остаток пропионовой кислоты) [41]. Структурные формулы данных соединений представлены на рисунках 19 – 23.

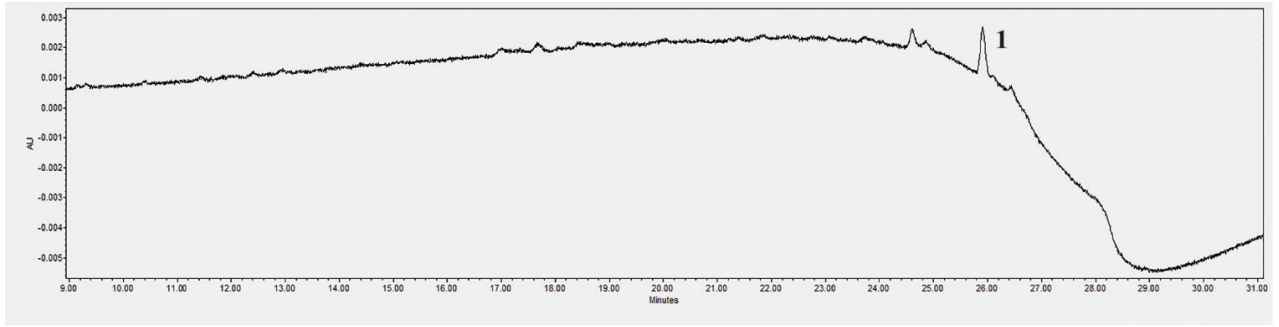


Рисунок 14 – Хроматограмма донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта (1) в концентрации 95 нМ

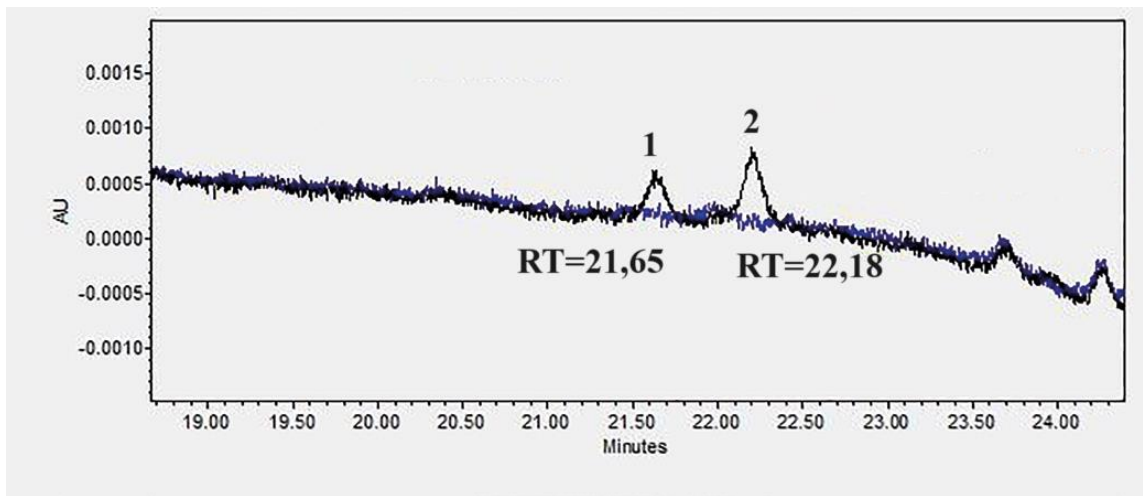


Рисунок 15 – Хроматограмма стандартов копропорфиринов I (1) и III (2) в концентрации 31,25 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)

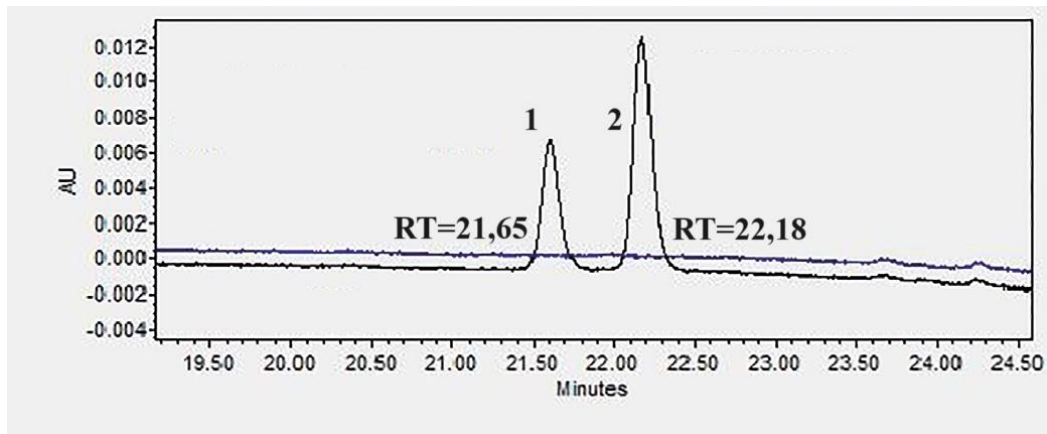


Рисунок 16 – Хроматограмма стандартов копропорфиринов I (1) и III (2) в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)

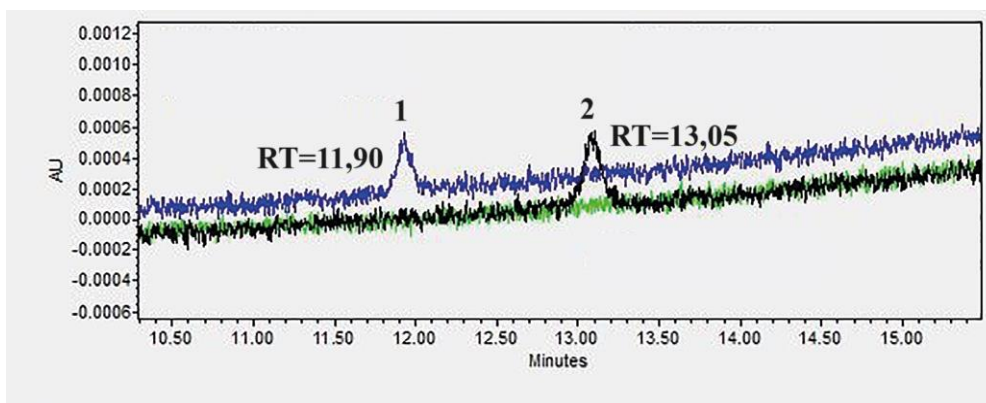


Рисунок 17 – Хроматограмма стандартов уропорфиринов I (1) и III (2) в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (зелёный)

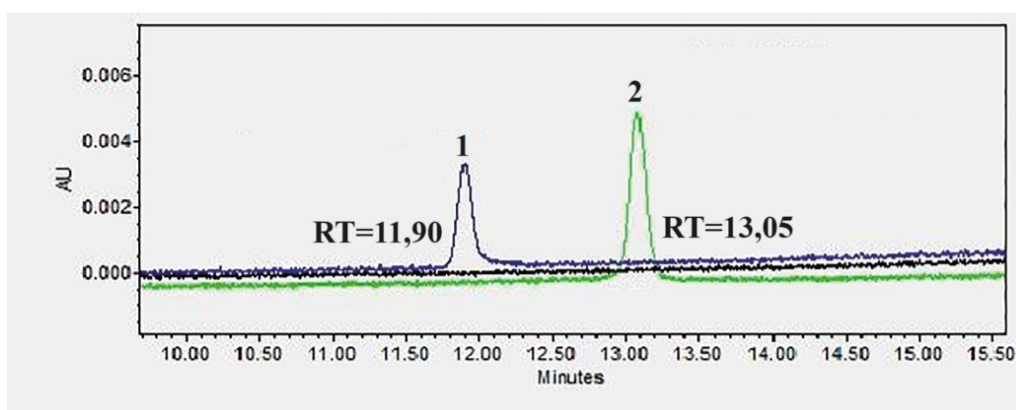


Рисунок 18 – Хроматограмма стандартов уропорфиринов I (1) и III (2) в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (чёрный)

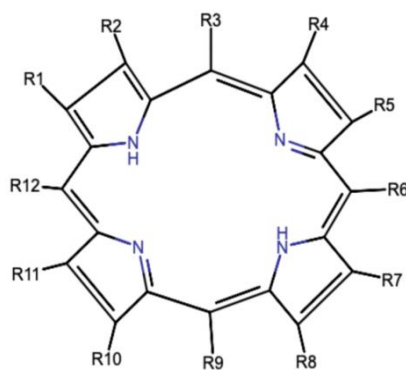


Рисунок 19 – Структура порфина с указанием мест для заместителей

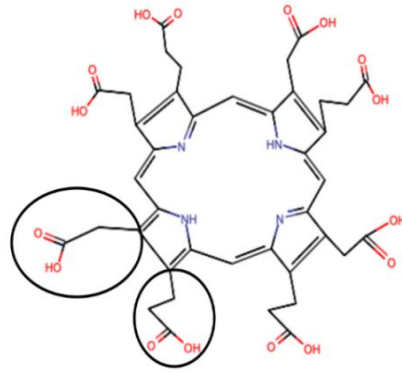


Рисунок 20 – Структурная формула уропорфирина III с указанием различающихся по строению заместителей

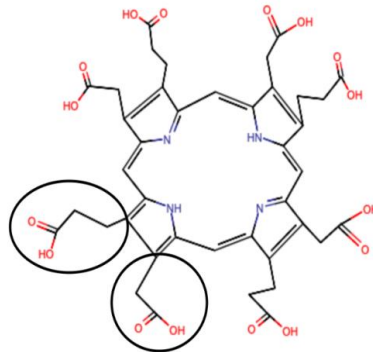


Рисунок 21 – Структурная формула уропорфирина I с указанием различающихся по строению заместителей

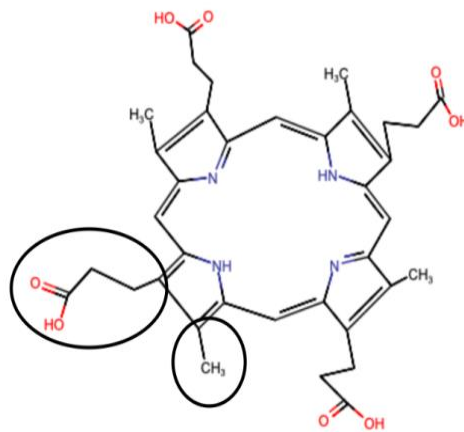


Рисунок 22 – Структурная формула копропорфирина I с указанием различающихся по строению заместителей

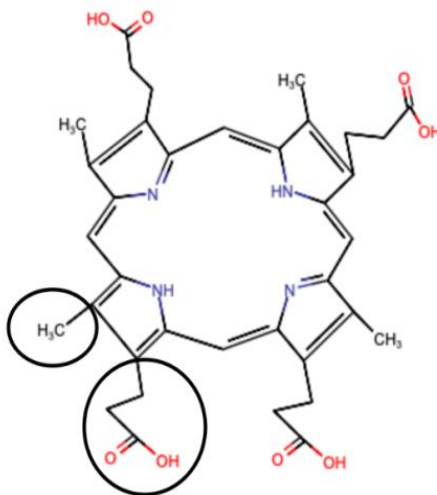


Рисунок 23 – Структурная формула копропорфирина III с указанием различающихся по строению заместителей

3.4.3. Линейность

Оценка линейности для образцов мочи была проведена на основании 9 серий разведений стандартов порфиринов (по 6 повторов в каждой из серий). Проводили анализ 9 донорских образцов с прибавлением стандартных растворов уропорфирина I, уропорфирина III, гептакарбоксипорфирина, гексакарбоксипорфирина, пентакарбоксипорфирина, 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. По полученным значениям построены калибровочные кривые. Полученные калибровочные графики представлены на рисунках 24 – 32. На графиках указаны уравнения аппроксимации и значения коэффициента детерминации. Выявлена линейная зависимость между отношением площадей пиков порфиринов и ВС от концентраций.

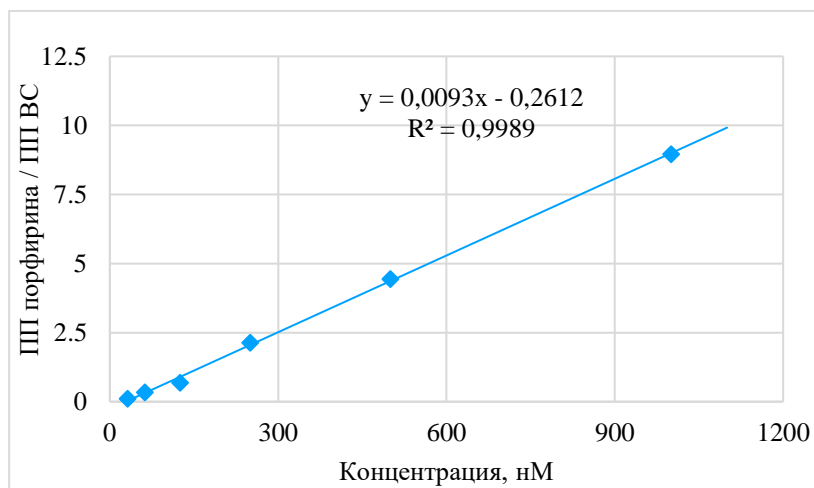


Рисунок 24 – Калибровочный график мезопорфирина IX (Ось x – концентрации мезопорфирина IX, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков мезопорфирина IX и ВС)

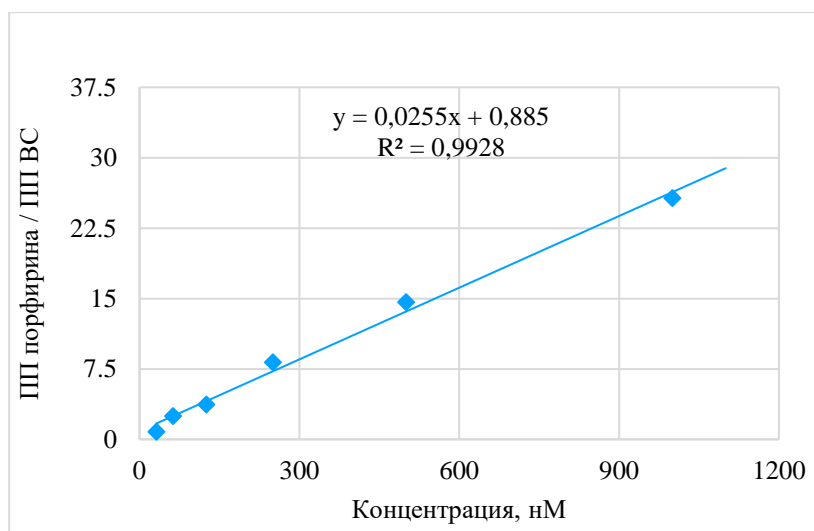


Рисунок 25 – Калибровочный график пентакарбоксихромина (Ось x – концентрации пентакарбоксихромина, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков пентакарбоксихромина и ВС)

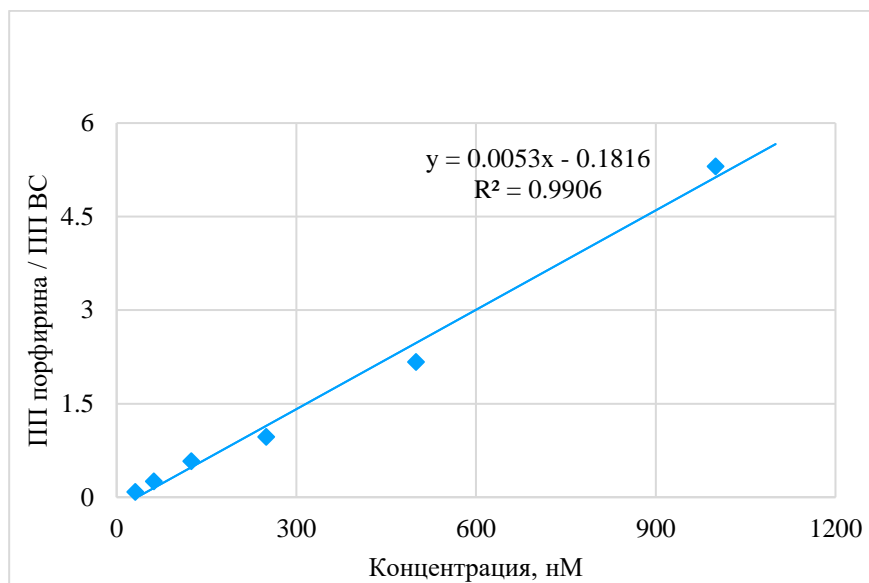


Рисунок 26 – Калибровочный график уропорфирина I (Ось x – концентрации уропорфирина I, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков уропорфирина I и ВС)

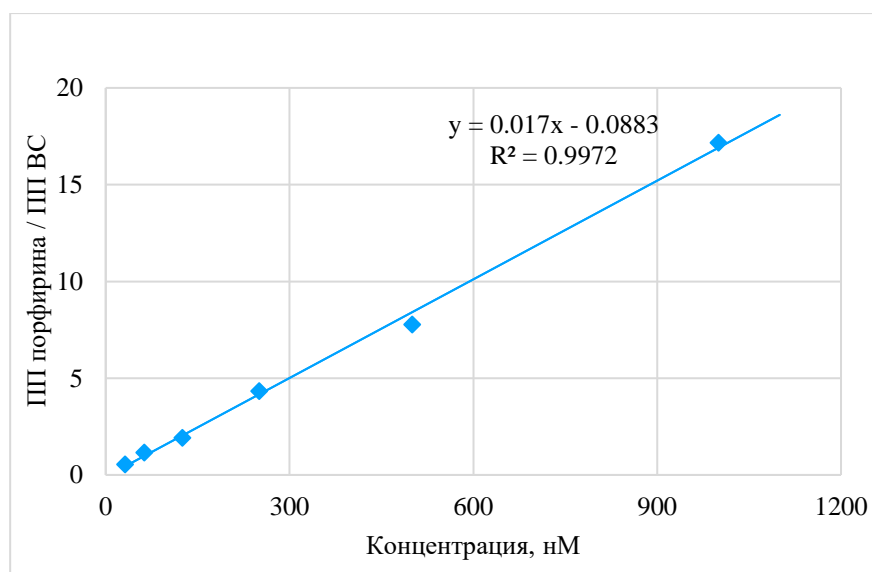


Рисунок 27 – Калибровочный график гексакарбоксихропорфирина (Ось x – концентрации гексакарбоксихропорфирина, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков гексакарбоксихропорфирина и ВС)

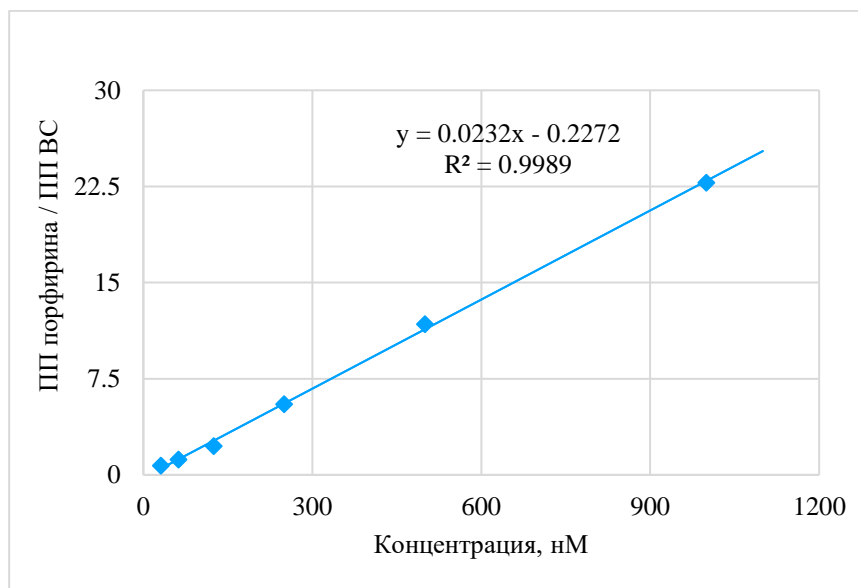


Рисунок 28 – Калибровочный график уропорфирина III (Ось x – концентрации уропорфирина III, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков уропорфирина III и ВС)

