

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 20.05.2021
Принята к печати 01.07.2021

Контактная информация:
Александра Игоревна Пузикова,
студентка ФГАУ ВО «Первый Московский
государственный медицинский
университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России
(Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва,
ул. Трубецкая, 8-2
E-mail: puzikova_a_i@student.sechenov.ru

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPHOI»
Received 20.05.2021
Accepted 01.07.2021

Correspondence:
Alexandra I. Puzikova,
Student at I.M. Sechenov First Moscow
State Medical University, Ministry of
Healthcare of the Russian Federation
Address: 8-2 Trubetskaya St.,
Moscow 119991, Russia
E-mail: puzikova_a_i@student.sechenov.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-3-140-144

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в диагностике порфирий

А.И. Пузикова¹, Е.А. Литвин², Д.А. Кильдюшкин¹, А.Е. Друй²

¹ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Порфирии различаются по этапу синтеза гема, на котором происходит сбой, приводящий к накоплению промежуточных продуктов – порфиринов. Ввиду низкой специфичности клинических проявлений порфирий и латентного течения заболеваний их своевременная диагностика затруднена. В статье дается обоснование применения высокоэффективной жидкостной хроматографии в определении порфиринов. Метод пригоден к выявлению порфиринов в моче, крови и кале пациентов. Продемонстрированы примеры его работы.

Ключевые слова: порфирии, диагностика, высокоэффективная жидкостная хроматография, определение порфиринов

Пузикова А.И. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (3): 140–144. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-3-140-144

Application of high-performance liquid chromatography in porphyrias diagnostics

A.I. Puzikova¹, E.A. Litvin², D.A. Kildyushkin¹, A.E. Druy²

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Porphyrias are distinguished by the stage of heme synthesis at which a failure occurs, leading to the accumulation of intermediate products – porphyrins. Due to the low specificity of clinical manifestations of porphyria and the latent course of the disease, their timely diagnosis is difficult. This article substantiates the effectiveness of high-performance liquid chromatography method in the determination of porphyrins. The method is suitable for porphyrin determination in urine, blood and feces of patients. Examples of its work are shown.

Key words: porphyrias, diagnosis, high performance liquid chromatography, determination of porphyrins

Puzikova A.I., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (3): 140–144.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-3-140-144

Порфирии – группа гетерогенных заболеваний, вызванных дефектами ферментов биосинтеза гема. Как правило, порфирии – это результат врожденных дефектов, нежели приобретенных. Синтез гема (рисунки 1) – многостадийный процесс, и если на любом его этапе происходит сбой, он приводит к росту концентрации промежуточного продукта: порфиринов и/или их предшественников. Эти субстраты накапливаются в крови и тканях, усиленно выделяются с мочой и калом.

Порфирины – циклические тетрапиррольные соединения, и хоть они и не обладают биологической активностью, но являются достаточно сильными оксидантами и не могут эффективно выполнять функцию конечных продуктов: гема, билирубина, цитохромов печени [1].

Порфирии классифицируют по:

- ферменту, где происходит мутация, приводящая к накоплению аномального порфирина;
- симптоматике: неврологической или кожной;
- месту продукции (и накопления) аномального порфирина: печень или костный мозг [3].

Классификация порфирий представлена в таблице.

Распространенность острых порфирий насчитывает 7–12 на 100 000, по данным Национального гематологического сообщества. Они характеризуются прогрессирующим течением и преобладающим поражением нервной системы [4]. Все острые порфирии проявляются в эпизодах кризов, сопровождающихся мышечной слабостью (42–60%), гипертонией (36–54%) и тахикардией (28–80%). Абдоминальные симптомы включают в себя боль в животе (85–95%), тошноту и рвоту (43–88%), запор (48–84%) или диарею (5–12%) [5, 6].

Врожденная эритропоэтическая порфирия – очень редкое заболевание, на сегодняшний день выявлено и зарегистрировано всего около 150 случаев [7]. На 2004 г. выявлено 5 пациентов с порфирией, вызванной дефицитом АЛК-дегидратазы [8].

Среди острых порфирий чаще всего встречается острая перемежающаяся порфирия [9]. Обычно заболевание протекает в латентной форме: 90% носителей мутации в ферменте HMBS никогда не проявляют описанных симптомов [10].