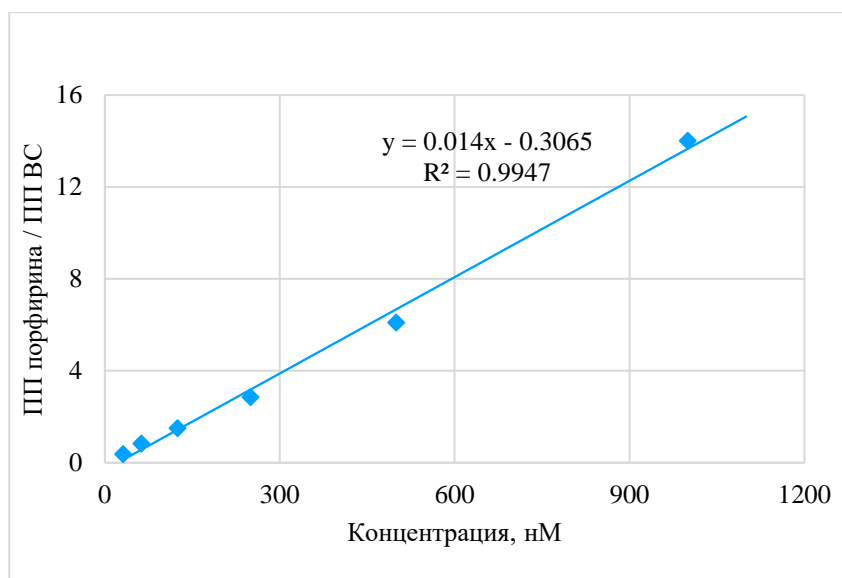


Рисунок 29 – Калибровочный график копропорфирина I (Ось x – концентрации копропорфирина I, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков копропорфирина I и ВС)

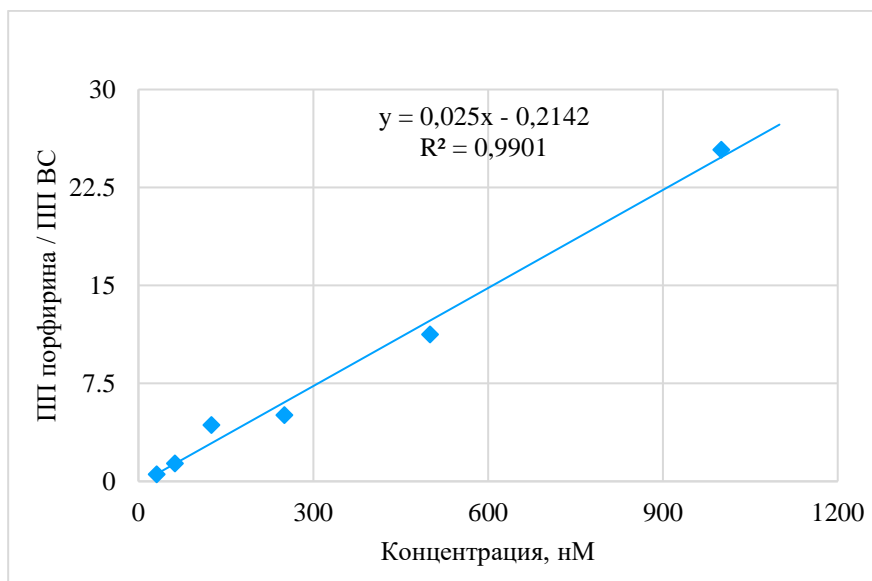


Рисунок 30 – Калибровочный график копропорфина III (Ось x – концентрации копропорфина III, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков копропорфина III и ВС)

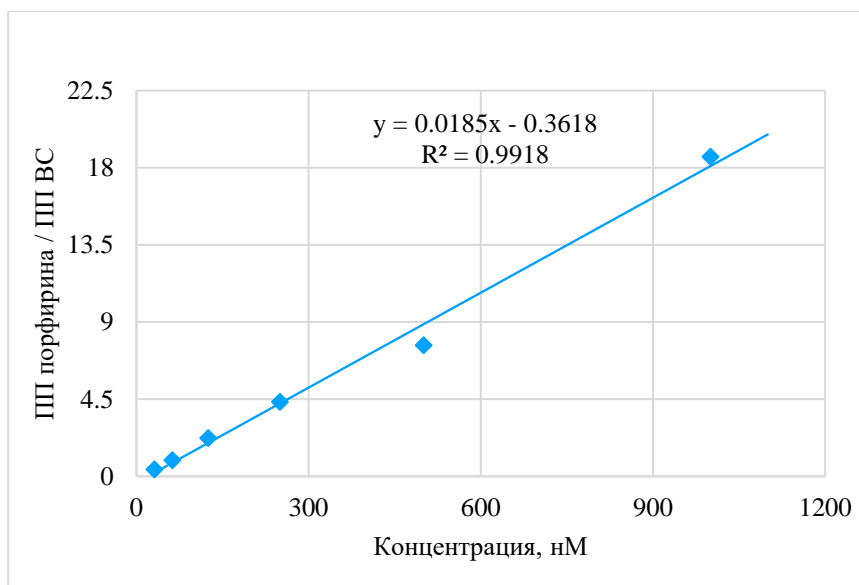


Рисунок 31 – Калибровочный график гептакарбоксихлоропорфина (Ось x – концентрации гептакарбоксихлоропорфина, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков гептакарбоксихлоропорфина и ВС)

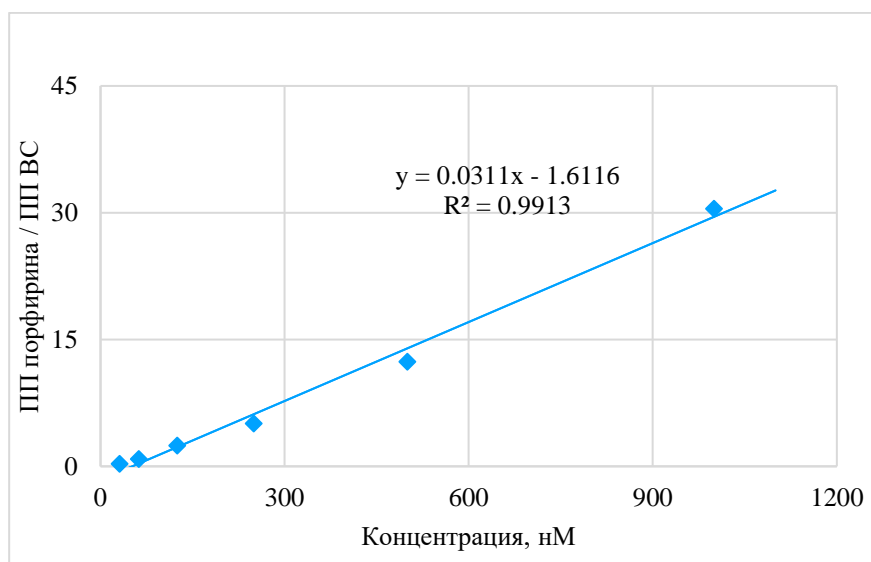


Рисунок 32 – Калибровочный график протопорфирина IX (Ось x – концентрации протопорфирина IX, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков протопорфирина IX и ВС)

3.4.4. Правильность и прецизионность

Оценка прецизионности и правильности 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) и предел относительной погрешности (ϵ , %).

Критериями приемлемости методики приняты:

- при концентрации на уровне НПКО: прецизионность (CV) < 20%;
- при концентрациях выше уровня НПКО: прецизионность (CV) < 15%;
- относительная погрешность (ϵ) в пределах [-20%, 20%] для оценки параметра правильности.

Результаты анализа представлены в таблицах 5 – 13.

Таблица 5 – Показатели прецизионности и правильности мезопорфирина IX

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	999,83	975	1021,6	1071,72	967,8	1011,11	1007,84	37,49	3,72	15,30	0,78
500	506,25	562,2	480,54	540,12	478,98	450,78	503,15	41,72	8,29	17,03	0,63
250	254,27	230,74	270	285,35	212,53	254,78	251,28	26,29	10,46	10,73	0,51
125	96,11	115,78	130,78	140,15	115,04	137,57	122,57	16,76	13,67	6,84	-1,98
62,5	58,21	65,76	60,05	61	63,67	68	62,78	3,70	5,89	1,51	0,45
31,25	32,82	30,07	29,88	27,53	32	33,33	30,94	2,19	7,06	0,89	-1,01

Таблица 6 – Показатели прецизионности и правильности пентакарбоксихлоропорфирина

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	970,69	1020,28	988,8	999	1070,5	975,37	1004,11	37,07	3,69	15,13	0,41
500	540,51	532,67	490,78	511,11	499	467,89	506,99	27,04	5,33	11,04	1,38
250	291,68	222,35	257,34	219,78	211	280	247,03	34,17	13,83	13,95	-1,20
125	117,79	111	145,45	109,98	150	132,67	127,82	17,48	13,68	7,14	2,20
62,5	69,58	56,77	70,32	58,71	59,99	60,01	62,56	5,85	9,35	2,39	0,10
31,25	17,25	29,03	28,88	30,78	32,37	31,87	28,36	5,63	19,84	2,30	-10,18

Таблица 7 – Показатели прецизионности и правильности копропорфина I

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1015,36	1039,17	987,87	975,89	1101,23	1150,79	1045,05	68,27	6,53	27,87	4,31
500	464,32	427,74	487,87	490,65	499,23	510,1	479,99	29,76	6,20	12,15	-4,17
250	260,74	205,91	210,34	223,45	273,12	222,54	232,68	27,66	11,89	11,29	-7,44
125	117,06	141,88	111,67	154,89	133,32	110,02	128,14	18,19	14,19	7,42	2,45
62,5	70,2	67,5	60,07	54,78	65,5	70,35	64,73	6,17	9,54	2,52	3,45
31,25	41,07	35,72	30,31	27,89	29,99	33,27	33,04	4,80	14,51	1,96	5,42

Таблица 8 – Показатели прецизионности и правильности протопорфина IX

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1002,94	1024,12	970,09	985,87	999,23	1027	1001,54	21,91	2,19	8,94	0,15
500	506,74	478,5	476,89	498,28	511,75	505,32	496,25	15,01	3,02	6,13	-0,76
250	230,68	209,38	255,09	247,78	239,99	265,43	241,39	19,74	8,18	8,06	-3,57
125	103,89	91,75	130,01	111,98	127,77	128,56	115,66	15,77	13,63	6,43	-8,08
62,5	68,83	64,36	60,03	61,11	65,32	70,53	65,03	4,14	6,36	1,69	3,89
31,25	45,66	33,09	37,05	33,45	38,89	37,3	37,57	4,57	12,17	1,87	16,83

Таблица 9 – Показатели прецизионности и правильности уропорфирина I

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1039,04	1020,3	987,65	979,31	1007,77	1076,89	1018,49	35,88	3,52	14,65	1,82
500	438,94	477,83	542,22	511,5	509,25	483,33	493,85	35,41	7,17	14,45	-1,25
250	208,83	233,83	278,51	265,81	231,11	247,1	244,20	25,23	10,33	10,30	-2,38
125	134,15	111,16	134,76	128,88	109,99	130,88	124,97	11,36	9,09	4,64	-0,02
62,5	87,46	68,09	70,2	58,89	65,81	67,64	69,68	9,53	13,68	3,89	10,31
31,25	39,17	38,85	36,77	37,22	33,11	32,99	36,35	2,72	7,48	1,11	14,03

Таблица 10 – Показатели прецизионности и правильности гексакарбоксихлоропоририна

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1044,19	1033,65	1022,11	1010,1	987,65	991,1	1014,80	22,77	2,24	9,30	1,46
500	422,77	434,56	441,78	467,11	489,91	512,13	461,38	34,69	7,52	14,16	-8,37
250	216,86	222,22	278,99	237,75	261,19	254,1	245,19	23,93	9,76	9,77	-1,96
125	132,16	127,77	111,53	109,89	130,88	141,78	125,67	12,51	9,95	5,10	0,53
62,5	86,46	77,11	71,61	65,15	60,02	61,87	70,37	10,12	14,39	4,13	11,18
31,25	49,65	35,41	41,09	37,89	32,11	30,6	37,79	6,95	18,38	2,83	17,31

Таблица 11 – Показатели прецизионности и правильности гептакарбоксихлорофана

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
1000	1033,32	1023,24	1087,76	985,41	995,12	1111,19	1039,34	50,33	4,84	20,54	3,79
500	493,18	489,11	475,38	512,29	533,07	502,11	500,86	20,08	4,01	8,20	0,17
250	209,51	215,22	221,99	237,65	243,12	270,31	232,97	22,38	9,61	9,14	-7,31
125	119,52	108,88	111,28	140,9	132,22	111,77	120,76	13,04	10,80	5,32	-3,51
62,5	77,47	55,45	57,71	65,56	73,28	67,72	66,20	8,57	12,95	3,50	5,59
31,25	30,22	32,27	23,98	25,66	33,91	37,73	30,63	5,16	16,84	2,10	-2,03

Таблица 12 – Показатели прецизионности и правильности уропорфина III

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
1000	907,76	1040,4	945,98	977,1	937,11	1030,09	973,07	53,09	5,46	21,67	-2,77
500	478,45	424,86	487,1	511,19	506,81	507,11	485,92	32,59	6,71	13,30	-2,90
250	228,6	221,54	233,31	245,67	258,19	263,31	241,77	16,75	6,93	6,84	-3,40
125	133,3	153,31	143,11	120,02	111,67	110,88	128,72	17,42	13,53	7,11	2,89
62,5	86,77	73,19	91,11	70,12	67,79	68,12	76,18	10,16	13,34	4,15	17,96
31,25	47,11	39,82	36,88	35,12	34,99	32,2	37,69	5,25	13,94	2,14	17,08

Таблица 13 – Показатели прецизионности и правильности копропорфирина III

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	995,44	1025,41	1009,98	1100,11	987,11	976,55	1015,77	44,75	4,41	18,27	1,55
500	667,57	465,55	511,18	506,55	486,77	489,03	521,11	73,56	14,12	30,03	4,05
250	207,22	213,16	267,71	243,32	238,19	275,75	240,89	27,75	11,52	11,33	-3,78
125	108,76	124,57	109,98	107,76	132,23	123,23	117,76	10,27	8,72	4,19	-6,15
62,5	51,31	70,62	60,15	57,71	58,76	61,11	59,94	6,27	10,45	2,56	-4,27
31,25	37,22	42,87	33,38	26,43	25,57	37,11	33,76	6,74	19,96	2,75	7,44

3.4.5. Влияние биологической матрицы

Эффективность процесса определяется влиянием среды (эндогенных соединений, макромолекул) на искомые соединения, находящиеся в меньших концентрациях. Матрица может сильно влиять на точность определения аналитов. Значения фактора эффективности выступают результатом оценки эффективности процесса. Для просчета FE сравнивали образцы мочи с водными растворами (с добавлением HCl 2Н) порфиринов в концентрациях 50 нМ в нескольких повторах. Результат сравнения представлен в таблице 14.

Таблица 14 – Сравнение интенсивности пиков стандартов порфиринов в образцах мочи и подкисленных (HCl 2Н) водных образцах, рассчитанное на основании результатов от трёх повторов

№	Образец мочи	Водные образцы сравнения с добавлением HCl 2Н	Фактор эффективности
Уропорфирин I			
$\bar{x} \pm SD$	2513 ± 59,48	1566 ± 58,29	1,61 ± 0,03
CV, %	2,37	3,72	2,06
Уропорфирин III			
$\bar{x} \pm SD$	3676 ± 260,89	3376 ± 313,67	1,09 ± 0,02
CV, %	7,10	9,29	2,14
Гептакарбоксипорфирин			
$\bar{x} \pm SD$	8187 ± 901,65	7050 ± 911,85	1,16 ± 0,05
CV, %	11,01	12,93	4,11
Гексакарбоксипорфирин			
$\bar{x} \pm SD$	6528 ± 519,97	5287 ± 654,31	1,24 ± 0,07
CV, %	7,96	12,38	5,28
Пентакарбоксипорфирин			
$\bar{x} \pm SD$	13991 ± 1053,97	10800 ± 631,74	1,29 ± 0,04

Продолжение Таблицы 14

CV, %	7,53	5,85	2,84
Копропорфирин I			
$\bar{x} \pm SD$	4615 \pm 417,85	2556 \pm 245,71	1,81 \pm 0,07
CV, %	9,05	9,61	3,81
Копропорфирин III			
$\bar{x} \pm SD$	19658 \pm 1163,48	13869 \pm 601,39	1,42 \pm 0,03
CV, %	5,92	4,34	1,79
Мезопорфирин IX			
$\bar{x} \pm SD$	5422 \pm 348,98	3184 \pm 178,89	1,70 \pm 0,03
CV, %	6,44	5,62	1,47
Протопорфирин IX			
$\bar{x} \pm SD$	24725 \pm 2029,68	12237 \pm 1084,93	2,02 \pm 0,01
CV, %	8,21	8,87	0,68
Внутренний стандарт			
$\bar{x} \pm SD$	2641 \pm 365,05	1353 \pm 162,10	1,96 \pm 0,24
CV, %	13,82	11,98	12,10

Значения факторов эффективности для различных типов порфиринов колеблются в диапазоне от 1,09 до 2,02, что указывает на высокое влияние компонентов матричных биоматериалов. Значения фактора эффективности для внутреннего стандарта в зависимости от различных серий, так же изменяется в диапазоне значений $1,96 \pm 0,24$, что закономерно, так как используемый внутренний стандарт также является тетрапиррольным макроциклом и имеет те же физико-химические свойства.

Соотношение между интенсивностями ВС и каждым отдельным порфирином в водном растворе и соотношение интенсивностей порфиринов и ВС в моче практически равны. Нормализованный фактор эффективности подходит к значению «1», так как ВС практически нивелирует влияние эндогенных

компонентов биоматрицы на определение биомаркёров порфирий. Результаты соотношения между интенсивностями и коэффициент вариации для каждого из анализируемых порфиринов представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Значения нормализованного по ВС фактора эффективности для различных порфиринов, определяемых в моче

Порфирины	$\bar{x} \pm SD$	CV, %
Уропорфирин I	0,83 ± 0,09	11,19
Уропорфирин III	0,56 ± 0,07	12,24
Гептакарбоксипорфирин	0,60 ± 0,09	14,93
Гексакарбоксипорфирин	0,64 ± 0,04	6,99
Пентакарбоксипорфирин	0,67 ± 0,07	10,90
Копропорфирин I	0,93 ± 0,08	9,02
Копропорфирин III	0,73 ± 0,10	13,32
Мезопорфирин	0,88 ± 0,12	13,32
Протопорфирин IX	1,04 ± 0,10	9,52

Коэффициент вариации ниже 15% показывает, что нормализованный по ВС фактор эффективности стабилен и различия в его значениях между пробами приемлемы.

3.4.6. Нижний предел количественного определения и предел обнаружения

Нижний предел количественного определения методик был найден, основываясь на данных линейности, правильности и прецизионности. На выбранном уровне 62,5 нМ в качестве НПКО получилось определять порфирины с высокой точностью. На рисунке 33 изображена хроматограмма протопорфирина IX

на уровне НПКО в сравнении с фоном – донорской мочой с указанием времени удержания (RT, мин).

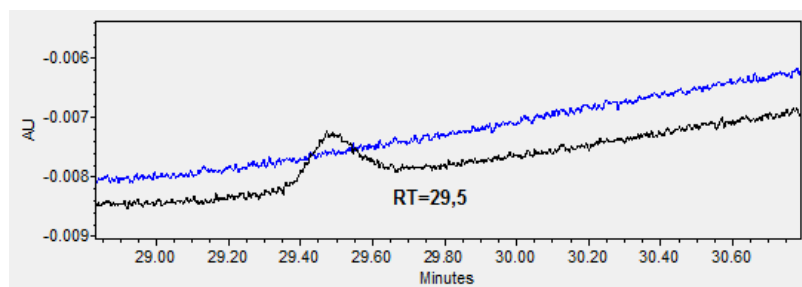


Рисунок 33 – Хроматограмма стандарта протопорфирина IX (чёрный) в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)

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. На рисунке 34 представлена хроматограмма протопорфирина IX в донорской моче со временем удержания (RT, мин).

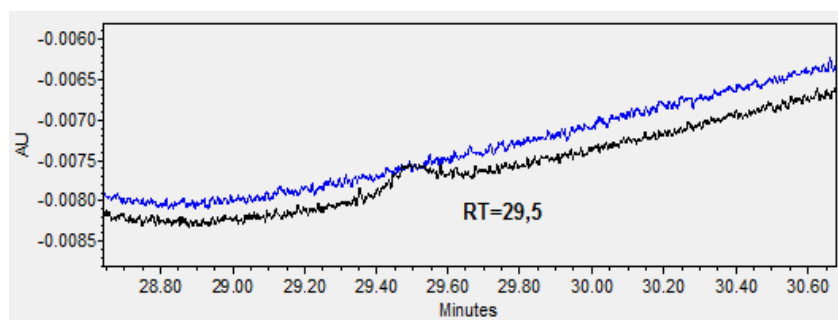


Рисунок 34 – Хроматограмма стандарта протопорфирина IX в концентрации 31,25 нМ (чёрный) в сравнении с интактной донорской мочой (синий)

3.4.7. Аналитическая область методик

В рамках проведённой работы была определена аналитическая область методик в границах от 31,25 нМ до 1000 нМ для качественного и количественного определения порфиринов.

3.4.8. Стабильность

Стабильность была подтверждена для SSS мочи каждого из типа порфиринов (при хранении растворов в течение 3 месяцев при температуре +4 С⁰). 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 морозильнике при температуре –40 С⁰ 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.

3.5. Результаты валидации методик в плазме и их обсуждение

3.5.1. Валидация и калибровка методик

Была проведена валидация методик качественного и количественного определения порфиринов плазме крови [15]. Основными параметрами валидации, используемыми для оценивания данных методик, были выбраны те же: селективность, линейность, прецизионность, правильность, нижний предел количественного определения, эффективность процесса, предел обнаружения, стабильность и аналитическая область методик. Калибровочные кривые строили по семи точкам для каждого из исследуемых соединений. Данные кривые были построены методом наименьших квадратов.

3.5.2. Селективность

При определении селективности в плазме крови были проанализированы также 9 стандартов индивидуальных порфиринов и IS. Отдельно была проанализирована сама плазма с добавлением внутреннего стандарта. Данные представлены в виде хроматограмм, которые показаны на рисунках 35, 36.

Установлено также, что возможно разделить изомеры уропорфина (уропорфин I и уropорфин III), но начиная с концентрации в 125 нМ, и копропорфина (копропорфина I и копропорфин III), что видно на рисунках 37 и 38 с указанными временами удержания (RT, мин). Полученные в плазме крови значения для фактора разделения и разрешения у соответствующих порфиринов равны для уропорфинов 1,03 и 1,08, а для копропорфинов – 1,02 и 0,95, соответственно. Также в плазме были получены разрешение – 0,5 и фактор разделения – 1,01 для гексакарбоксихлоропорфина, что было признано неудовлетворительным результатом, представленным в виде хроматограммы на рисунке 39. Данные изомеры не являются определяющими при диагностике какого-либо из подвидов порфирий, также их отдельный подсчёт не несёт под собой критической важности для определения порфирий. Поэтому для анализа изучаемой группы заболеваний подходит измерение суммы изомеров, что согласуется с изученными литературными данными [20]. Высокая селективность методики позволяет определить независимо друг от друга эндогенные порфирины и мезопорфин IX, являющийся активно действующим метаболитом для лечения гипербилирубинемии. На рисунках 40 и 41 соответственно представлены различия между строениями двух изомеров гексакарбоксихлоропорфинов (I и III).

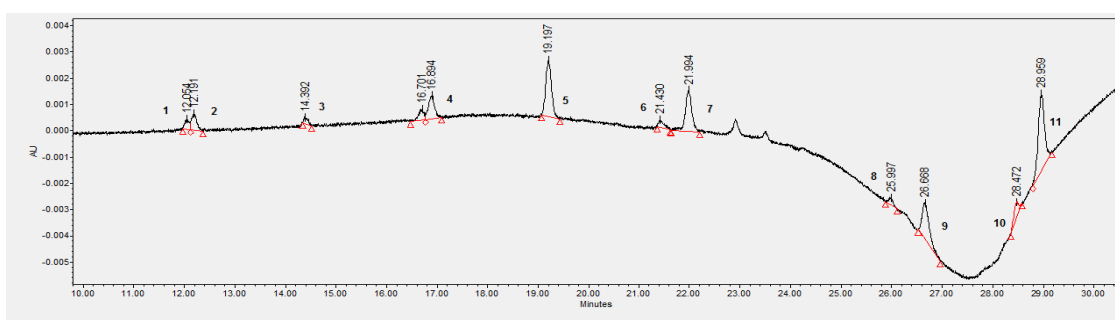


Рисунок 35 – Хроматограмма стандартов порфиринов в плазме крови при индивидуальных концентрациях 50 нМ

Примечания: Времена удержания (мин) подписаны над пиками. 1 – уropорфин I; 2 – уropорфин III; 3 – гептакарбоксихлоропорфин; 4 – гексакарбоксихлоропорфин; 5 – пентакарбоксихлоропорфин; 6 – копропорфин I; 7 – копропорфин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфин IX); 9 – гем; 10 – мезопорфин IX; 11 – протопорфин IX

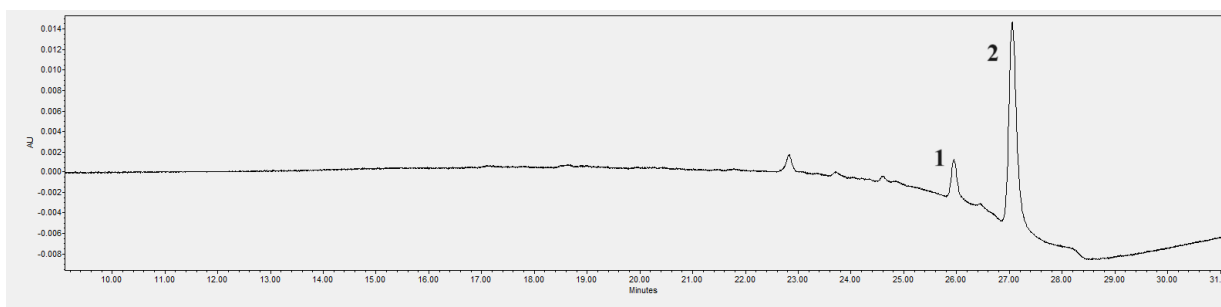


Рисунок 36 – Хроматограмма донорской плазмы крови с добавлением внутреннего стандарта (1) в концентрации 95 нМ на фоне гема (2)

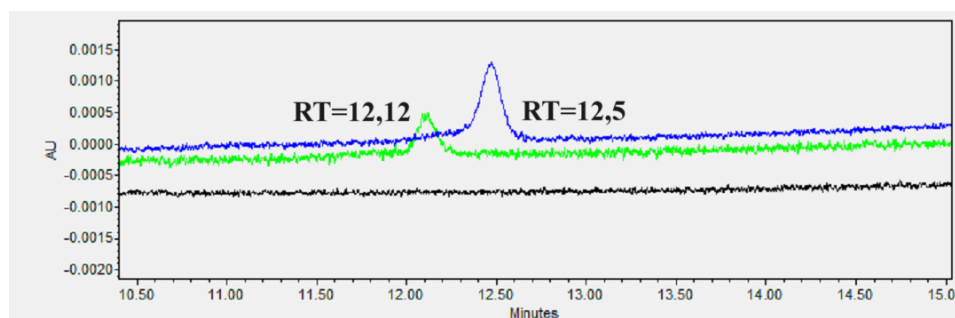


Рисунок 37 – Хроматограмма стандартов уропорфиринов I (зелёный) и III (синий) в концентрации 250 нМ в сравнении с интактной донорской плазмой (чёрный)

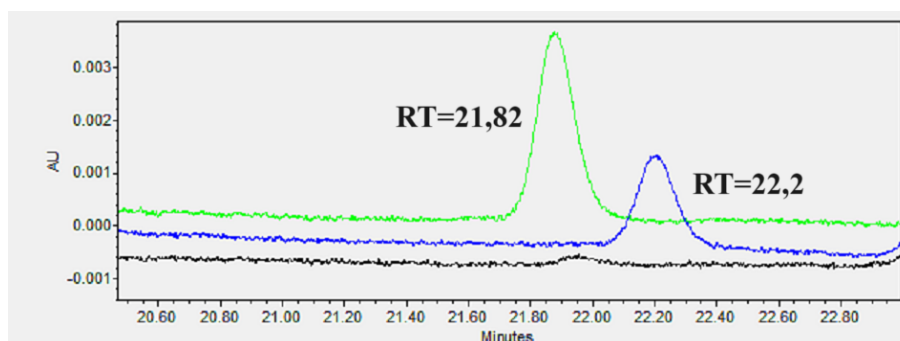


Рисунок 38 – Хроматограмма стандартов копропорфиринов I (зелёный) и III (синий) в концентрации 250 нМ в сравнении с интактной донорской плазмой (чёрный)

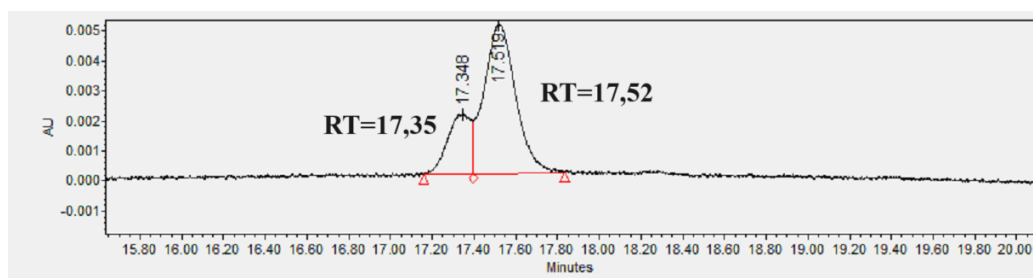


Рисунок 39 – Хроматограмма стандарта гексакарбоксихропорфирина в концентрации 500 нМ

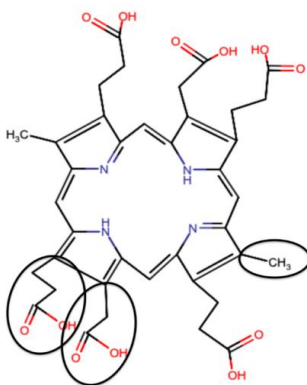


Рисунок 40 – Структурная формула гексакарбоксихлорофтора I с указанием различающихся по строению заместителей

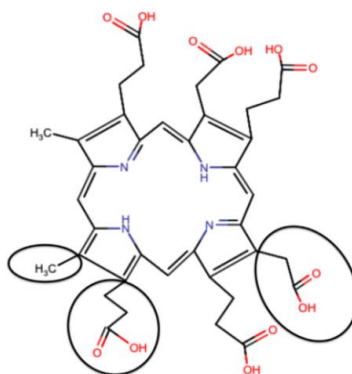


Рисунок 41 – Структурная формула гексакарбоксихлорофтора III с указанием различающихся по строению заместителей

3.5.3. Линейность

Для оценки линейности было проанализировано по 9 серий (по 6 повторов в каждой из серий) образцов плазмы с добавленными стандартами порфиринов.

Рисунки 42 – 51 отображает калибровочные графики в диапазонах от 0 до 1000 нМ, охватывающие диапазоны концентраций каждого из порфиринов от 0 до 1000 нМ. По отношению площадей пиков порфиринов к площади пиков внутреннего стандарта от концентраций была доказана линейная зависимость, выведено уравнение аппроксимации и R^2 .

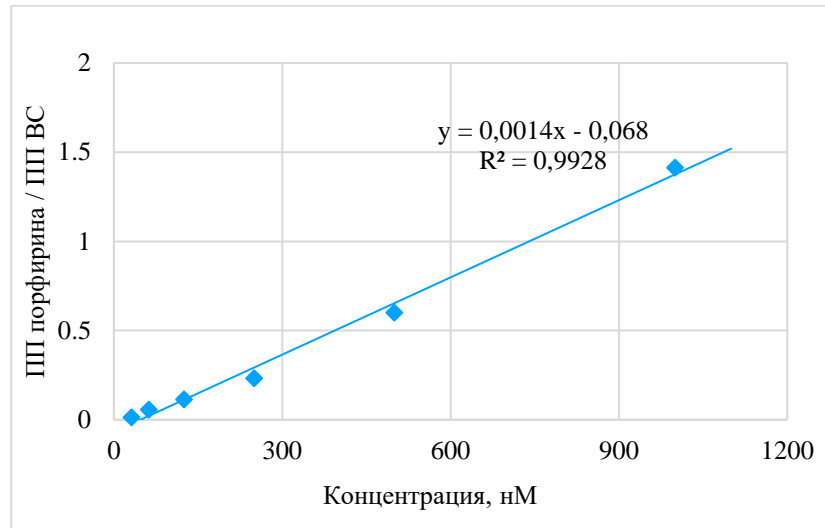


Рисунок 42 – Калибровочный график уропорфирина III (Ось x – концентрации уропорфирина III, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков уропорфирина III и ВС)

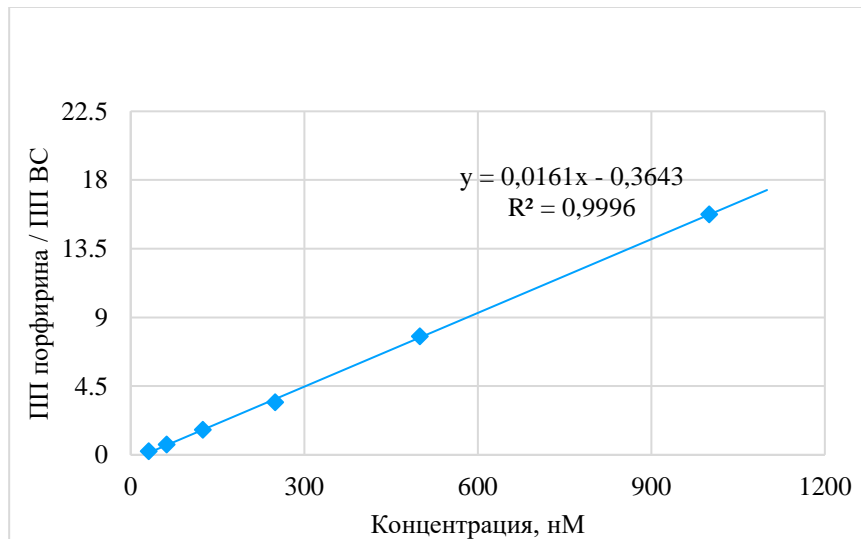


Рисунок 43 – Калибровочный график мезопорфирина IX (Ось x – концентрации мезопорфирина IX, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков мезопорфирина IX и ВС)

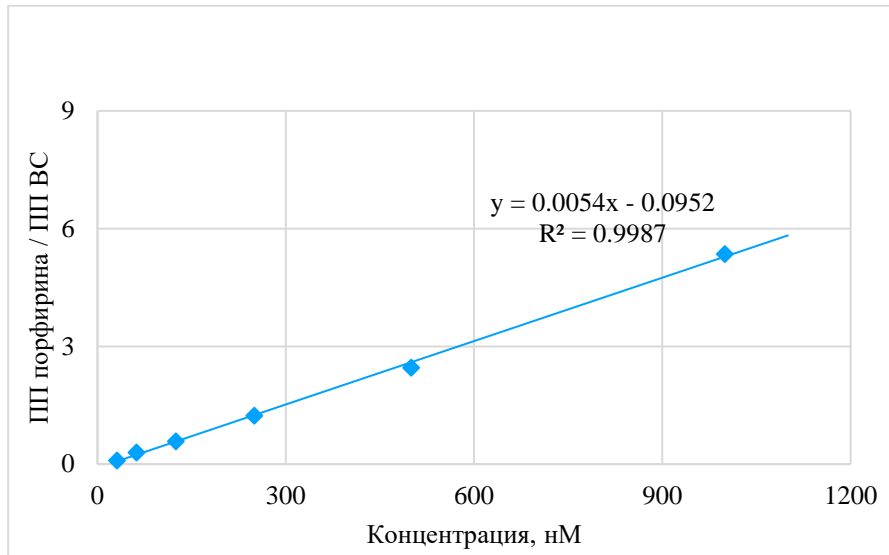


Рисунок 44 – Калибровочный график гептакарбоксихлорофана (Ось x – концентрации гептакарбоксихлорофана, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков гептакарбоксихлорофана и ВС)

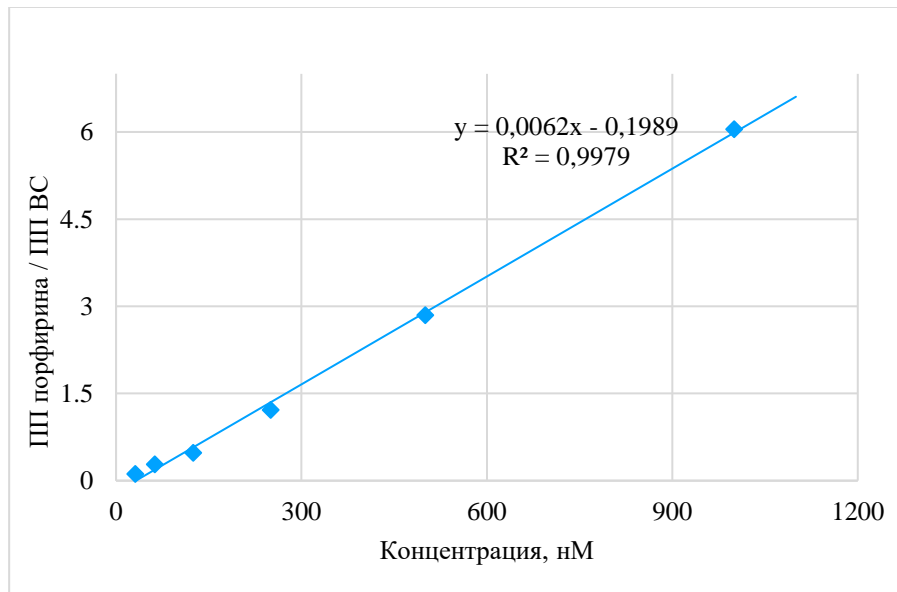


Рисунок 45 – Калибровочный график копропорфина I (Ось x – концентрации копропорфина I, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков копропорфина I и ВС)

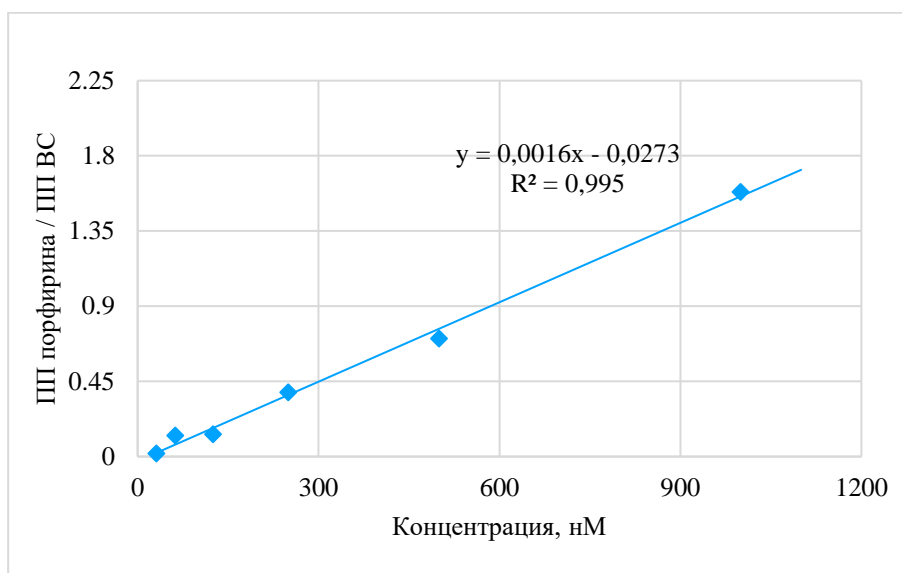


Рисунок 46 – Калибровочный график гексакарбоксихлорофана I (Ось x – концентрации гексакарбоксихлорофана I, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков гексакарбоксихлорофана I и ВС)

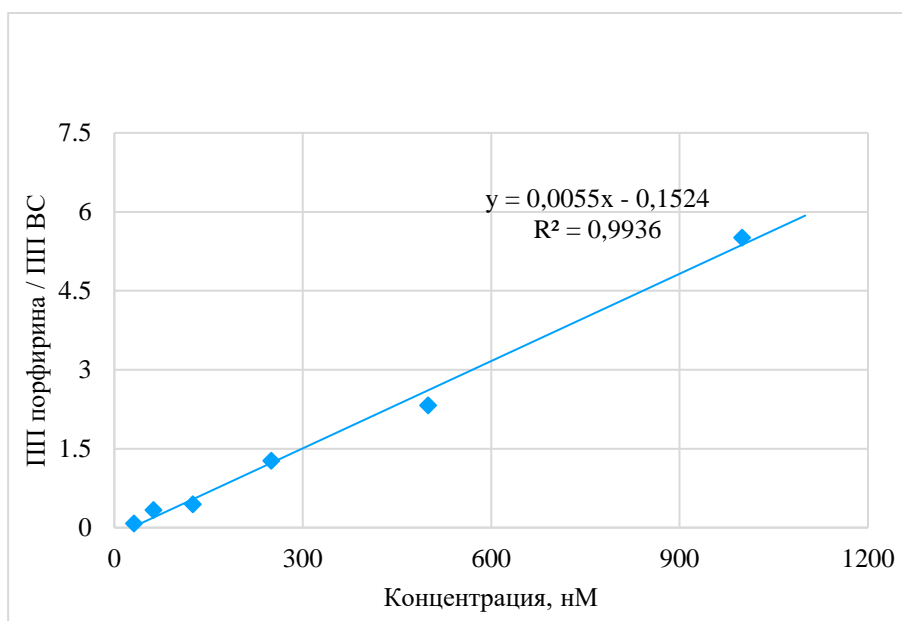


Рисунок 47 – Калибровочный график гексакарбоксихлорофана III (Ось x – концентрации гексакарбоксихлорофана III, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков гексакарбоксихлорофана III и ВС)