Рисунок 1
Схема биосинтеза гема [2]

Figure 1
Heme biosynthesis [2]

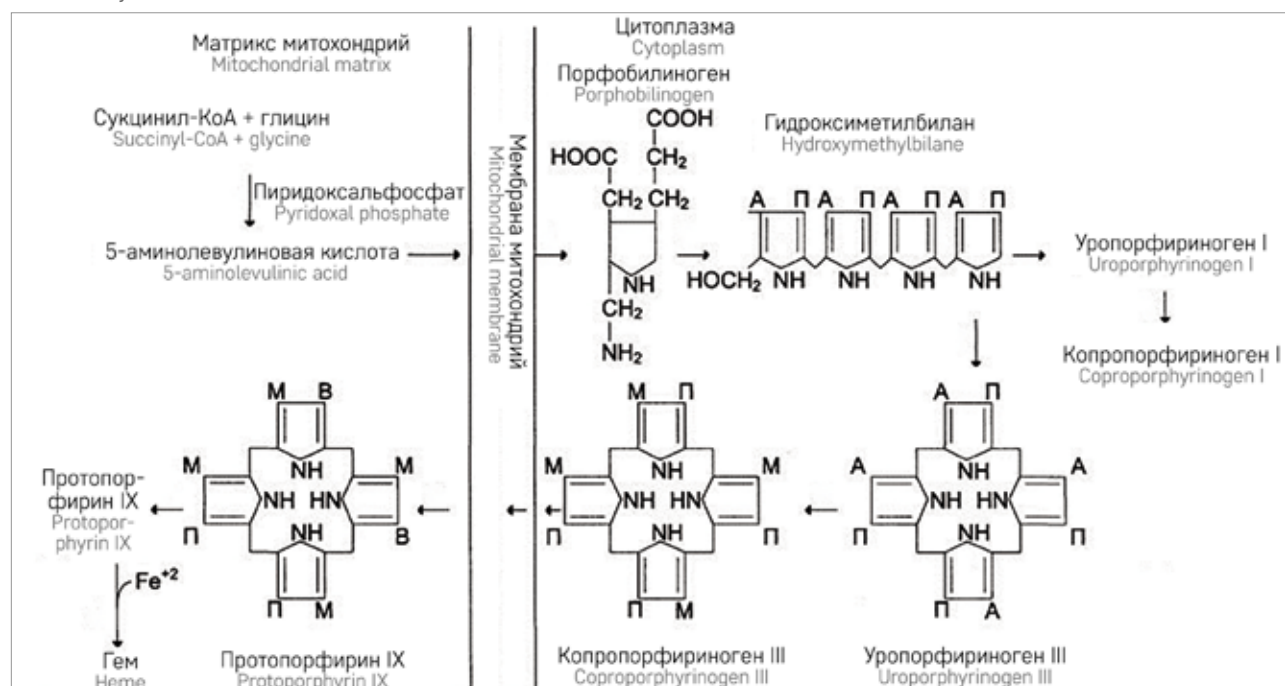


Таблица
Классификация порфирий [3]

Table
Classification of the porphyrias [3]

Название Name	Мутация в гене (обозначение) Mutated gene (symbol)	Острые симптомы Acute symptoms	Кожные симптомы Cutaneous symptoms
Порфирия, обусловленная дефицитом АЛК-дегидратазы Delta-aminolevulinic aciduria	АЛК-дегидратаза (ALAD) ALA dehydratase (ALAD)	+++	0
Острая перемежающаяся порфирия Acute intermittent porphyria	Гидрокси метилбилан-синтаза (HMBS) Hydroxymethyl-bilane synthase (HMBS)	+++	0
Врожденная 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)	++	+
Вариетальная порфирия Variegata porphyria	PROTOgen-оксидаза (PROOX) PROTOgen oxidase (PROOX)	++	+
Эритропоэтическая протопорфирия Erythropoietic Protoporphyria	Феррохелатаза Ferrochelatase	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)	+	++

Врожденная эритропоэтическая порфирия и поздняя кожная порфирия лишены неврологической симптоматики.