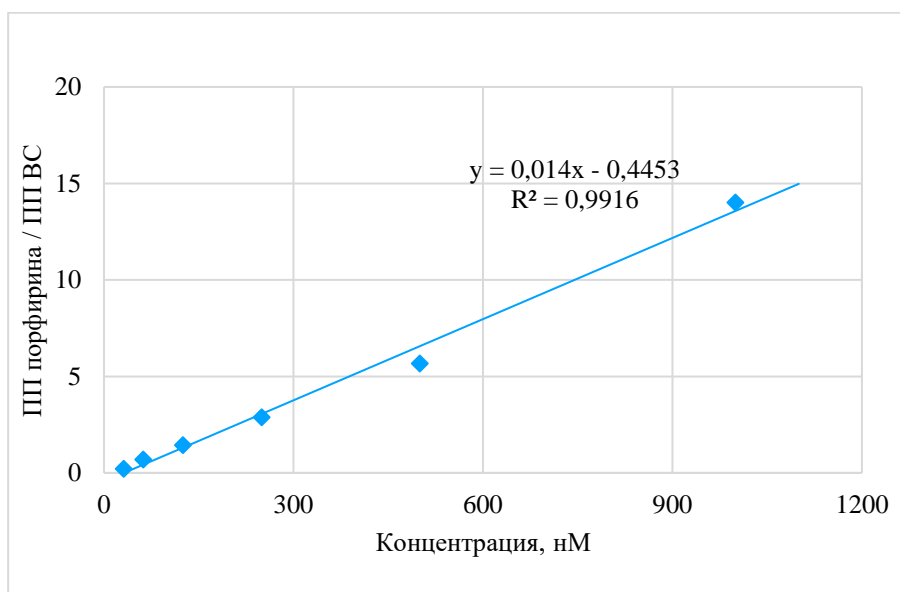


Рисунок 48 – Калибровочный график протопорфирина IX (Ось x – концентрации протопорфирина IX, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков протопорфирина IX и ВС)

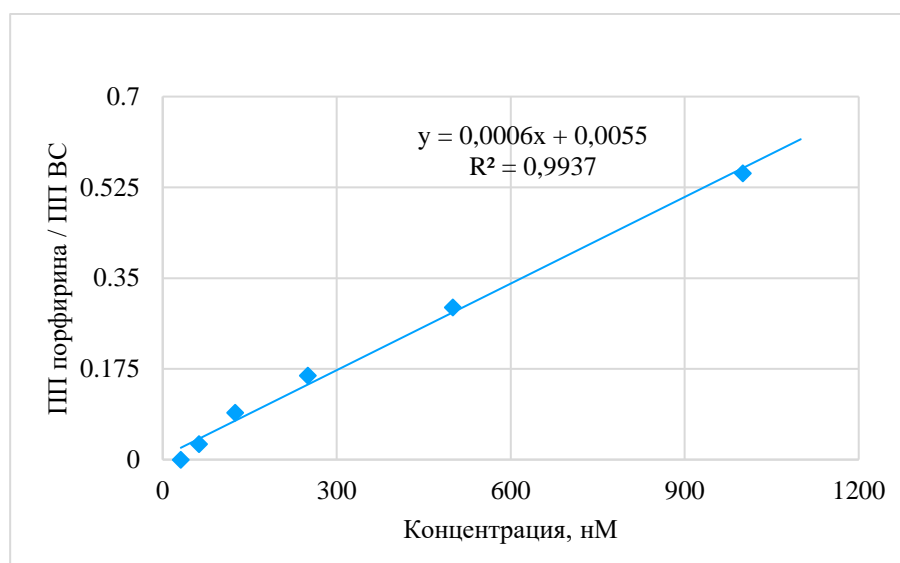


Рисунок 49 – Калибровочный график уропорфирина I (Ось x – концентрации уропорфирина I, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков уропорфирина I и ВС)

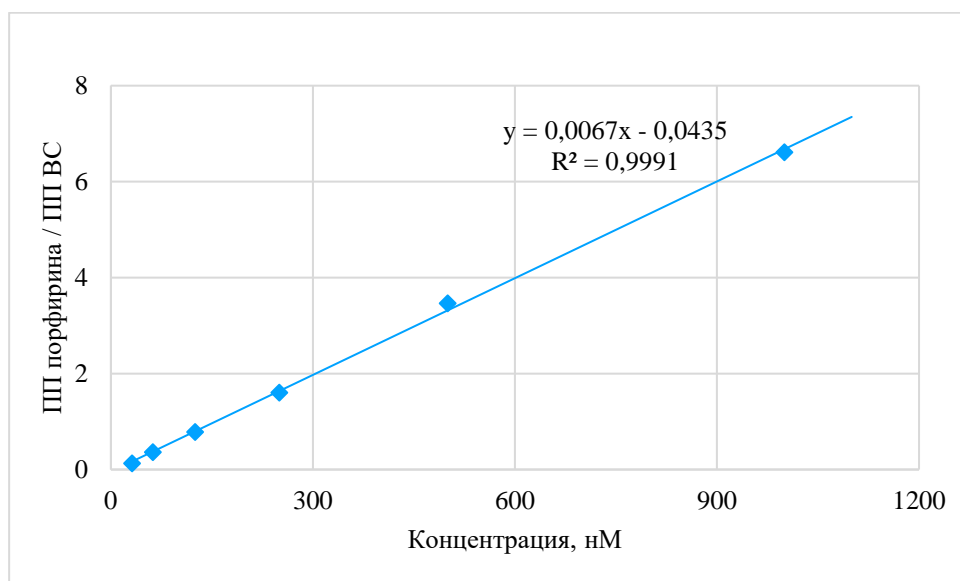


Рисунок 50 – Калибровочный график пентакарбоксихлорофитина (Ось x – концентрации пентакарбоксихлорофитина, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков пентакарбоксихлорофитина и ВС)

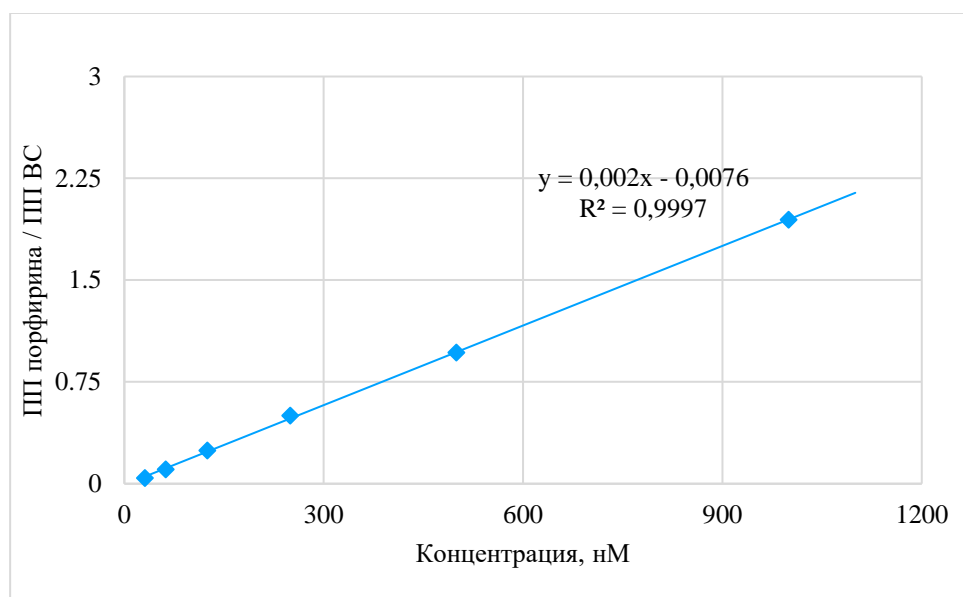


Рисунок 51 – Калибровочный график копропорфирина III (Ось x – концентрации копропорфирина III, нМ Ось y – отношение площадей хроматографических пиков копропорфирина III и ВС)

3.5.4. Прецизионность и правильность

Оценка прецизионности и правильности методик проводилась аналогично валидации данных параметров в моче. Результаты анализа представлены в таблицах 16 – 25.

Таблица 16 – Показатели прецизионности и правильности мезопорфирина IX

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1001,87	991,87	1033,01	1001,22	988,18	1021,21	1006,23	17,42	1,73	7,11	0,62
500	499,04	532,12	470,57	510,98	468,58	477,77	493,18	25,38	5,15	10,36	-1,38
250	241,83	227,11	261,91	225,85	202,38	261,18	236,71	23,02	9,72	9,39	-5,61
125	124,46	135,38	130,75	145,25	121,22	97,11	125,70	16,37	13,03	6,68	0,55
62,5	65,63	62,71	67,15	69,11	61,69	58,71	64,17	3,83	5,98	1,57	2,60
31,25	35,34	38,17	26,81	25,19	33,19	38,66	32,89	5,72	17,39	2,33	5,00

Таблица 17 – Показатели прецизионности и правильности пентакарбоксихлоропорфирина

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	998,62	1010,11	978,82	969,19	1051,87	970,43	996,51	31,60	3,17	12,90	-0,35
500	502,86	525,27	459,87	521,37	510,56	458,81	496,46	29,82	6,01	12,17	-0,71
250	231,19	234,67	223,19	256,19	241,88	280,11	244,54	20,69	8,46	8,44	-2,23
125	125,1	109,61	135,35	107,26	145,18	99,67	120,36	17,77	14,76	7,25	-3,85
62,5	69,56	66,11	52,12	68,93	59,73	75,21	65,28	8,18	12,54	3,34	4,25
31,25	35,4	28,83	33,76	27,96	31,86	40,91	33,12	4,75	14,35	1,94	5,65

Таблица 18 – Показатели прецизионности и правильности копропорфирина I

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1003,15	1011,66	999,11	965,19	1071,62	977,18	1004,65	37,09	3,69	15,14	0,46
500	498,22	534,57	479,64	525,66	509,03	497,13	507,38	20,17	3,98	8,23	1,45
250	257,35	248,11	239,72	271,15	261,72	242,14	253,37	12,18	4,81	4,97	1,33
125	114,69	142,5	106,63	117,92	103,18	99,92	114,14	15,48	13,56	6,32	-9,51
62,5	59,51	55,2	70,27	58,08	68,51	52,98	60,76	7,08	11,65	2,89	-2,87
31,25	40,08	28,4	38,18	35,11	32,82	43,86	36,41	5,49	15,09	2,24	14,17

Таблица 19 – Показатели прецизионности и правильности протопорфирина IX

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	992,81	1043,29	981,29	990,11	977,36	1017,66	1000,42	25,29	2,53	10,32	0,04
500	510,83	489,19	529,17	478,73	519,12	502,11	504,86	18,79	3,72	7,67	0,96
250	242,25	260,92	233,19	264,71	259,19	235,67	249,32	13,89	5,57	5,67	-0,27
125	114,46	129,45	121,15	129,01	112,54	125,17	121,96	7,24	5,93	2,95	-2,49
62,5	67,81	66,84	58,75	58,88	75,01	64,73	65,34	6,12	9,37	2,50	4,34
31,25	33,78	42,43	33,18	25,66	35,12	30,48	33,44	5,53	16,55	2,26	6,55

Таблица 20 – Показатели прецизионности и правильности уропорфирина I

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1039,99	1055,41	1000,43	954,13	993,43	1020,32	1010,62	36,20	3,58	14,78	1,05
500	460,39	500,22	532,17	488,27	526,65	493,21	500,15	26,45	5,29	10,80	0,03
250	239,97	241,32	228,76	232,65	250,14	267,12	243,33	13,81	5,68	5,64	-2,74
125	151,59	129,95	125,41	119,54	110,43	135,11	128,67	14,11	10,96	5,76	2,85
62,5	89,68	67,21	71,37	62,42	70,32	67,72	71,45	9,46	13,23	3,86	12,53
31,25	20,17	35,18	28,62	27,54	34,01	31,49	29,50	5,44	18,46	2,22	-5,93

Таблица 21 – Показатели прецизионности и правильности гексакарбоксихлоропорфирина I

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1031,69	1025,76	1001,98	980,13	979,79	1012,23	1005,26	22,17	2,21	9,05	0,52
500	501,39	522,27	473,13	519,27	483,26	491,67	498,50	19,63	3,94	8,01	-0,30
250	253,25	232,09	271,27	228,11	251,34	240,26	246,05	15,91	6,47	6,50	-1,60
125	115,4	125,57	91,22	111,86	117,12	139,14	116,72	15,85	13,58	6,47	-7,10
62,5	86,1	67,41	66,37	63,02	59,65	77,78	70,06	9,95	14,21	4,06	10,78
31,25	30,25	32,99	20,42	28,81	27,32	22,61	27,07	4,74	17,51	1,93	-15,46

Таблица 22 – Показатели прецизионности и правильности гексакарбоксихлорофана III

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1006,57	1002,27	988,65	1030,92	1055,41	1029,86	1018,95	24,25	2,38	9,90	1,86
500	468,11	509,88	472,12	556,46	493,86	496,56	499,50	32,02	6,41	13,07	-0,10
250	242,9	236,77	280,21	213,08	215,95	251,08	240,00	24,74	10,31	10,10	-4,17
125	116,88	109,24	140,67	132,97	115,55	123,47	123,13	11,78	9,57	4,81	-1,52
62,5	76,97	52,78	68,87	61,24	65,18	52,81	62,98	9,44	14,99	3,85	0,75
31,25	41,17	36,12	28,12	30,25	38,45	27,57	33,61	5,74	17,08	2,34	7,03

Таблица 23 – Показатели прецизионности и правильности гептакарбоксихлорофана

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1022,35	995,91	972,14	1055,39	979,64	920,77	991,03	45,98	4,64	18,77	-0,90
500	470,49	535,04	554,86	488,47	487,69	464,12	500,11	36,55	7,31	14,92	0,02
250	244,95	277,73	266,78	257,58	256,56	274,49	263,02	12,33	4,69	5,03	4,95
125	122,27	108,78	151,54	140,05	145,92	147,35	135,99	16,82	12,37	6,87	8,08
62,5	72,01	70,77	74,74	56,23	55,68	53,94	63,90	9,55	14,95	3,90	2,18
31,25	47,14	38,94	37,01	38,22	43,92	28,98	39,04	6,25	16,02	2,55	19,94

Таблица 24 – Показатели прецизионности и правильности уропорфирина III

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	1034,2	1023,34	1045,13	967,44	1059,79	1015,58	1024,25	31,94	3,12	13,04	2,37
500	466,26	485,24	459,89	514,03	500,81	452,44	479,78	24,38	5,08	9,95	-4,21
250	208,83	254,59	278,69	240,93	215,83	221,98	236,81	26,57	11,22	10,85	-5,57
125	124,75	96,12	143,77	135,56	119,45	114,37	122,34	16,73	13,67	6,83	-2,18
62,5	92,01	71,03	65,19	70,46	78,65	67,27	74,10	9,90	13,36	4,04	15,66
31,25	46,85	32,69	29,12	28,35	32,55	35,93	34,25	6,75	19,72	2,76	8,75

Таблица 25 – Показатели прецизионности и правильности копропорфирина III

Истин. конц, нМ	Полученные концентрации, нМ						Статистические параметры				
	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	Повтор 6	\bar{x}	SD	CV	SE	ε
X											
1000	990,55	927,83	974,95	941,86	1025,98	993,55	975,79	36,07	3,70	14,72	-2,48
500	472,31	559,22	523,43	492,04	443,18	547,84	506,34	45,08	8,90	18,40	1,25
250	240,88	243,19	272,82	218,05	274,67	233,94	247,26	22,33	9,03	9,11	-1,11
125	127,85	102,49	116,61	112,18	107,62	126,17	115,49	10,10	8,74	4,12	-8,24
62,5	65,91	69,29	51,6	73,72	71,01	61,81	65,56	7,99	12,19	3,26	4,66
31,25	34,39	26,04	38,22	39,75	41,68	31,29	35,23	5,86	16,63	2,39	11,29

3.5.5. Предел обнаружения

Наименьшая концентрация порфиринов (предел обнаружения), при которой сигналы порфиринов надежно отделяются от фонового шума, равна 31,25 нМ, как и в случае с методиками определения в моче. На рисунке 52 показана хроматограмма стандарта протопорфирина IX для примера.

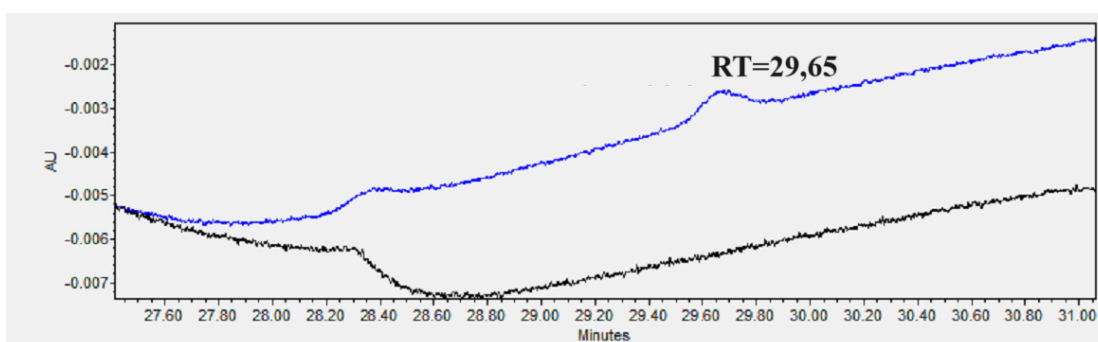


Рисунок 52 — Хроматограмма стандарта протопорфирина IX (синий) в концентрации 31,25 нМ в сравнении с интактной донорской плазмой (чёрный)

3.5.6. Нижний предел количественного определения и аналитическая область методик

НПКО методик определения в плазме крови вышел аналогичным значению в моче и равняется 62,5 нМ. На рисунке 53 показана хроматограмма с интенсивностью сигнала от мезопорфирина IX в сравнении с фоном. Полученные значения НПКО способствуют высокоточному определению порфиринов.

Для плазмы крови была установлена аналитическая область методик в границах от 31,25 нМ до 1000,0 нМ.

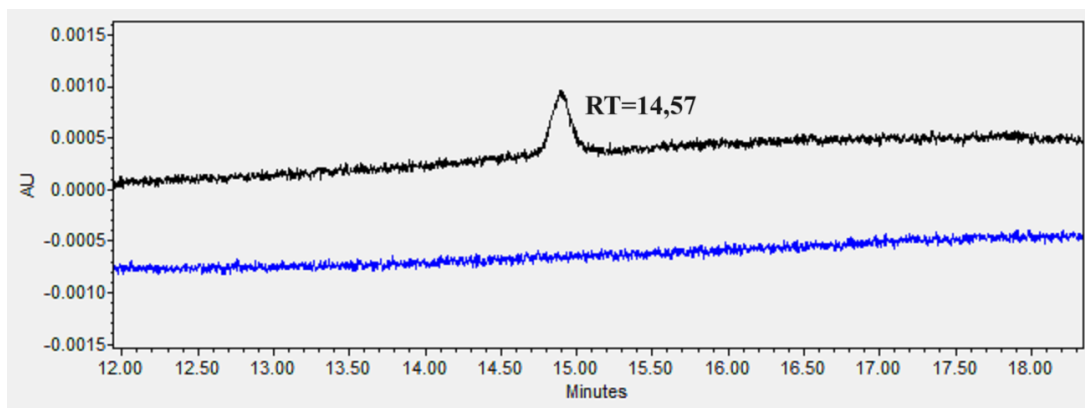


Рисунок 53 – Хроматограмма стандарта гептакарбоксихлорофтина (чёрный) в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской плазмой (синий)

3.5.7. Стабильность

В рамках валидации параметра стабильность стандартных стоковых растворов различных типов порфиринов была подтверждена при хранении растворов при хранении растворов в течение 3 месяцев в холодильнике при температуре +4 С⁰. Приготовленные образцы плазмы крови также показали себя стабильно при кратковременном (сутки при использовании на следующий день) и долгосрочном (месяц при температуре –40 С⁰) испытаниях, также они оставались стабильными после циклов заморозки-разморозки.

3.5.8. Влияние биологической матрицы

Эффективность процесса настоящих методик была рассчитана при сравнении образцов плазмы с подкисленными растворами (с добавлением HCl 2N) порфиринов в концентрациях 50 нМ в нескольких повторах. Результат сравнения интенсивности пиков представлен в таблице 26.

Таблица 26 – Сравнение интенсивности пиков стандартов порфиринов в образцах плазмы крови и подкисленных (НСІ 2Н) водных образцах

№	Образец плазмы	Водные образцы сравнения с добавлением НСІ 2Н	Фактор эффективности
Уропорфирин I			
$\bar{x} \pm SD$	1352 ± 74,96	923 ± 59,16	1,47 ± 0,05
CV, %	5,54	6,41	3,15
Уропорфирин III			
$\bar{x} \pm SD$	2242 ± 332,88	1319 ± 190,51	1,70 ± 0,02
CV, %	14,85	14,44	1,46
Гептакарбоксипорфирин			
$\bar{x} \pm SD$	5584 ± 829,86	2869 ± 329,10	1,94 ± 0,07
CV, %	14,86	11,47	3,56
Гексакарбоксипорфирин I			
$\bar{x} \pm SD$	2040 ± 288,16	1289 ± 151,99	1,58 ± 0,04
CV, %	14,12	11,79	2,58
Гексакарбоксипорфирин III			
$\bar{x} \pm SD$	2413 ± 111,29	1913 ± 115,52	1,26 ± 0,06
CV, %	4,61	6,04	4,50
Пентакарбоксипорфирин			
$\bar{x} \pm SD$	10446 ± 1356,54	8832 ± 1001,66	1,18 ± 0,06
CV, %	12,99	11,34	5,39
Копропорфирин I			
$\bar{x} \pm SD$	2023 ± 216,71	1729 ± 145,34	1,17 ± 0,04
CV, %	10,71	8,41	3,29
Копропорфирин III			
$\bar{x} \pm SD$	14146 ± 1148,56	11233 ± 1199,34	1,26 ± 0,03
CV, %	8,12	10,68	2,73

Продолжение Таблицы 26

Мезопорфирин IX			
$\bar{x} \pm SD$	6467 ± 912,80	3932 ± 477,48	1,64 ± 0,03
CV, %	14,11	12,14	2,05
Протопорфирин IX			
$\bar{x} \pm SD$	19985 ± 1957,52	12676 ± 1738,30	1,58 ± 0,06
CV, %	9,79	13,71	4,00
Внутренний стандарт			
$\bar{x} \pm SD$	1160 ± 85,49	714 ± 58,05	1,63 ± 0,13
CV, %	7,37	8,13	7,81

Диапазон значений фактора эффективности для плазмы крови установился на уровне от 1,17 до 1,94 у различных порфиринов, что указывает на такое же влияние матрицы (плазмы крови), как и в случае с мочой, в сторону увеличения интенсивности пиков каждого из стандартов порфиринов. Значение FE для внутреннего стандарта изменяется в диапазоне значений $1,63 \pm 0,13$ в зависимости от серии. Как видно из таблицы 27, соотношение интенсивностей порфиринов и ВС в плазме крови и соотношение между интенсивностями ВС и каждым отдельным порфиринов в водном растворе практически равны. Нормализованный фактор эффективности стремится к значению «1», как и в случае проведения анализа в моче. При помощи ВС удаётся снизить влияние эндогенных компонентов биоматрицы на определение порфиринов.

Таблица 27 – Значения нормализованного по ВС фактора эффективности для различных порфиринов, определяемых в плазме крови

Порфирины	$\bar{x} \pm SD$	CV, %
Уропорфирин I	0,90 ± 0,05	5,54
Уропорфирин III	1,05 ± 0,10	9,07
Гептакарбоксипорфирин	1,20 ± 0,11	8,91

Продолжение Таблицы 27

Гексакарбоксихлоропорфирин I	$1,25 \pm 0,04$	3,57
Гексакарбоксихлоропорфирин III	$0,78 \pm 0,09$	12,13
Пентакарбоксихлоропорфирин	$0,73 \pm 0,09$	12,80
Копропорфирин I	$0,72 \pm 0,06$	7,70
Копропорфирин III	$0,78 \pm 0,05$	6,29
Мезопорфирин	$1,01 \pm 0,06$	5,68
Протопорфирин IX	$0,97 \pm 0,08$	8,31

CV < 15% показывает, что нормализованный по ВС фактор эффективности стабилен и различия в его значениях между пробами приемлемы.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Разработаны методики количественного и качественного определения порфиринов в моче и плазме крови человека с применением ВЭЖХ-УФ, которые возможно использовать для проведения фармакокинетических исследований соединений, применяемых при фотосенсибилизирующей терапии. Преимущество методик заключается в возможности определения экзогенных порфиринов в присутствии эндогенных соединений. При проведении исследования хроматографическими условиями были:

- Подвижная фаза состояла из 2-х фаз: 1М раствор аммония ацетата в воде, доведённый до pH 5,16 при помощи уксусной кислоты и 100% метанол.
- Колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250*4.6 мм, зернением 5 мкм и с предколонкой-фильтром Waters 0,2 мкм была выбрана в качестве неподвижной фазы из-за её способности разделять изомеры близких по структуре соединений (в нашем случае – порфиринов). Пробоподготовку для мочи проводили модифицированным методом Dilute-and-Shoot; для плазмы крови применяли осаждение белковой фракции ацетонитрилом.

2. Была проведена валидация методик определения основных биомаркёров порфирий (уропорфирины I и III, гепта-, гекса- и пента-карбоксихлорина, копропорфирины I и III, мезопорфирин IX и протопорфирин XI) в моче и крови добровольцев по критериям, установленным в соответствии с руководствами по валидации биоаналитических методик отечественных и зарубежных изданий.

- параметры селективности, правильности и прецизионности признаны удовлетворительными;

- особенностью валидированных методик является высокая разрешающая способность, а именно разделение и дальнейшее выделение сигналов отдельно взятых изомеров различных типов порфиринов, таких как уропорфирины I и III и копропорфирины I и III, также способность определения таких метаболитов порфиринового обмена, как гепта-, гекса- и пентакарбоксихлорина;

- влиянии матрицы на анализ: диапазон для мочи – от 1,09 до 2,02; диапазон для плазмы крови – от 1,17 до 1,94;

- разработанные методики определения порфиринов в биологических жидкостях имеют предел обнаружения в 31,25 нМ, а значение НПКО равняется 62,5 нМ. Линейность методик находится в диапазоне от 0 нМ до 1000 нМ, что делает данный способ определения существенным и надежным при скрининге различных типов порфиринов у пациентов.

ГЛАВА 4. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРФИРИНОВ

Разработанные и валидированные методики по количественному и качественному определениям биомаркёров порфирий успешно внедрены в работу ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ [14]. Была проведена серия исследований у добровольцев с целью установления норм по содержанию порфиринов в моче или плазме здорового человека.

4.1. Нормы содержания порфиринов в моче

4.1.1. Дизайн исследования мочи с целью установления норм содержания порфиринов

Исследование мочи проводили у 10 добровольцев НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Все добровольцы – мужчины и женщины в возрасте от 20 до 40 лет. Процедура сбора мочи у добровольцев и пробоподготовка описаны в Главах 2 и 3 соответственно.

4.1.2. Результаты определения порфиринов в моче

После анализа изученных данных [10, 20] и 10 проб, полученных от потенциально здоровых добровольцев, были выведены нормы по содержанию порфиринов в моче. Выборочная хроматограмма пробы представлена на рисунке 54. В таблице 28 отражены полученные референсные значения в моче.

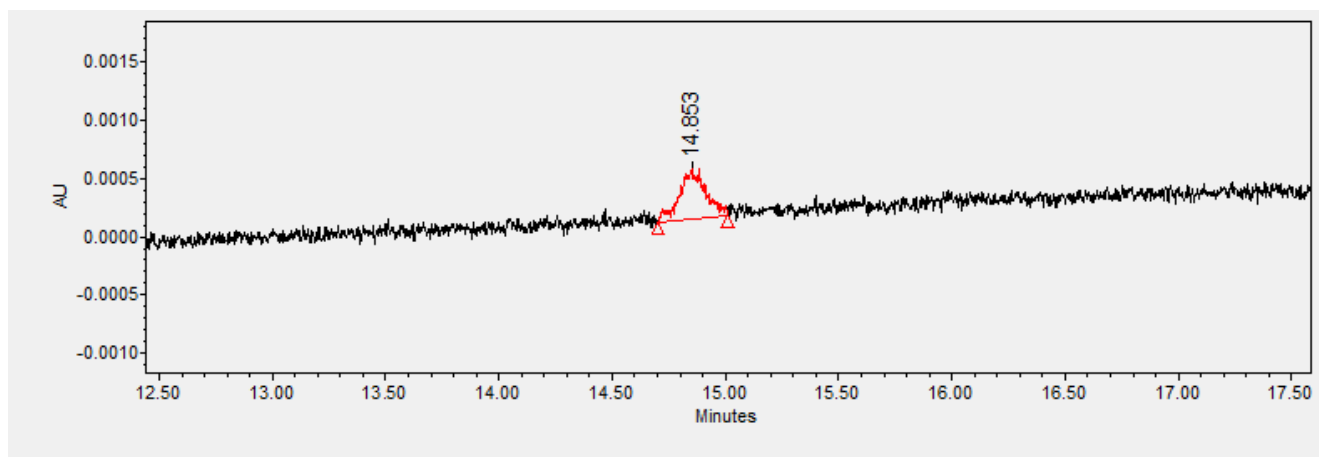


Рисунок 54 – Хроматограмма здорового добровольца с содержанием гептакарбоксихлорофирина I ниже предела обнаружения

Таблица 28 – Нормы содержания порфиринов в моче

Тип порфирина	Нормы разработанных методик для мочи, нМ	Нормы по содержанию порфиринов в моче, нМ [20]	Нормы по содержанию порфиринов в моче по Кишкуну А.А., нМ [10]
Уропорфирин I	0 – 70,5	< 35	12 – 37
Уропорфирин III	0 – 31,25	Нет данных	
Гептакарбоксихлорофин	0 – 33	< 8	Нет данных
Гексакарбоксихлорофин	0 – 31,25	< 3	Нет данных
Пентакарбоксихлорофин	0 ~ следовые концентрации	< 6	Нет данных
Копропорфирин I	0 – 31,25	< 30	75 – 240
Копропорфирин III	0 – 31,25	< 90	
Мезопорфирин IX	0 ~ следовые концентрации	Нет данных	Нет данных
Протопорфирин IX	0 ~ следовые концентрации	Нет данных	Нет данных

Результатом определения референсных значений порфиринов является то, что разработанная методика – качественная при обнаружении превышения

показателей в сравнении с установленным пределом обнаружения. Поводом для более пристального исследования будет служить любой сигнал пентакарбоксихлорофана, мезопорфирина IX и протопорфирина IX, отличающийся от шумов.

4.2. Нормы содержания порфиринов в плазме крови

4.2.1. Дизайн исследования плазмы с целью установления норм содержания порфиринов

Анализ плазмы крови проводили у 52 добровольцев Центра клинического изучения лекарственных средств Сеченовского университета, согласно постановлению [17].

Все добровольцы – мужчины и женщины в возрасте от 20 до 40 лет. Процедура забора крови у добровольцев и пробоподготовка описаны в Главах 2 и 3 соответственно.

4.2.2. Результаты определения порфиринов в плазме крови

Проведён анализ 52 потенциально здоровых добровольцев с целью выведения референсных значений по нормам содержание порфиринов при применении разработанной методики. 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. На рисунке 55 показан результат сравнения 10 добровольцев мужского пола на хроматограмме, стрелками обозначены места и время выхода порфиринов.

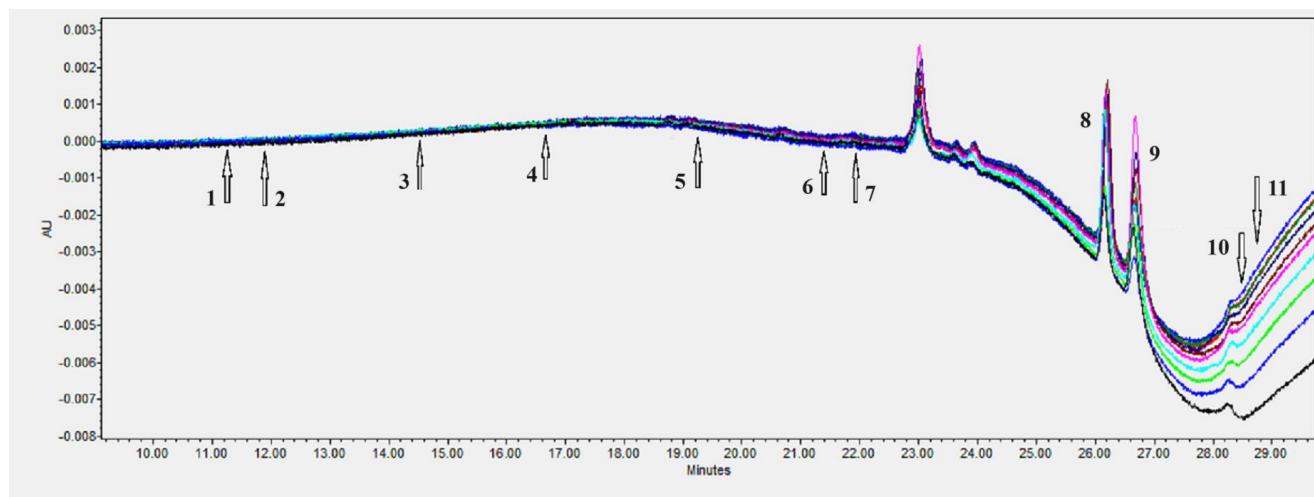


Рисунок 55 – Хроматограмма десяти добровольцев мужского пола с указанием предполагаемых мест выхода различных порфиринов

Примечания: 1 – уропорфин I; 2 – уропорфин III; 3 – гептакарбоксихпорфин; 4 – гексакарбоксихпорфин; 5 – пентакарбоксихпорфин; 6 – копропорфин I; 7 – копропорфин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфин IX); 9 – гем; 10 – мезопорфин IX; 11 – протопорфин IX

На рисунке 56 представлена аналогичная хроматограмма для добровольцев женского пола с результатами и предполагаемыми местами выхода порфиринов на графике.

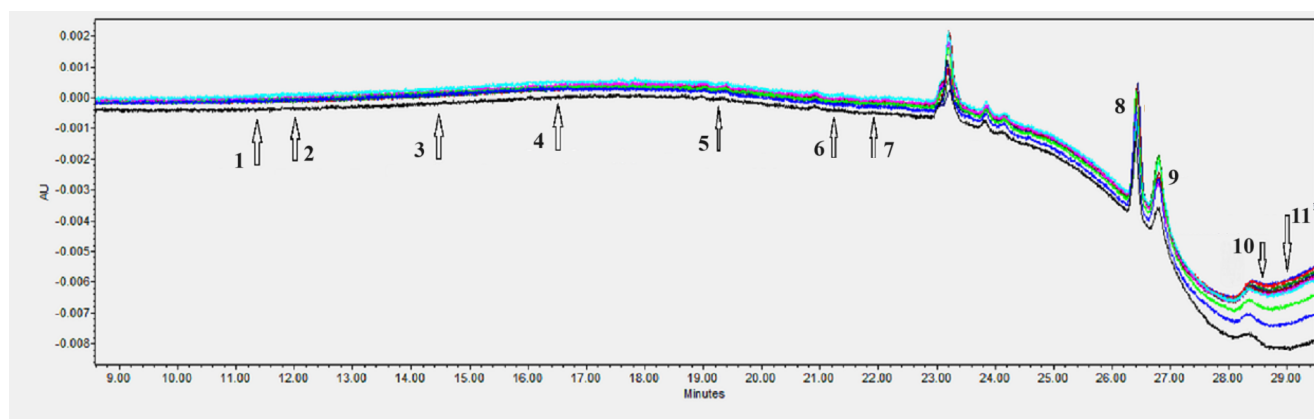


Рисунок 56 – Хроматограмма десяти добровольцев женского пола с указанием предполагаемых мест выхода различных порфиринов

Примечания: 1 – уропорфин I; 2 – уропорфин III; 3 – гептакарбоксихпорфин; 4 – гексакарбоксихпорфин; 5 – пентакарбоксихпорфин; 6 – копропорфин I; 7 – копропорфин III; 8 – внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфин IX); 9 – гем; 10 – мезопорфин IX; 11 – протопорфин IX

Дополнительное разделение и исследование групп по половому признаку в представленной выборке не показало явных различий, которые могли бы повлиять на диагностику порфиринов.

После анализа изученных данных по нормам содержания порфиринов в плазме крови [10, 15] и 52 проб, полученных от потенциально здоровых добровольцев, были выведены референсные значения по разработанной методике, отраженные в таблице 29. На рисунке 57 для примера представлена хроматограмма добровольца на основании которых выводилось референсное содержание маркёров порфирий.

Таблица 29 – Нормы содержания порфиринов в плазме крови

Тип порфирина	Нормы разработанных методик для плазмы крови, нМ	Нормы по содержанию порфиринов в плазме, нМ [22]	Нормы по содержанию порфиринов в плазме по Кишкуну А.А., нМ [10]
Уропорфирин I	Сумма концентраций изомеров 0 – 31,25	Сумма концентраций изомеров < 2,4	Нет данных
Уропорфирин III			
Гептакарбоксипорфирин	0 ~ следовые концентрации	Нет данных	Нет данных
Гексакарбоксипорфирин I	Сумма концентраций изомеров = 0 ~ следовые концентрации	Нет данных	Нет данных
Гексакарбоксипорфирин III			Нет данных
Пентакарбоксипорфирин	0 – 31,25	Нет данных	Нет данных
Копропорфирин I	0 – 40	Сумма концентраций изомеров < 30	Сумма концентраций изомеров 0,75 – 3,0
Копропорфирин III	0 – 31,25		
Мезопорфирин IX	0 ~ следовые концентрации	Нет данных	Нет данных
Протопорфирин IX	0 – 280	< 280 – 1070	7,2 – 93,6

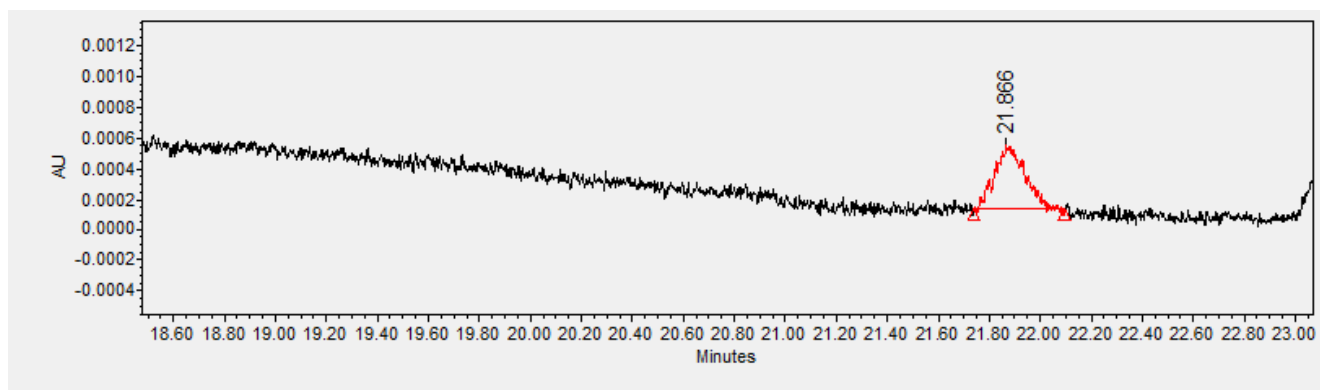


Рисунок 57 – Хроматограмма здорового добровольца с содержанием копропорфирина I в концентрации 39,7 нМ

После анализа собранных данных по нормам биомаркёров порфирий и разработки референсных значений в лаборатории прикладной и фундаментальной фармакологии получается, что разработанная методика может служить качественным подтверждением наличия патологии для всех типов порфиринов. Любой сигнал от гептакарбоксипорфирина, изомеров гексакарбоксипорфирина и мезопорфирина IX, отличающийся от шумов, служит сигналом для проведения дополнительных исследований.