Начало приступа печеночных порфирий провоцируют разнообразные факторы, не сводящиеся к единому критерию: воздействие липофильных ксенобиотиков и соединений (лаки, краски, органические растворители, пестициды), алкоголь, стресс, дефицит калорий, физические нагрузки, эндо- и экзогенные гормоны, а также сопутствующие инфекции [11]. Прием препаратов, ингибирующих цитохромы печени (вплоть до нестероидных противовоспалительных средств и пищевых продуктов,

наподобие грейпфрутового сока), также может спровоцировать эпизод. Дополнительный фактор риска для кожной медленной порфирии – перегрузка печени железом. В свою очередь, она также может быть вызвана злоупотреблением алкоголем, индукторами гемоксигеназы или вирусами гепатитов В и С [11]. Характерными симптомами кожной медленной порфирии являются огрубение кожи и появление на открытых участках (тыльная сторона рук, шея и лицо) пузырей с серозной жидкостью, эрозий, рубцов и гиперпигментации. Кожные симптомы (волдыри, гиперпигментация, рубцы, эрозия) никогда не возникают при острой перемежающейся и обусловленной

дефицитом АЛК-дегидратазы порфириях, а у 60% пациентов с variegate порфирией – это единственное проявление болезни [12].

В случае эритропоэтической протопорфирии часто (25%) встречается холелитиаз, образованный кристаллами из гидрофобного протопорфирина в гепатоцитах и желчных каналах. Печеночная недостаточность поражает 2–5% пациентов, у многих наблюдается дефицит железа с микроцитарной анемией и низким содержанием витамина Д [12].

Х-сцепленная доминантная протопорфирия, гепатоэритропоэтическая порфирия и врожденная эритропоэтическая порфирия имеют характерный симптом: аномальную чувствительность к солнцу (фотодерматоз). Пребывание на свету (в том числе искусственном) вызывает сильную боль, жжение, отечность и зуд на подверженной излучению коже. Накапливающиеся в коже порфирины выступают как фотосенсибилизаторы [13]. Длительное или частое воздействие светом в случаях врожденной эритропоэтической порфирии и гепатоэритропоэтической порфирии приводит к образованию волдырей и последующему рубцеванию пораженных участков [14]. У пациентов с Х-сцепленной доминантной протопорфирией и эритропоэтической протопорфирией пребывание на солнце вызывает острую жгучую боль и гиперемию кожи без образования рубцов, что затрудняет диагностику [15].

Клинически явные порфирии у детей встречаются крайне редко, лишь 5% пациентов с острой перемежающейся порфирией проявляют признаки в детстве [10]. Самому младшему пациенту было 3 года [16]. Развивающаяся также в детском возрасте гепатоэритропоэтическая порфирия имеет кожные проявления, сходные с врожденной эритропоэтической порфирией, но лишена отличительных признаков: спленомегалии и эритродонтии [17]. С 1969 г. зарегистрировано 34 случая гепатоэритропоэтической порфирии у детей [18].

Наиболее частые клинические проявления порфирий неспецифичны, что в совокупности с редкой встречаемостью и латентностью течения значительно осложняет своевременную диагностику и ухудшает прогноз заболевания. Более того, после приступов острых порфирий (в течение 2 сут) содержание предшественников гема приходит в норму [19]. В физиологических условиях остаточной активности фермента хватает для поддержания нормального гомеостаза гема, в этот период их анализ не имеет диагностической ценности.

Важное значение в постановке диагноза и установлении формы порфирии имеют определение содержания и разделение порфиринов, а также продуктов их неполного биосинтеза, т. е. их идентификация. В настоящее время для этого используют

комплекс лабораторных методов: биохимических, хроматографических и генетических. Биологическим материалом для большинства лабораторных методов служит разовая или суточная моча, реже кал, эритроциты и лимфоциты крови, плазма и сыворотка.

Генетические методы направлены на выявление поломок в генах, кодирующих ферменты биосинтеза гема: *HMBS* (OMIM#17600), *UROD* (OMIM#176100), *PPOX* (OMIM#176200), *CPOX* (OMIM#176300), *ALAD* (OMIM#612740), *UROS* (OMIM#263700). Молекулярно-генетические методы исследования должны использоваться для определения носительства герминального генетического варианта. Эти исследования, хотя и позволяют с высокой точностью верифицировать диагноз и установить характер генетического нарушения, приведшего к болезни, доступны не каждому лечебно-профилактическому учреждению. Они требуют дорогого и специального оборудования, а в качестве материалов используются фибробласты, лимфоциты и иногда биопсия печени [20]. Секвенирование занимает много времени: полный анализ выполняется в течение 2 мес.

Стандартный биохимический тест для обнаружения 5-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена в крови, моче, кале и крови при помощи реактива Эрлиха. В основе метода лежит реакция альдегида, входящего в состав реактива Эрлиха, с индол-содержащими соединениями (аминолевулиновая кислота и порфобилиноген) [21, 22]. Однако этот метод применяется лишь в скрининге острой перемежающейся порфирии [23].

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения порфиринов также используется в диагностике порфирий [24]. Хроматография – аналитический метод разделения многокомпонентной смеси. Он основан на явлении сорбции–десорбции компонентов смеси 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 за счет того, что компоненты пробы с разными скоростями взаимодействуют с сорбентом при направленном движении в подвижной фазе [25].

В ВЭЖХ в роли неподвижной фазы используется сорбент, спрессованный в колонки, в них помещают образец и под высоким давлением вымывают определенным растворителем, и соединения разной природы и строения с разной скоростью вымываются из колонки. Выделяют нормально-фазную и обращенно-фазную ВЭЖХ. Обращенно-фазная хроматография задействует гидрофобный сорбент: силикагель с привитыми углеводородными цепями C4, C18, а подвижной фазой выступает

смесь воды, спиртов, слабых кислот и буферных растворов [25].

Для анализа порфиринов в биологическом материале метод обращенно-фазной ВЭЖХ подходит, так как порфирины – это нелетучие соединения с умеренной полярностью, растворимые в воде и других полярных органических растворителях (ацетон, ацетонитрил, нитробензол, метанол) [26]. Разница в строении порфиринов (наличие карбоксильных групп в структуре и положение боковых радикалов в циклической части молекулы) влияет на физико-химические свойства этих соединений, в частности на растворимость в воде. По времени удерживания на ВЭЖХ-колонке можно судить о структуре порфиринов.

Порфирины поглощают излучение в видимой и ультрафиолетовой областях спектра и обладают характерными спектральными свойствами [19]. Их отличительным признаком, независимо от строения боковых цепей, является максимум поглощения при длине волны около 400 нм: полоса Core [27]. Диодная матрица – самый распространенный и бюджетный вариант детектора ультрафиолетовой лампы – может определять сигналы от этих соединений.

Более того, ВЭЖХ позволяет анализировать образцы в мягких условиях (от комнатной температуры до 60°C). Образцы биожидкостей человека требуют меньших затрат на пробоподготовку по сравнению с другими типами хроматографии, например газовой [25].

Метод ВЭЖХ позволяет проводить качественный анализ, опираясь на время удерживания на колонке, объем удерживания, изучение спектральных характеристик компонента (ультрафиолетовая детекция, масс-спектрометрия, инфракрасная спектроскопия и др.). Количественный анализ также возможен. Сигнал отделенного от остальных соединения соответствует определенной концентрации. Чем он выше (т. е. чем выше пик на хроматограмме), тем больше содержание компонента. Если есть внутренний стандарт, добавляемый к каждой пробе в известных концентрациях, то на его сигнал можно нормировать сигналы исследуемых соединений и тем самым получать более точное значение.

Существует несколько методик определения порфиринов в биоматериале при помощи ВЭЖХ. В соответствии с ранее опубликованной методикой [19, 24] в качестве внутреннего стандарта используется 2-винил 4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX. Этот ксенобиотик не встречается в организме человека, имеет сходное строение (следовательно, пробоподготовка действует на него так же, как и на остальные порфирины) и отделяется от других компонентов в выбранных условиях. Мезопорфирин IX не используется в качестве внутреннего стандарта, поскольку пациент может принимать его в лечебных целях [28]. Метод позволяет

идентифицировать 9 порфиринов плюс собственно гем и внутренний стандарт (рисунки 2–5).

Рисунок 2

Хроматограмма донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта (1 – внутренний стандарт)

Figure 2
Chromatogram of the donor's urine sample with the addition of an internal standard (1 – internal standard)

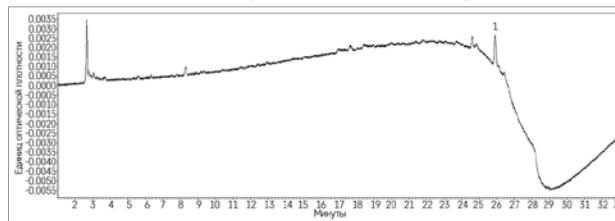


Рисунок 3

Хроматограмма донорской мочи с использованием стандартов: 1 – уропорфирин I; 2 – уропорфирин III; 3 – гептацикарбоксилпорфирин I; 4 – гексацикарбоксилпорфирин I; 5 – пентакарбоксилпорфирин I; 6 – копропорфирин I; 7 – копропорфирин III; 8 – внутренний стандарт; 9 – мезопорфирин IX; 10 – протопорфирин IX