4.3. Клиническая и диагностическая ценность методик

4.3.1. Подозрения на наличие порфирии у пациентов

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 аналитов. При обнаружении у пациента схожей с порфириями клинической картины также рекомендуется проводить данный анализ. При применении разработанных методик были обнаружены случаи с показателями, указывающими на наличие дефекта метаболизма на пути биосинтеза гема у различных пациентов в исследуемых

биологических материалах. Хроматограмма одного из случаев представлена на рисунке 58 с указанными временами удержания (RT, мин).

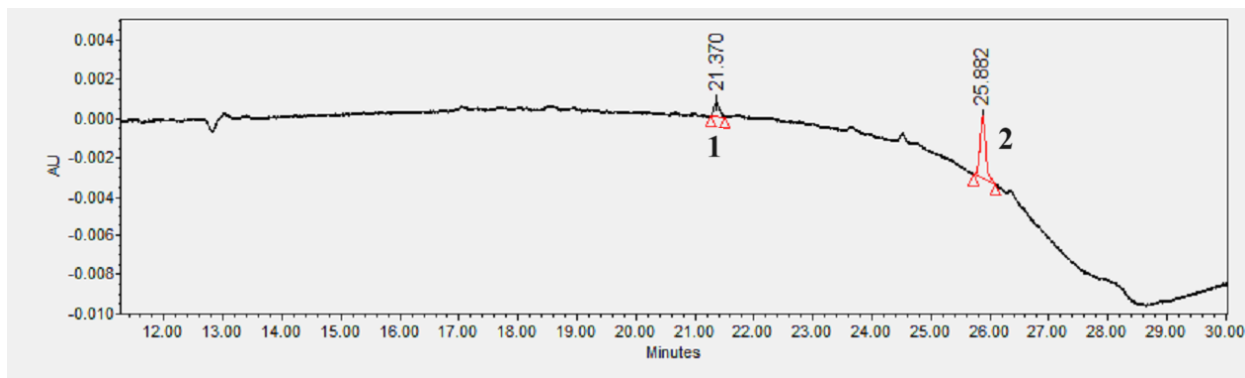


Рисунок 58 – Хроматограмма мочи пациента X мужского пола с выявленным превышением копропорфирина I (1) в сравнении с ВС (2)

На рассмотренной хроматограмме у пациента концентрация копропорфирина I превышает предел обнаружения (примерно 33,62 нМ).

После сбора анамнеза, в случае подозрения на группу порфирий, в лабораторию присылают биологические материалы пациентов, которые проверяются при помощи разработанных методик. На основании полученных результатов в клинике проставляется окончательный диагноз. Верное определение типа порфирина ускоряет начало терапии и предвосхищает переход патологии в более тяжёлые формы. 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 анализы, присланные в лабораторию для уточнения вида порфиринов. Хроматограммы пациента L отражены на рисунках 59 и 60; пациента М – на рисунках 61, 62; пациент N и Т – на рисунках 63, 64 и 65, 66 соответственно. Все хроматограммы представлены с указанными временами удержания (RT, мин).

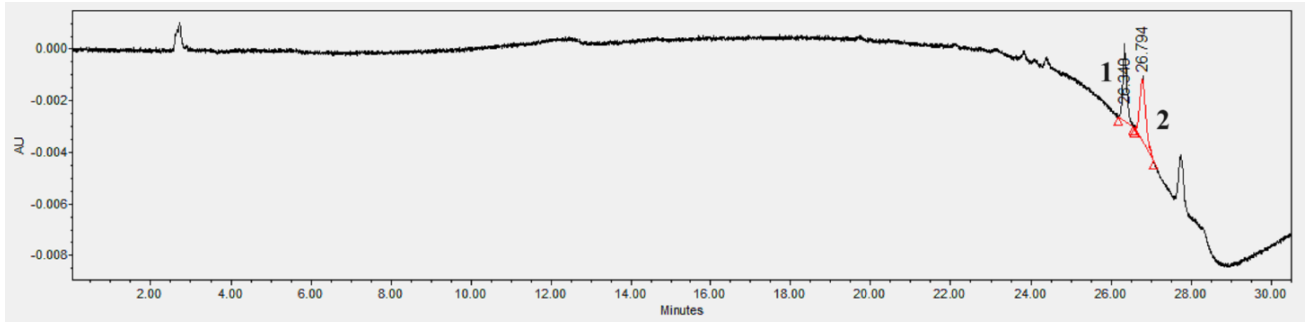


Рисунок 59 – Хроматограмма плазмы крови пациента мужского пола L с отсутствием каких-либо определяемых нарушений

Примечания: 1 – ВС; 2 – гем

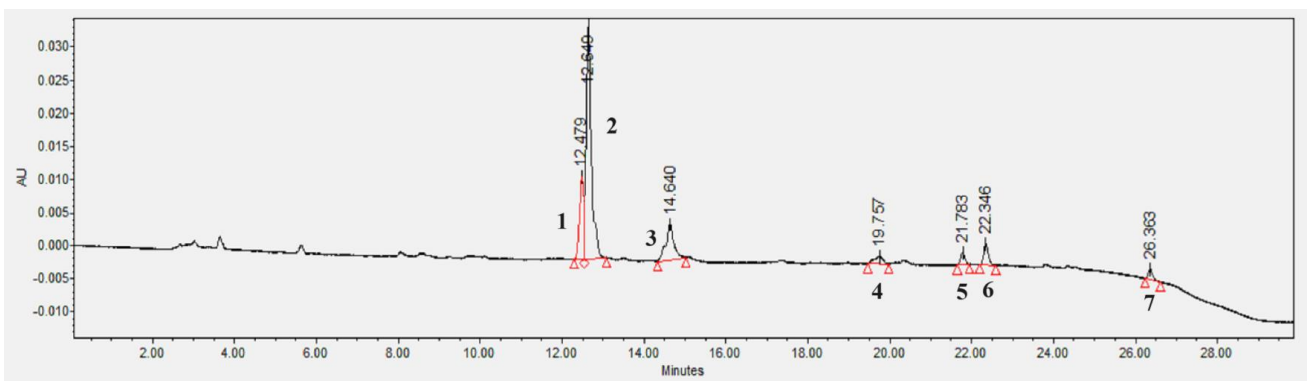


Рисунок 60 – Хроматограмма мочи пациента мужского пола L с повышенным содержанием суммы сигналов изомеров уропорфина I (1) и уропорфина III (2), гептакрбоксипорфина (3), пентакарбоксипорфина (4), копропорфина I (5) и копропорфина III (6) в сравнении с ВС (7)

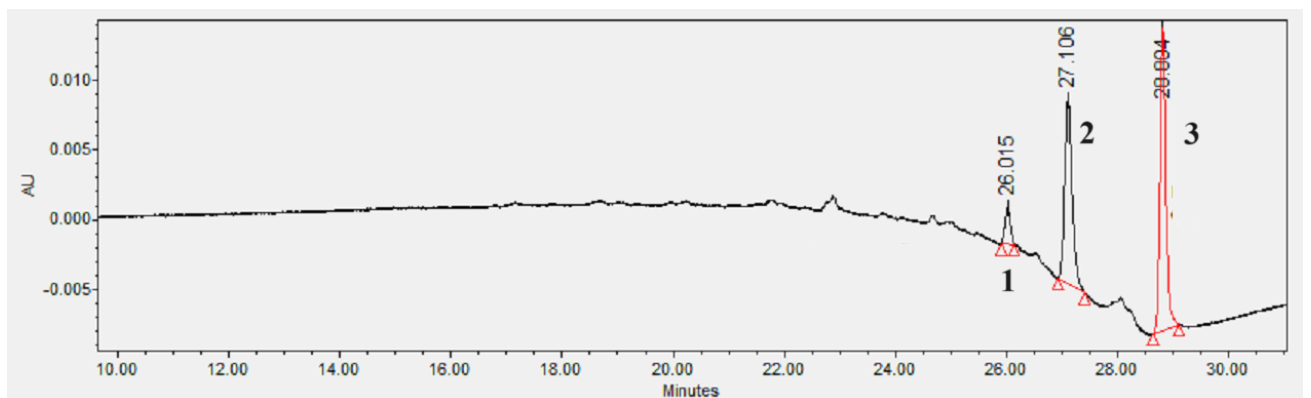


Рисунок 61 – Хроматограмма крови пациента мужского пола M с повышенным содержанием протопорфина IX (3)

Примечания: 1 – ВС; 2 – гем

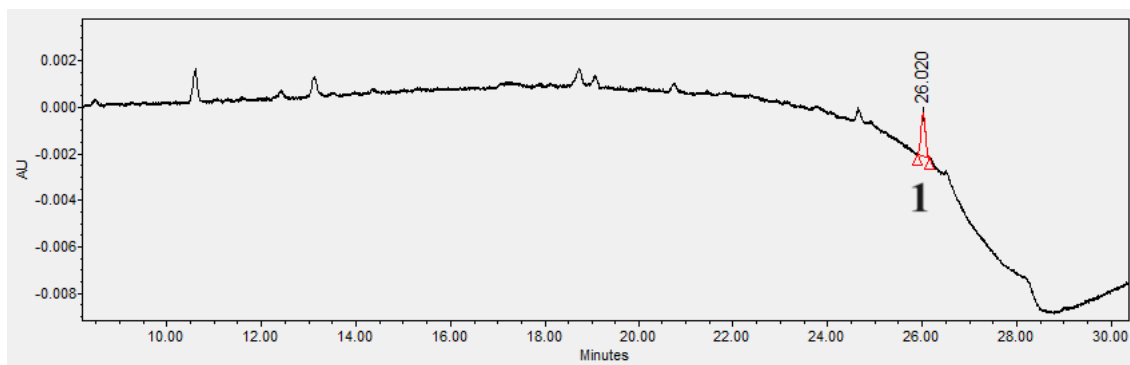


Рисунок 62 – Хроматограмма мочи пациента мужского пола М с отсутствием каких-либо определяемых нарушений

Примечания: 1 – ВС

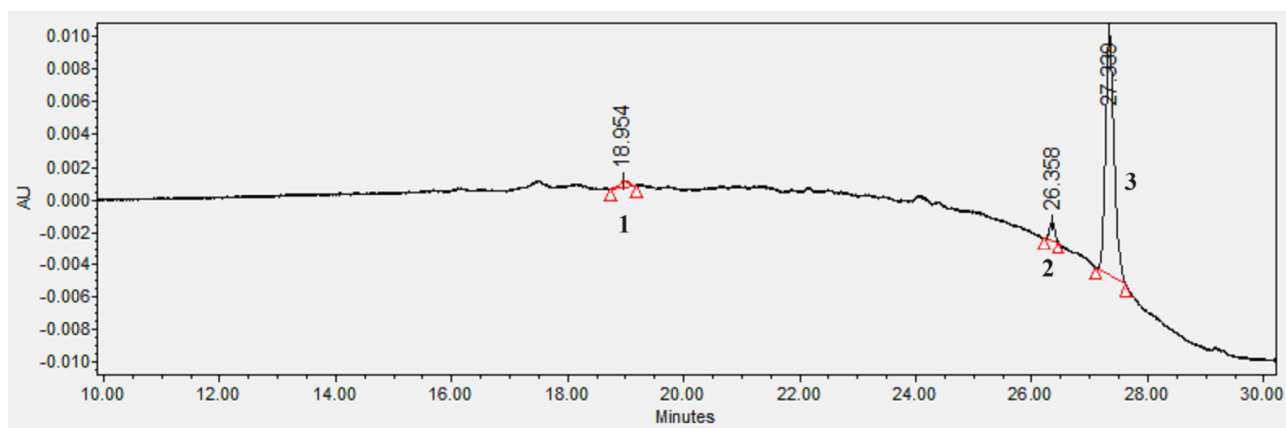


Рисунок 63 – Хроматограмма крови пациента мужского пола N с повышенным содержанием пентакарбоксихлорофана (1)

Примечания: 2 – ВС; 3 – гем

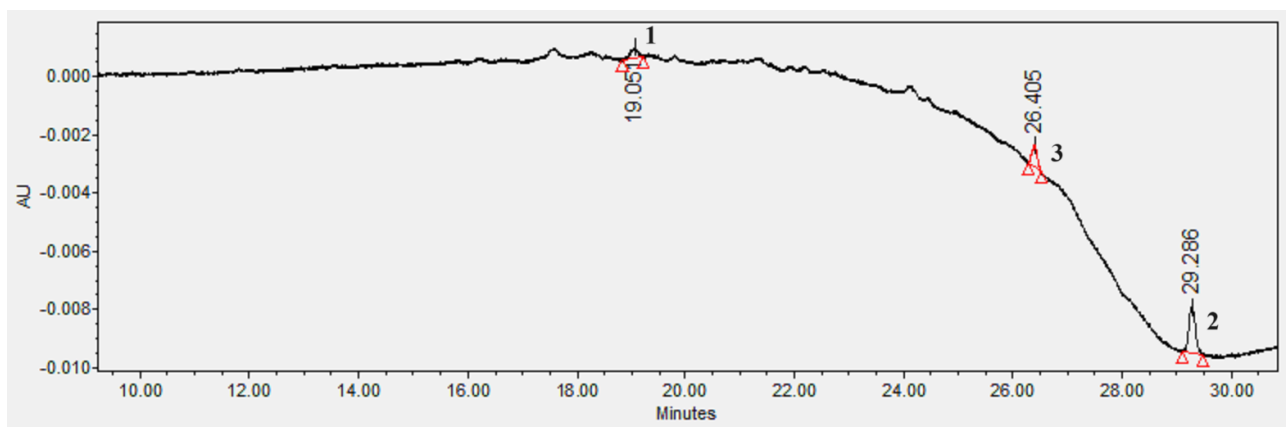


Рисунок 64 – Хроматограмма мочи пациента мужского пола N с повышенным содержанием пентакарбоксихлорофана (1) и протопорфина XI (2) в сравнении с ВС (3)

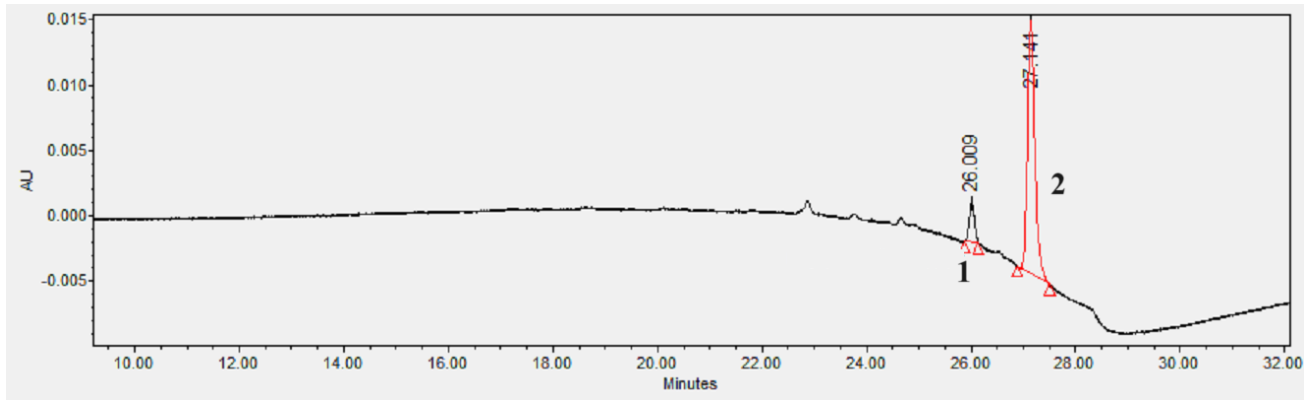


Рисунок 65 – Хроматограмма крови пациента мужского пола Т с отсутствием каких-либо определяемых нарушений

Примечания: 1 – ВС; 2 – гем

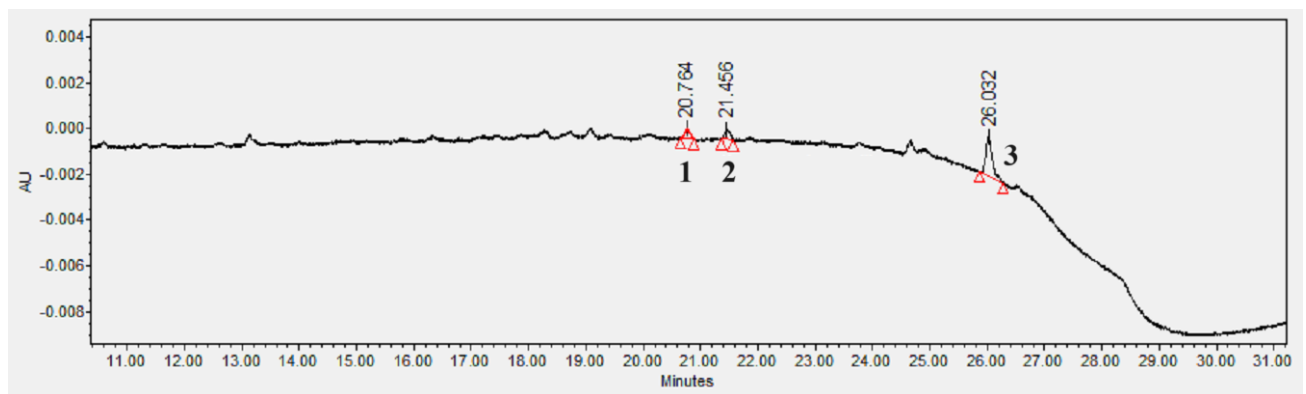


Рисунок 66 – Хроматограмма мочи пациента мужского пола Т с повышенным содержанием изомеров копропорфирина I (1) и III (2) в сравнении с ВС (3)

Во избежание возникновения постановки ложноотрицательного диагноза необходимо провести анализ обоих биоматериалов у пациента (мочи и крови). Как видно на хроматограммах пациентов L, M, N и T картина выхода порфиринов отличается при исследовании различных биоматериалов:

1. У пациента L в моче обнаруживаются уропорфин I (концентрация 1308 нМ), уропорфин III (концентрация 1054 нМ), гептакарбоксипорфин (концентрация 362 нМ), пентакарбоксипорфин (концентрация 32 нМ), копропорфин I (концентрация 120 нМ) и копропорфин III (концентрация 88,7 нМ), в то время как в плазме крови их значения вписываются в норму – исследование только плазмы крови дал бы ложноотрицательный результат;

2. У пациента М в плазме крови обнаруживается протопорфирин IX (концентрация 703 нМ), в моче он отсутствует – анализ одной мочи мог дать ложноотрицательный результат;

3. При исследовании пациента N в обоих биоматериалах был обнаружен пентакарбоксихлорофтин (концентрация в моче 31,8 нМ, в крови – 97 нМ), а в моче также был выявлен протопорфирин IX (концентрация 128 нМ) – неполный спектр данных от только одного вида биоматериалов;

4. В моче пациента Т были обнаружены изомеры копропорфина в концентрациях выше предела обнаружения (примерные концентрации: I – 32,8 нМ и III – 35,7 нМ), в то время как в плазме крови они отсутствовали – ложноотрицательный результат на основании анализа только плазмы крови пациента.

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.

4.3.2. 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 ≈ 400 нм [112]. Что также справедливо для исследований фармакокинетики этих препаратов и проведении ТЛМ.

Определение уровня протопорфина IX, как активного метаболита фотосенсибилизирующего препарата Аласенс® (МНН аминолевулиновая кислота), в плазме крови способствует оценке эффективности терапии различных онкологий с помощью аминолевулиновой 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 рисунках 67 и 68.