Figure 3
Chromatogram of the donor's urine sample using the following standards: 1 – uroporphyrin I; 2 – uroporphyrin III; 3 – heptacarboxylporphyrin I; 4 – hexacarboxylporphyrin I; 5 – pentacarboxylporphyrin I; 6 – coproporphyrin I; 7 – coproporphyrin III; 8 – internal standard; 9 – mesoporphyrin IX; 10 – protoporphyrin IX

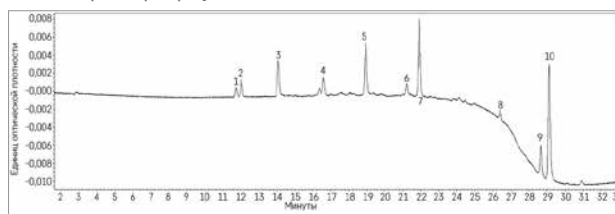


Рисунок 4

Хроматограмма мочи пациента с подозрением на уропорфирию: 1 – копропорфирин III; 2 – внутренний стандарт

Figure 4
Chromatogram of the urine of a patient with suspected uroporphyrin: 1 – coproporphyrin III; 2 – internal standard

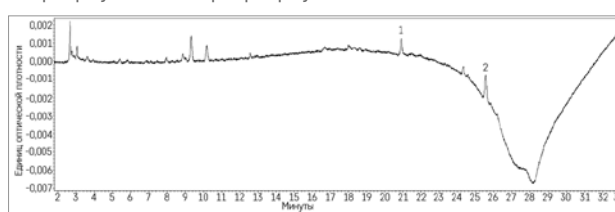
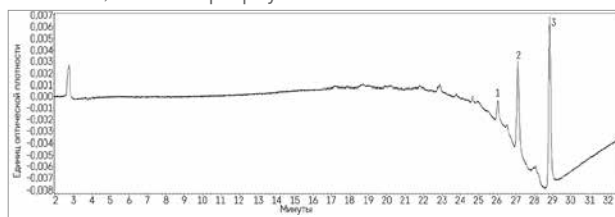


Рисунок 5

Хроматограмма плазмы крови пациента с врожденной эритропоэтической порфирией: 1 – внутренний стандарт; 2 – гем; 3 – мезопорфирин IX

Figure 5
Chromatogram of the blood plasma of a patient with congenital erythropoietic porphyria: 1 – internal standard; 2 – heme; 3 – mesoporphyrin IX



Хроматограммы демонстрируют хорошую селективность метода (все пики исследуемых соединений отделены друг от друга) и чувствительность. Пики, не имеющие диагностической ценности, не мешают определяемым соединениям и не влияют на их форму.

Метод позволяет работать с мочой или кровью пациентов и определять в ней порфирины. В зависимости от биоматериала отличается количество подготовительных операций: для мочи достаточно техники dilute & shoot (разведение образца и центрифугирование), плазма крови же требует более сложной очистки, куда входит и осаждение белков, и разведение пробы. Длительность анализа одного образца вне зависимости от использованного материала составляет 41 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Порфирии – редко встречающиеся заболевания, которые к тому же имеют либо неспецифическую симптоматику, либо протекают в латентной

форме. Вследствие этого своевременная диагностика порфирий затруднена. Существуют разные методы диагностики этой группы заболеваний, включающих в себя биохимические, ферментативные и генетические тесты. Тест с реактивом Эрлиха не позволяет определить более редкие формы порфирий. Генетические методы затратны и трудоемки. ВЭЖХ позволяет быстро и бюджетно определить порфирины в биологических жидкостях организма: плазме крови, моче, что делает данный метод весьма полезным в диагностике порфирий.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Puzikova A.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7848-8112>

Litvin E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-5339>

Kildyushkin D.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8807-2145>

Druy A.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Литература

1. Fratz E.J., Stojanovski B.M., Ferreira G.C. Toward Heme: 5-Aminolevulinate Synthase and Initiation of Porphyrin Synthesis. Handbook of Porphyrin Science, Heme Biochemistry, Vol 26. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Place Published; 2014, Pp. 3–68.
2. Биохимия: учебник для вузов. Под ред. Северина Е.С. 5-е изд. М.; 2009. 768 с.
3. Bissell D.M., Wang B. Acute Hepatic Porphyrin. J Clin Transl Hepatol 2015; 3 (1): 17–26.
4. Pischik E., Kauppinen R. Neurological manifestations of acute intermittent porphyria. Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France), 2009; 55: 72–83.
5. Phillips J.D. Heme biosynthesis and the porphyrias. Mol Genet Metab 2019; 128 (3): 164–77.
6. Owusu S.K., Asamoah E.O., Ofori-Darko V.A. Acute intermittent porphyria. An often forgotten diagnosis in acute abdomen. West Afr J Med 1992; 11: 162–4.
7. Greer J.P., Foerster J., Lukens J.N., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B. In: Wintrobe's clinical Hematology. 12th ed. Sylvia S., ed. Bottemley Porphyria; 2004. Pp. 1058–62.
8. Doss M.O., Stauch T., Gross U., Renz M., Akagi R., Doss-Frank M., et al. The third case of Doss porphyria (delta-amino-levulinic acid dehydratase deficiency) in Germany. J Inher Metab Dis 2004; 27 (4): 529–36.
9. Elder G., Harper P., Badminton M., Sandberg S., Deybach J.C. The incidence of inherited porphyrias in Europe. J Inher Metab Dis 2013; 36 (5): 849–57.
10. Balwani M., Singh P., Seth A., Debnath E.M., Naik H., Doherty D., et al. Acute Intermittent Porphyria in children: A case report and review of the literature. Mol Genet Metab 2016; 119: 295–9.
11. Pischik E., Kauppinen R. An update of clinical management of acute intermittent porphyria. Appl Clin Genet 2015; 8: 201–14.
12. Stein P.E., Badminton M.N., Rees D.C. Update review of the acute porphyrias. Br J Haematol 2017; 176 (4): 527–38.
13. Kakoullis L., Louppides S., Papachristodoulou E., Panos G. Porphyrins and photosensitivity: pathophysiology for the clinician. Postgrad Med 2018; 130: 673–86.
14. Anderson K.E., Lee C., Desnick R.J. Nelson Text Book of Pediatrics. 18th ed. Vol. 1. Philadelphia: Kliegman, Behrman, Jenson, Stanton, Saunders Elsevier; 2007. Pp. 645–7.
15. Woolf J., Marsden J.T., Degg T., Whatley S., Reed P., Brazil N., et al. Best practice guidelines on first-line laboratory testing for porphyria. Ann Clin Biochem 2017; 54 (2): 188–98.
16. Sykes R.M. Acute intermittent porphyria, seizures, and antiepileptic drugs: a report on a 3-year-old Nigerian boy. Seizure 2001; 10: 64–6.
17. Bhavasar R., Santoshkumar G., Prakash B.R. Erythrodontia in congenital erythropoietic porphyria. J Oral Maxillofac Pathol 2011; 15 (1): 69–73.
18. Puy H., Gouya L., Deybach J.C. Porphyrins. Lancet 2010; 375: 924–37.
19. Macours P. Improvement in HPLC separation of porphyrin isomers and application to biochemical diagnosis of porphyrias. Clin Chem Lab Med 2006; 44 (12): 1433–40.
20. Hindmarsh J.T. Enzyme assays and the porphyrias: which tissues and when indicated. Clin Dermatol 1998; 16: 245–50.
21. Mauzerall D., Granick S. The occurrence and determination of aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J Biol Chem 1956; 219: 435–46.
22. Tietz N.W., Burtis C.A., Ashwood E.R. Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Sanders Co; 2005.
23. Richard A. McPherson Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods: First South Asia Edition e-Book. Elsevier Health Sciences; 2017. P. 459.
24. Hindmarsh J.T., Oliveras L. Biochemical Differentiation of the Porphyrins Clin Biochem 1999; 32 (8): 609–19.
25. Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. Техносфера; 2009. С. 472.
26. Johnson P.M., Perkins S.L., Kennedy S.W. A high speed liquid-chromatographic method for measuring urine porphyrins. Clin Chem 1988; 34: 103–5.
27. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. Пер. с англ. – М.: Мир; 1986. С. 109.
28. Patel M., Day D.J. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. Trends Pharmacol Sci 1999; 20 (9): 359–64.