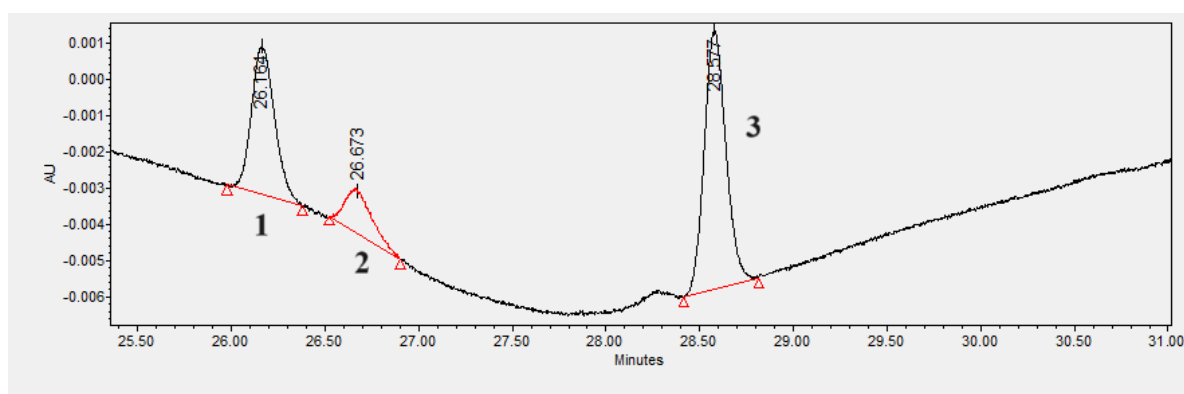


Рисунок 67 – Хроматограмма плазмы крови здорового добровольца с содержанием мезопорфирина IX (3) в сравнении с ВС (1)

Примечания: 2 – гем

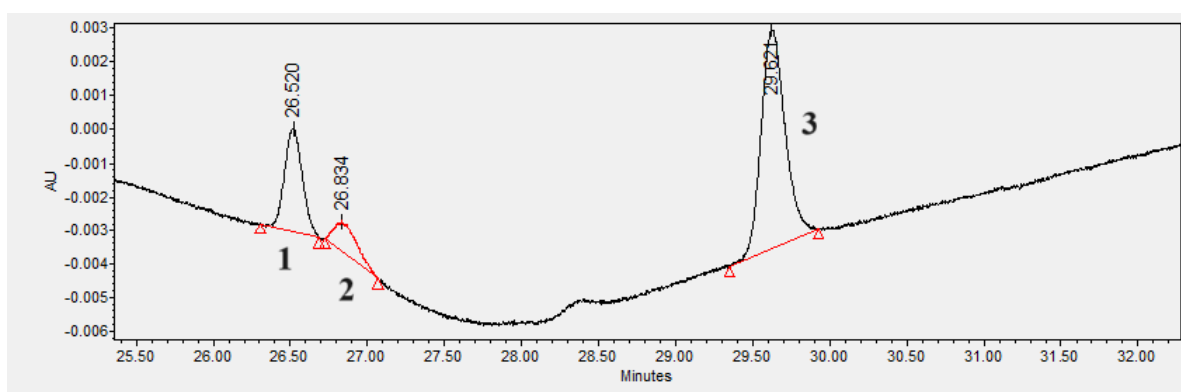


Рисунок 68 – Хроматограмма плазмы крови здорового добровольца с содержанием протопорфирина IX (3) в сравнении с ВС (1)

Примечания: 2 – гем

Даже в случае совместного присутствия мезопорфирина IX и протопорфирина IX методика обладает надлежащей разделяющей способностью, что подтверждается рисунком 69.

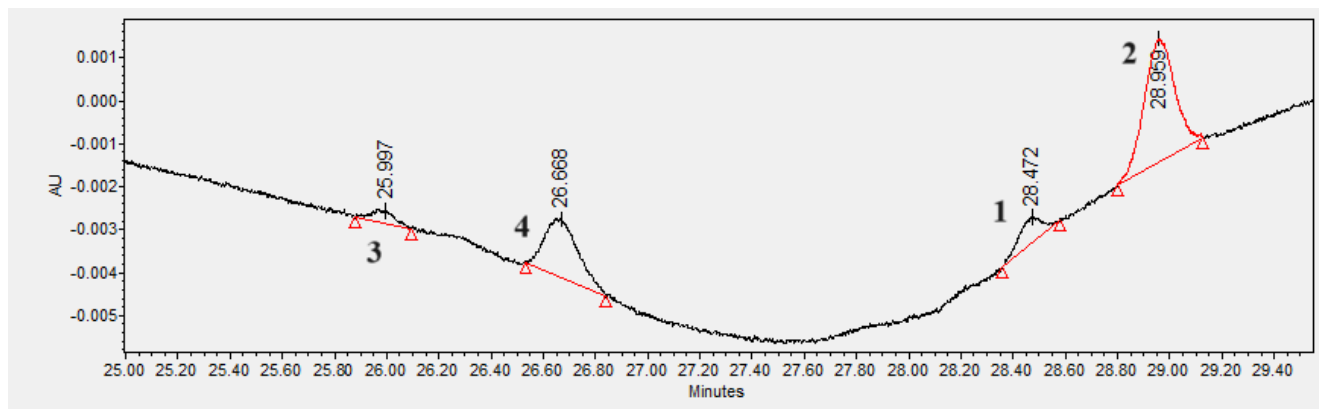


Рисунок 69 – Хроматограмма плазмы крови здорового добровольца с содержанием мезопорфирина IX (1) и протопорфирина XI (2) в сравнении с ВС (3)

Примечания: 4 – гем

4.3.3. Описание параметров специфичности и чувствительности

Для оценки диагностической ценности была построена таблица сопряженности со следующими параметрами:

- Фактор риска – наличие порфиринов (биомаркёров заболевания), обнаруженных методикой
- Исход – подтверждение диагноза порфирии специалистом

Данные, используемые при расчете, представлены на рисунке 70.

	Исход есть	Исхода нет	ВСЕГО
Фактор риска есть	12	14	26
Фактор риска отсутствует	0	52	52
ВСЕГО	12	66	78

Рисунок 70 – Данные, используемые при расчёте точного критерия Фишера и критерия хи-квадрат Пирсона

По полученным после исследования данным были рассчитаны значения точного критерия Фишера ($0,00000... < 0,05$) и критерия хи-квадрат Пирсона ($28,364 > 0,001$) [81], которые показывают наличие сильной взаимосвязи (по нормированному значению коэффициента Пирсона = 0,73) между наличием порфиринов и вероятностью порфирии.

Диагностическая специфичность равна 79%, а чувствительность – 100% при 95% доверительном интервале (CI). Такой высокий процент доказывает, что применение данных методик позволяет предупреждать обострения и оценивать риски возникновения латентных порфирий в рамках персонализированной медицины, в частности перед назначением лекарственных препаратов на основе порфиринов.

4.3.4. Применение методик в рамках персонализированной медицины

На рисунке 71 описан алгоритм использования разработанных методик в рамках персонализированной медицины. В нём описаны этапы, связывающие проведение анализа вместе с обработкой полученного материала и выдачей рекомендаций по фармакотерапии клиническим специалистам. Рекомендации призваны помочь избегать порфириновые острые атаки и снижать риск возникновения клинических проявлений, понижающих качество жизни.

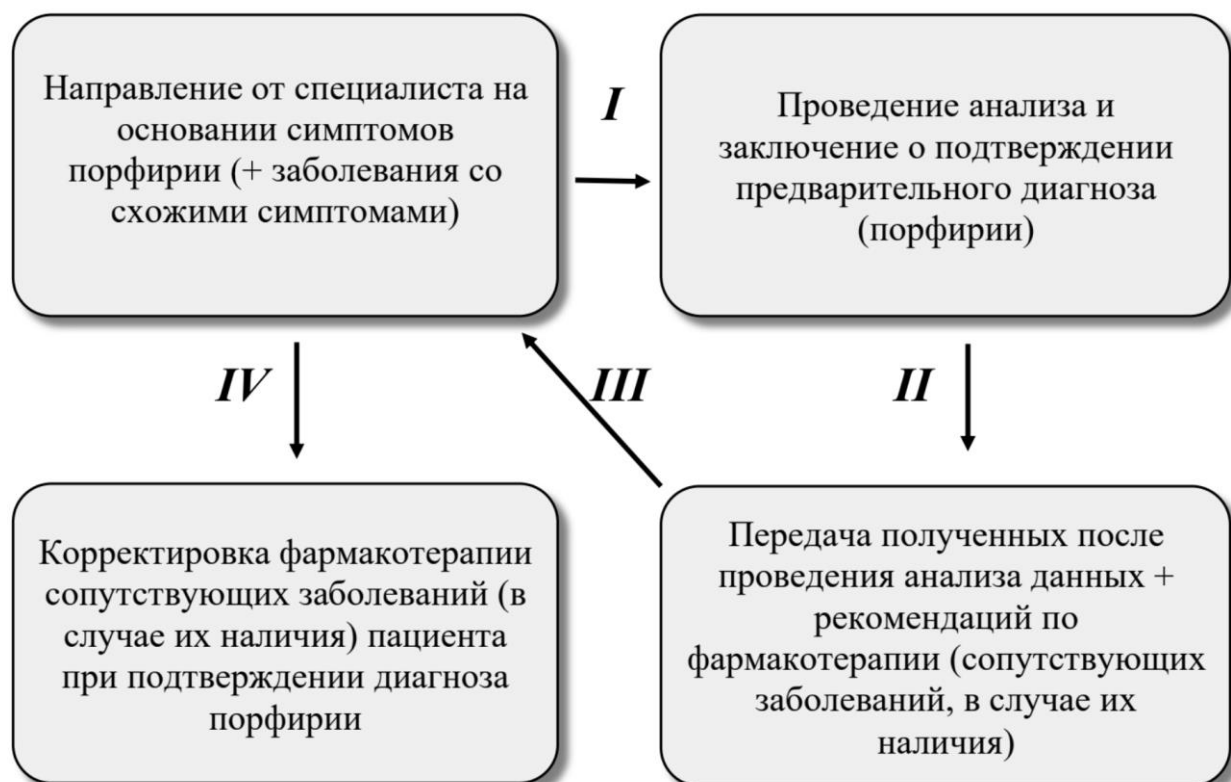


Рисунок 71 – Алгоритм применения методик в рамках персонализированной медицины

Рекомендации включали в себя ограничения по применению следующих групп лекарственных средств:

- Сульфаниламиды;
- Препараты сульфонилмочевины, обладающие сахароснижающим действием;
- Барбитураты;
- Противогрибковые препараты при системном лечении;
- Некоторые антибиотики, активные в отношении *M.tuberculosis* (рифампицин, рифабутин, изониазид и др.);
- Производные спорыньи;
- Антитривиральные препараты;
- Прогестагены;
- Противосудорожные препараты;
- НПВП;

- Антидепрессанты;
- Нейролептики [34];
- Группа фотосенсибилизирующих лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Созданные методики позволяют определять порфирины, что помогает в дифференцировании различных типов порфирий и подтверждает свою диагностическую ценность, а также предполагает использование разработанных методик в рамках изучения фармакокинетики и проведения ТЛМ лекарственных средств на основе порфиринов.

2. При анализе проб с помощью разработанных методик, собранных от здоровых добровольцев, а также после анализа литературных источников были выведены нормы по содержанию порфиринов в моче и плазме крови.

3. Была выявлена необходимость параллельного применения методик при исследовании мочи и плазмы крови пациентов для получения более полной картины заболевания.

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 (ϵ) 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 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВС – Внутренний стандарт

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – Газожидкостная хроматография

ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания

ГХБ – Гексахлорбензол

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖХ – Жидкостная хроматография

ИК-спектрометрия – Инфракрасная спектрометрия

мкл – Микролитр

мкм – Микрометр

мРНК – Матричная рибонуклеиновая кислота

нМ – Наномолярный

нм – Нанометр

НПВП – Нестероидные противовоспалительные препараты

ОФС – Общая фармакопейная статья

ПП – Площадь пика

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

ТЛМ – Терапевтический лекарственный мониторинг

ТСХ – Тонкослойная хроматография

УФ-детектирование – Ультрафиолетовое детектирование

ADP – Порфирия, обусловленная дефицитом ALA-дегидратазы

APR – Острая перемежающаяся (печёночная) порфирия

ALA – δ -Аминолевулиновая кислота

ALAD – ALA-дегидратаза

ALAS – Синтаза аминولةвулиновой кислоты

ALAS2 – Синтаза аминولةвулиновой кислоты-2

AU – Единицы оптической плотности

СЕР – Врожденная эритропоэтическая порфирия
CI – Доверительный интервал
COPROgen – Копропорфириноген III
CPOX – COPROgen-оксидаза
CPGI – Копропорфириноген I
CPGIII – Копропорфириноген III
CRIM – Перекрестно-реактивный иммунологический материал
CV – Коэффициент вариации
СУР Р450 – Цитохром Р450
DnS – Разбавление и прямой ввод пробы
ЕМА – Европейское агентство лекарственных средств
ЕРР – Эритропоэтическая протопорфирия
FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
FE – Фактор эффективности
FECH – Феррохелатаза
НСР – Наследственная копропорфирия
НЕР – Гепатоэритропоэтическая порфирия
HCL – Соляная кислота
НМВ – Гидроксиметилбилан
НМBS – Гидроксиметилбилан-синтаза
ICH – Международная конференция по гармонизации
IS – Внутренний стандарт
NGS – Секвенирование следующего поколения
PBG – Порфобилиноген
PCT – Порфирия кожная медленная
ppm – Доли на миллион
PPOX – PROTOgen-оксидаза
PROTOgen – Протопорфириноген

R^2 – Коэффициент детерминации

RT – Время удерживания

SSS – Стандартные стоковые растворы

UPGI – Уропорфириноген I

UPGIII – Уропорфириноген III

UROD – UROgen-декарбоксилаза

UROgen – Уропорфириноген III

UROS – UROgen III-синтаза

USP – Фармакопея США

VP – Вариетатная порфирия

XLDPP – X-сцепленная доминантная протопорфирия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – Москва: Медицина, 1998. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1. – Текст: непосредственный.

2. Бёккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. / Ю. Бёккер ; – Москва: Техносфера, 2009. – 472 с. – ISBN 978-5-94836-212-0. – Текст: непосредственный.

3. Витковская, И.П. Законодательные основы организации оказания медицинской помощи пациентам с орфанными заболеваниями в Москве // – Москва: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2017. URL: <https://en.ppt-online.org/1302054> (дата обращения: 21.12.2020).

4. Внутренние болезни: учебник: в 2 т. / под редакцией: Н.А. Мухина, В.С. Моисеева, А.С. Галявич. – 2-е изд., испр. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 600 с. – ISBN 5-9231-0461-X. – Текст: непосредственный.

5. Диагностика и лечение острых порфирий / Я.С. Пустовойт, С.К. Кравченко, Р.Г. Шмаков, В.Г. Савченко // Национальные клинические рекомендации. – Москва. – 2018. – URL: https://npngo.ru/uploads/media_document/279/044fc924-3591-4898-b1df-0e11110bdb93.pdf (дата обращения: 19.02.2021).

6. Евразийский экономический союз. "Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов : Решение Совета Евразийской экономической комиссии [принят Советом Евразийской экономической комиссии 03 ноября 2016 года]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/prilozhenie-6-trebovaniya-k-validatsii-bioanaliticheskikh-metodik-ispytaniy-i-analizu-issleduemyh-biologicheskikh-obraztsov> (дата обращения: 28.09.2021).

7. Илларионова, Е.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Теоретические основы метода: учебное пособие / Е.А. Илларионова,

И.П. Сыроватский. – Иркутск: ЭБС Лань, 2018. – 50 с. – ISBN 978-5-97042-635-7. – Текст: непосредственный.

8. 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.

9. 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.

10. Кишкун, А.А. Биохимические исследования в клинической практике / А.А. Кишкун ; – 2-е изд., испр. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 512 с.

11. Ляхов, С.А. Основные начала тонкослойная хроматографии: учебное пособие к курсу «Физико-химические методы исследования лекарственных препаратов» для студентов фармацевтического отделения // URL: <https://studfile.net/preview/4031131> (дата обращения: 28.05.2021).

12. Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10): офиц. сайт. URL: <https://mkb10.su/E80.html> (дата обращения: 01.11.2020).

13. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2: Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Кокс ; пер. с англ. – 4-е изд. – Москва: Лаборатория знаний, 2020. – 636 с. – ISBN 978-5-00101-247-4. – Текст: непосредственный.

14. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в диагностике порфирий. / А.И. Пузикова, Е.А. Литвин, Д.А. Кильдюшкин, А.Е. Друй // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2021. – Том 20. – № 3. – С. 140-144.

15. 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.

16. Регистр лекарственных препаратов, допустимых к применению у больных с острыми порфириями : сайт. - URL: <https://www.critical.ru/consult/pages/porphyria/prodlistsimple.htm> (дата обращения: 09.01.2023).

17. Российская Федерация. Постановления. Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации : Постановление Правительства РФ № 797 [принят Правительством РФ 22 июня 2019 года]. URL: <https://base.garant.ru/72284110> (дата обращения: 11.01.2022).

18. Справочник MSD : сайт. - URL: https://www.msmanuals.com/ru-ru/профессиональный/эндокринные-и-метаболические-нарушения/порфирии/острые-порфирии#v983880_ru (дата обращения: 15.03.2021).

19. A R59W mutation in human protoporphyrinogen oxidase results in decreased enzyme activity and is prevalent in South Africans with variegate porphyria / P.N. Meissner, T.A. Dailey, R.J. Hift [et al.] // Nature Genetics. – 1996. – Vol.13. – №1. – P. 95-97.

20. A Simple Method for Quantification of Five Urinary Porphyrins, Porphobilinogen and 5-Aminolevulinic Acid, Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry / O. Dogan, M.A. Serdar, K. Murat [et al.] // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2019. – Vol.34. – №1. – P. 82-88.

21. A targeted ultra performance liquid chromatography - Tandem mass spectrometric assay for tyrosine and metabolites in urine and plasma: Application to the effects of antibiotics on mice / M.P.M. Letertre, A. Myridakis, L. Whiley [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2021. – Vol.1164. – P. 122511.

22. A.D.A.M. Medical Encyclopedia : website. - URL: <https://medlineplus.gov/ency/article/003372.htm> (дата обращения: 15.01.2023).

23. Abramovich, N.D. Optimization effect of light on endogenous porphyrins in soft biological tissues / N.D. Abramovich, S.K. Dick // *Problems of Physics, Mathematics and Technics.* – 2017. – Vol.1. – №30. – P. 7-12.

24. Acute porphyrias in the Argentinean population: a review / V.E. Parera, A. De Siervi, L. Varela [et al.] // *Cellular and Molecular Biology.* – 2003. – Vol.49. – №4. – P. 493-500.

25. Afshar, M. A rapid HPLC assay for the simultaneous determination of propafenone and its major metabolites in human serum / M. Afshar, M. Rouini // *Analytical Sciences.* – 2004. – Vol.20. – №9. – P. 1307-1311.

26. Ahmed jan, N. Erythropoietic Protoporphria. In: *StatPearls: website* / N. Ahmed jan, S. Masood. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563141> (дата обращения: 25.07.21)

27. Amplifying the efficacy of ALA-based prodrugs for photodynamic therapy using nanotechnology / L. Lou, S. Zhou, S. Tan [et al.] // *Frontiers in Pharmacology.* – 2023. – Vol.14. – P. 1137707.

28. Badminton, M.N. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria / M.N. Badminton, G.H. Elder // *Journal of Inherited Metabolic Disease.* – 2005. – Vol.28. – №3. – P. 277-286.

29. Balwani M. X-Linked Protoporphria. In *GeneReviews : website* / M. Balwani, R. Desnick. – Seattle: University of Washington, 2013. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK121284> (дата обращения: 11.04.21)

30. Biesaga, M. Porphyrins in analytical chemistry / M. Biesaga, K. Pyrzyńska, M. Trojanowicz // *Talanta.* – 2000. – Vol.51. – №2. – P. 209-224.

31. Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle / A. Battersby, C. Fookes, G. Matcham [et al.] // *Nature.* – 1980. – Vol.285. – P. 17-21.

32. Bishop, T.R. Genetic regulation of delta-aminolevulinate dehydratase during erythropoiesis / T.R. Bishop, M.W. Miller, J. Beall // *Nucleic Acids Research.* – 1996. – Vol.24. – №13. – P. 2511-2518.

33. Bissell, D.M. Acute Hepatic Porphyrin / D.M. Bissell, B. Wang // *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. – 2015. – Vol.3. – №1. – P. 17-26.
34. British National Formulary (BNF) (65 ed.) / Joint Formulary Committee // London, UK: Pharmaceutical Press. – 2013. – 663 p.
35. Choby, J.E. Staphylococcus aureus Coproporphyrinogen III Oxidase Is Required for Aerobic and Anaerobic Heme Synthesis / J.E. Choby, E.P. Skaar // *mSphere*. – 2019. – Vol.4. – №4.
36. Chrominfo : website. - URL: https://chrominfo.blogspot.com/2019/09/advantages-and-disadvantages-of_28.html (дата обращения: 29.06.21).
37. Congenital erythropoietic porphyria: mutation update and correlations between genotype and phenotype / C. Ged, F. Moreau-Gaudry, E. Richard [et al.] // *Cellular and Molecular Biology*. – 2009. – Vol.55. – №1. – P. 53-60.
38. Cox, T.M. Protoporphyrin / T.M. Cox, G.J. Alexander, R.P. Sarkany // *Seminars in liver disease*. – 1998. – Vol.18. – №1. – P. 85-93.
39. C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload / S.D. Whatley, S. Ducamp, L. Gouya [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 2008. – Vol.83. – №3. – P. 408-414.
40. Dailey, H.A. Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein / H.A. Dailey, M.G. Finnegan, M.K. Johnson // *Biochemistry*. – 1994. – Vol.33. – №2. – P. 403-407.
41. Danton, M. Porphyrin profiles in blood, urine and faeces by HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry / M. Danton, C.K. Lim // *Biomedical Chromatography*. – 2006. – Vol.20. – №6 – 7. – P. 612-621.
42. Darocha, T. Acute intermittent porphyria in Poland / T. Darocha, A. Gregor // *South African Medical Journal*. – 1971. – P. 204-217.
43. Darwich, E. New developments in erythropoietic porphyrias / E. Darwich, C. Herrero // *Actas Dermo-Sifiliográficas*. – 2013. – Vol.104. – №3. – P. 212-219.

44. delta-Aminolevulinate dehydratase (ALAD) porphyria: the first case in North America with two novel ALAD mutations / R. Akagi, N. Kato, R. Inoue [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2006. – Vol.87. – №4. – P. 29-36.

45. Desnick, R.J. 10 - Inherited Porphyrias / R. J. Desnick, M. Balwani, K.E. Anderson // *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)*. – 2021. – P. 373-411.

46. Desnick, R.J. Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment / R.J. Desnick, K.H. Astrin // *British Journal of Haematology*. – 2002. – Vol.117. – №4. – P. 779-795.

47. «DrugBank» is a global provider of structured drug information and patient insight tools that accelerate drug research and improve healthcare delivery : website. - URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB02285> (дата обращения: 27.08.21)

48. Edel, Y. Porphyria: What Is It and Who Should Be Evaluated? / Y. Edel, R. Mamet // *Rambam Maimonides medical journal*. – 2018. – Vol.2. – №9. – P. 1-12.

49. Elder, G.H. Laboratory investigation of the porphyrias / G.H. Elder, S.G. Smith, S.J. Smyth // *Annals of Clinical Biochemistry*. – 1990. – Vol.27. – №5. – P. 395-412.

50. ELISA for measuring porphobilinogen deaminase in human erythrocytes / L. Lannfelt, L. Wetterberg, L. Lilius [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 1989. – Vol.183. – №2. – P. 227-237.

51. «Encyclopædia Britannica» – is a general knowledge English-language encyclopaedia, which is now published exclusively as an online encyclopaedia : website. - URL: <https://www.britannica.com/science/hemoglobin#ref153383> (дата обращения 18.01.21)

52. Erythropoietic protoporphyria in Sweden: demographic, clinical, biochemical and genetic characteristics / S. Wahlin, Y. Floderus, P. Stål [et al.] // *Journal of Internal Medicine*. – 2011. – Vol.269. – №3. – P. 278-288.

53. Erythropoietic protoporphyria patients in Slovenia / P.B. Marko, J. Miljković, M. Gorenjak [et al.] // *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*. – 2007. – Vol.16. – №3. – P. 99-104.

54. Evaluation of reproductive outcomes in women inadvertently exposed to hexachlorobenzene in southeastern Turkey in the 1950s / J. Jarrell, A. Gocmen, W. Foster [et al.] // *Reproductive Toxicology*. – 1998. – Vol.12. – №4. – P. 469-476.

55. FDA Guidance Documents. «Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry» / FDA // USA, 2018.

56. Floderus, Y. Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene / Y. Floderus, P.M. Shoolingin-Jordan, P. Harper // *Clinical Genetics*. – 2002. – Vol.62. – №4. – P. 288-297.

57. Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in urine of patients with acute intermittent porphyria / G. Casals, J. Marcos, O.J. Pozo [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2013. – Vol.46. – №9. – P. 819-824.

58. Gorchein, A. Determination of delta-aminolaevulinic acid in biological fluids by gas-liquid chromatography with electron-capture detection // *Biochemical Journal*. – 1984. – Vol.219. – №3. – P. 883-889.

59. Guideline on Bioanalytical method validation // EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2, 2022.

60. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring / B.M. Crossley, J. Bai, A. Glaser [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2020. – Vol.32. – №6. – P. 767-775.

61. Hepatoerythropoietic porphyria: a missense mutation in the UROD gene is associated with mild disease and an unusual porphyrin excretion pattern / D.K. Armstrong, P.C. Sharpe, C.R. Chambers [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2004. – Vol.151. – №4. – P. 920-923.

62. Hift, R.J. A systematic study of the clinical and biochemical expression of variegate porphyria in a large South African family / R.J. Hift, D. Meissner, P.N. Meissner // *British Journal of Dermatology*. – 2004. – Vol.151. – №2. – P. 465-471.
63. Hindmarsh, J. Enzyme Assays and the Porphyrins: Which Tissues and When Indicated // *Clinics in Dermatology*. – 1998. – Vol.16. – №2. – P. 245-250.
64. HPLC-MS/MS analysis of anthocyanins in human plasma and urine using protein precipitation and dilute-and-shoot sample preparation methods, respectively / J. Liu, J. Song, K. Huang [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 2018. – Vol.32. – №5. – P. e4177.
65. Hudgins, K. Porphyria: A Rare, Complicated, and Misdiagnosed Disease // *Critical Care Nursing Quarterly*. – 2019. – Vol.42. – №2. – P. 192-197.
66. Hunter, G.A. Molecular enzymology of 5-aminolevulinate synthase, the gatekeeper of heme biosynthesis / G.A. Hunter, G.C. Ferreira // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – Vol.1814. – №11. – P. 1467-1473.
67. Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum / R. Rola, K. Kowalski, T. Bieńkowski [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2020. – Vol.190. – P. 113529.
68. Ingrand, J. Mass spectrometry: do we need it? // *Focus*. – 2015. – Vol.30.
69. Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation / L. Gouya, H. Puy, J. Lamoril [et al.] // *Blood*. – 1999. – Vol.93. – №6. – P. 2105-2110.
70. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") : website. - URL: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/P04765> (дата обращения: 23.08.22)
71. Jagessar, R.C. Mesoporphyrin (ix) Dihydrochloride as a Non-Selective Antimicrobial Agent / R.C. Jagessar, S. Gomathinayagam // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. – 2010. – Vol.4. – №2. – P. 507-512.

72. Labcompare – a guide for the buyer of laboratory equipment : website.
- URL: <https://www.labcompare.com/Chemical-Analysis-Equipment/509-HPLC-UV-VIS-Detector> (дата обращения: 03.02.21)

73. Laboratory Diagnosis of Porphyria / E. Di Pierro, M. De Canio, R. Mercadante [et al.] // *Diagnostics*. – 2021. – Vol.11. – №8. – P. 1343.

74. Lecha, M. Erythropoietic protoporphyria / M. Lecha, H. Puy, J.C. Deybach // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2009. – Vol.4.

75. Light stimulus responsive nanomedicine in the treatment of oral squamous cell carcinoma / H. Fan, Z. Zhu, W. Zhang [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 199. – 112394.

76. Malatesti, N. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents / N. Malatesti, I. Munitic, I. Jurak // *Biophysical Reviews*. – 2017. – Vol. 9. – P. 149–168.

77. Martásek, P. Hereditary coproporphyria // *Seminars in liver disease*. – 1998. – Vol.18. – №1. – P. 25-32.

78. McPherson, R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods / R. McPherson. M. Pincus // – St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. – 1565 p.

79. MedCalc Software Ltd – diagnostic test evaluation calculator : website.
- URL: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php (дата обращения: 24.03.23)

80. Medlock, A.E. Human coproporphyrinogen oxidase is not a metalloprotein / A.E. Medlock, H.A. Dailey // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol.271. – №51. – P. 32507-32510.

81. Medstatistic.ru – онлайн-сервис для статистической обработки данных медицинских исследований : сайт. - URL: <https://medstatistic.ru/calculators/calchi.html> (дата обращения 27.01.23)

82. Mohan G. Ala Dehydratase Deficiency Porphyria. In: StatPearls : website / G. Mohan, A. Madan. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560836> (дата обращения: 17.09.22)

83. Molecular epidemiology of erythropoietic protoporphyria in the UK / S.D. Whatley, N.G. Mason, S.A. Holme [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2010. – Vol.162. – №3. – P. 642-646.

84. Murphy, G.M. Diagnosis and management of the erythropoietic porphyrias // *Dermatologic Therapy*. – 2003. – Vol.16. – №1. – P. 57-64.

85. Na, I. Anti-Correlation between the Dynamics of the Active Site Loop and C-Terminal Tail in Relation to the Homodimer Asymmetry of the Mouse Erythroid 5-Aminolevulinate Synthase / I. Na, D. Catena, M.J. Kong // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol.19. – №7. – P. 1899.

86. Najahi-Missaoui, W. Production and characterization of erythropoietic protoporphyric heterodimeric ferrochelates / W. Najahi-Missaoui, H.A. Dailey // *Blood*. – 2005. – Vol.106. – №3. – P. 1098-1104.

87. NORD – National Organization for Rare Disorders : website.
- URL: <https://rarediseases.org/rare-diseases/alad-porphyrin> (дата обращения: 22.06.21)

88. NORD – National Organization for Rare Disorders : website.
- URL: <https://rarediseases.org/rare-diseases/congenital-erythropoietic-porphyrin> (дата обращения: 30.01.21)

89. NORD – National Organization for Rare Disorders : website.
- URL: <https://rarediseases.org/rare-diseases/hepatoerythropoietic-porphyrin> (дата обращения: 31.01.21)

90. NORD – National Organization for Rare Disorders : website.
- URL: <https://rarediseases.org/rare-diseases/hereditary-coproporphyrin> (дата обращения: 28.01.21)

91. NORD – National Organization for Rare Disorders : website.
- URL: <https://rarediseases.org/rare-diseases/variegate-porphyrin> (дата обращения: 28.01.21)

92. NORD – National Organization for Rare Disorders : website.
- URL: <https://rarediseases.org/rare-diseases/x-linked-protoporphyrinuria> (дата обращения: 30.01.21)

93. Nordmann, Y. Human hereditary hepatic porphyrias. / Y. Nordmann, H. Puy // *Clinica Chimica Acta*. – 2002. – Vol.325. – №1 – 2. – P. 17-37.

94. Ötles, S. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples / S. Ötles, C. Kartal // *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. – 2016. – Vol.15. – №1. – P. 5-15.

95. Pischik, E. Neurological manifestations of acute intermittent porphyria / E. Pischik, R. Kauppinen // *Cellular and Molecular Biology*. – 2009. – Vol.55. – №1. – P. 72-83.

96. Poudel, P. Efficacy and Safety Concerns with Sn-Mesoporphyrin as an Adjunct Therapy in Neonatal Hyperbilirubinemia: A Literature Review / P. Poudel, S. Adhikari // *International Journal of Pediatrics*. – 2022. – Vol.2022. – Article ID 2549161.

97. Porphyria cutanea tarda and hepatoerythropoietic porphyria: Identification of 19 novel uroporphyrinogen III decarboxylase mutations / Y. Weiss, B. Chen, M. Yasuda [et al.] // *Molecular genetics and metabolism*. – 2019. – Vol.128. – №3. – P. 363-366.

98. Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias / H.L. Bonkovsky, J.T. Guo, W. Hou [et al.] // *Comprehensive Physiology*. – 2013. – Vol.3. – №1. – P. 365-401.

99. Porphyrin metabolism and haem biosynthesis in Gilbert's syndrome / K.E. McColl, G.G. Thompson, E. el Omar [et al.] // *Gut*. – 1987. – Vol.28. – №2. – P. 125-130.

100. Porphyrins profile by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for the diagnosis of porphyria / E. Fateen, A. Abd-Elfattah, A. Gouda [et al.] // *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. – 2011. – Vol.12. – №1. – P. 49-58.

101. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging / H.W. Rhee, P. Zou, N.D. Udeshi [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol.339. – №6125. – P. 1328-1331.
102. Puy, H. Porphyrias / H. Puy, L. Gouya, J.C. Deybach // *Lancet*. – 2010. – Vol.375. – №9718. – P. 924-937.
103. Ramanujam, V.S. Porphyria Diagnostics-Part 1: A Brief Overview of the Porphyrias / V.S. Ramanujam, K.E. Anderson // *Current Protocols in Human Genetics*. – 2015. – Vol.86. – P. 17.20.1-17.20.26.
104. Redefining Dilute and Shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry / B. Greer, O. Chevallier, B. Quinn [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol.141. – P. 116284.
105. Regulation and tissue-specific expression of δ -aminolevulinic acid synthases in non-syndromic sideroblastic anemias and porphyrias / K. Peoc'h, G. Nicolas, C. Schmitt [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2019. – Vol.128. – №3. – P. 190-197.
106. Rouault T. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease // *Nature Chemical Biology*. – 2006. – P. 406-414.
107. Sassa, S. Modern diagnosis and management of the porphyrias // *British Journal of Haematology*. – 2006. – Vol.135. – №3. – P. 281-292.
108. Schreiber, W.E. Liquid-chromatographic profiles of urinary porphyrins / W.E. Schreiber, V.A. Raisys, R.F. Labbe' // *Clinical Chemistry*. – 1983. – Vol.29. – P. 527-530.
109. Seven novel genetic mutations within the 5'UTR and the housekeeping promoter of HMBS gene responsible for the non-erythroid form of acute intermittent porphyria / V. Brancaloni, F. Granata, A. Colancecco [et al.] // *Blood Cells, Molecules and Diseases*. – 2012. – Vol.49. – №3 – 4. – P. 147-151.
110. Singal, A.K. Porphyria cutanea tarda // *Molecular genetics and Metabolism*. – 2019. – Vol.128. – №3. – P. 271-281.

111. Singal, A.K. Variegated Porphyria. In GeneReviews : website / A.K. Singal, K.E. Anderson. – Seattle: University of Washington, 2013. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK121283> (дата обращения 02.07.22)

112. Soret, J.L. Analyse spectrale: sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette // Comptes rendus de l'Académie des Sciences. – 1883. – Vol.97. – P. 1269-1273.

113. Stein, P.E. Update review of the acute porphyrias / P.E. Stein, M.N. Badminton, D.C. Rees // British Journal of Haematology. – 2017. – Vol.176. – №4. – P. 527-538.

114. Structural, thermodynamic, and mechanistical studies in uroporphyrinogen III synthase: molecular basis of congenital erythropoietic porphyria / A. Fortian, D. Castaño, E. Gonzalez [et al.] // Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. – 2011. – Vol.83. – P. 4374.

115. The acute hepatic porphyrias: current status and future challenges / M. Siegesmund, A.M. van Tuyl van Serooskerken, P. Poblete-Gutiérrez [et al.] // Best practice & research. Clinical gastroenterology. – 2010. – Vol.24. – №5. – P. 593-605.

116. The American Porphyria Foundation (APF) – a non-profit foundation dedicated to improving the health and well-being of all individuals and families impacted by Porphyria : website. - URL: <https://porphyriafoundation.org/for-healthcare-professionals/drug-safety> (дата обращения: 27.12.22)

117. The cutaneous porphyrias / D. Schulenburg-Brand, R. Katugampola, A.V. Anstey [et al.] // American Journal of Clinical Dermatology. – 2014. – Vol.32. – №3. – P. 369-384.

118. The Human Metabolome Database (HMDB) – a freely available electronic database containing detailed information about small molecule metabolites found in the human body : website. - URL: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000570> (дата обращения: 27.08.21)

119. The Human Metabolome Database (HMDB) – a freely available electronic database containing detailed information about small molecule metabolites found in the

human body : website . - URL: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000916> (дата обращения: 27.08.21)

120. The Human Metabolome Database (HMDB) – a freely available electronic database containing detailed information about small molecule metabolites found in the human body : website. - URL: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001097> (дата обращения: 27.08.21)

121. The incidence of inherited porphyrias in Europe / G.H. Elder, P. Harper, M. Badminton [et al.] / *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2013. – Vol.36. – №5. – P. 849-857.

122. The third case of Doss porphyria (delta-amino-levulinic acid dehydratase deficiency) in Germany / M.O. Doss, T. Stauch, U. Gross [et al.] // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2004. – Vol.27. – №4. – P. 529-536.

123. Tsai, M.-T. "Lead Poisoning Can Be Easily Misdiagnosed as Acute Porphyria and Nonspecific Abdominal Pain / M.-T. Tsai, S.-Y. Huang, S.-Y. Cheng // *Case Reports in Emergency Medicine*. – 2017. – Vol.2017. – P. 1-4.

124. Ultra high-performance liquid chromatography of porphyrins in clinical materials: column and mobile phase selection and optimisation / C.M. Benton, C.K. Lim, C. Moniz [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 2012. – Vol.2. – №6. – P. 714-719.

125. Variegate porphyria in South Africa, 1688-1996--new developments in an old disease / R.J. Hift, P.N. Meissner, A.V. Corrigall [et al.] // *South African Medical Journal*. – 1997. – Vol.87. – №6. – P. 722-731.

126. Walke, A. Protoporphyrin IX Analysis from Blood and Serum in the Context of Neurosurgery of Glioblastoma. *Mass Spectrometry in Life Sciences and Clinical Laboratory : website* / A. Walke, E.S. Molina, W. Stummer. – London: IntechOpen, 2020. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/74409> (дата обращения: 09.12.21)

127. Wang, B. Hereditary Coproporphyrria. In *GeneReviews : website* / B. Wang, D.M. Bissell. – Seattle: University of Washington, 2012. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114807> (дата обращения: 18.06.22)

ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)

Литвинова Т.М.

2023 г.



08 ФЕВ 2023

АКТ
000496

о внедрении результатов диссертации Кильдюшкина Даниила Андреевича в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Кильдюшкина Даниила Андреевича

на тему «Создание подходов определения порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диагностическими целями»

внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина

при изучении дисциплины «токсикологическая химия» и «медицинская химия»,

читаемая студентам по направлениям подготовок (специальностей)
33.05.01 Фармация.

Директор Института
Фармации им. А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор

(подпись)

Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой
фармацевтической и
токсикологической
химии им. А.П. Арзамасцева
д.ф.н., профессор

(подпись)

Раменская Г.В.

Начальник Учебного управления
к.м.н.

(подпись)

Юдина Л.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ДЕТСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ
ИМЕНИ ДМИТРИЯ РОГАЧЕВА»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)
улица Саморы Машела, д.1, г. Москва, ГСП-7, 117997
тел: (495) 937-50-24, факс: (495) 664-70-90, e-mail: info@fnkc.ru, www.fnkc.ru
ОКПО 13157861, ОГРН 1027739507212, ИНН/КПП 7728008953/ 772801001

№ _____
На № _____ от _____



«Утверждаю» _____

Главный врач

ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ

к. м. н. Литвинов Д. В.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательской работы

Название: диагностика порфирий методом ВЭЖХ в крови / моче

Кем разработан: ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава
России, г. Москва, ГСП-7, 117997, ул. Саморы Машела, д. 1.

Источник информации: диссертационная работа Кильдюшкина Д. А. на
соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук.

Где внедряется (апробируется): ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России, г. Москва, ГСП-7, 117997, ул. Саморы Машела,
д. 1.

Результаты научно исследовательской работы. Результаты
диссертационного исследования «Создание подходов определения
порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом ВЭЖХ с
диагностическими целями», выполненного Кильдюшкиным Даниилом
Андреевичем под руководством к. б. н. Литвина Евгения Александровича,
внедрены в практику лаборатории прикладной и фундаментальной

фармакологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ.
Разработанный метод может быть использован для первичного скрининга
пациентов с подозрениями на порфирии или имеющих родственников с
подтверждённым диагнозом.

И. о. заведующего лабораторией прикладной
и фундаментальной фармакологии



Осипьянц А. И.

Ответственный специалист

Литвин Е. А.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

АКТ №20/07-23 о внедрении результатов НИР

Данный акт составлен о том, что методика количественного и качественного определения порфиринов при помощи ВЭЖХ-УФ, разработанная Кильдюшкиным Д.А., Литвиным Е.А. и Петуховым А.Е. внедрена в работу лаборатории №51 фармакологии и фармацевтической разработки с 20 июля с 2023г. Методики используются для осуществления персонализированного подхода к диагностике и рационализации фармакотерапии врожденных порфирий.

Зав. НПК №50
ФГБУ "ГНЦ Институт
иммунологии" ФМБА России
д.фармац.н., доцент

Смирнов В.В.

«20» июля 2023г.

