



ДУТОВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

Старший научный сотрудник лаборатории хроматографии НИИ медицинской экологии при Читинской государственной медицинской академии. Доктор медицинских наук, врач высшей квалификационной категории. Одним из первых в России внедрил в клиническую практику биомедицинскую хроматографию (ВЭЖХ) и терапевтический лекарственный мониторинг. Автор более 30 новых методов анализа эндогенных веществ и лекарственных препаратов в биологических жидкостях, разработанных для использования в клинической практике.

Разработки получили официальное Международное признание (Who's Who in Science and Engineering, Ninth Edition, 2006 - 2007).

УДК 543.544:612.015

Дутов А.А.

НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ БИМЕДИЦИНСКОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография это метод разделения смесей химических веществ. Честь открытия хроматографии принадлежит великому русскому ученому Михаилу Семеновичу Цвету. По оценке ЮНЕСКО, открытие хроматографии входит в десятку величайших открытий XX века. Датой открытия считается 1903 год, а затем на многие десятилетия этот уникальный метод был предан забвению. В настоящее время хроматография переживает период бурного расцвета, а сфера ее применения необычайно широка и включает такие отрасли как биотехнологии, медицина, криминалистика, органический синтез, экологический мониторинг, получение сверхчистых веществ, анализ космических объектов и многое другое.

Особое место в списке хроматографических методов занимает жидкостная хроматография¹ - самый универсальный метод анализа, основанный на неразрушающем разделении веществ. Последнее обстоятельство позволяет использовать жидкостную хроматографию не только как аналитический, но и как уникальный технологический метод выделения и очистки веществ, когда другие методы оказываются неэффективными. Не следует также забывать, что само открытие и последующее развитие хроматографических методов началось именно с жидкостной хроматографии.

В приложении к биологии и медицине, существует отдельная отрасль жидкостной хроматографии, получившая название биомедицинская ВЭЖХ. Объектами ее исследований являются

анализ эндогенных веществ и лекарственных препаратов в биологических жидкостях (кровь, моча, слюна). Большинство исследований в клинической биохимии и клинической фармакокинетике (терапевтический лекарственный мониторинг), успешно реализуется именно с помощью биомедицинской ВЭЖХ.

Развитие биомедицинской ВЭЖХ в Забайкалье началось в 1991 году, когда на базе Областного Диагностического Центра была открыта лаборатория клинической фармакокинетики при моем непосредственном участии. Позднее, в 2003 году, при непосредственной инициативе и поддержке проф. Хышиктуева Б. С. и проф. Цыбикова Н. Н., была организована лаборатория хроматографии при Читинской Медицинской Академии. Полноценная работа лаборатории насчитывает к настоящему времени менее 3-х лет, когда удалось закупить необходимые расходные материалы и вспомогательное оборудование.

Деятельность лаборатории хроматографии многоплановая, а начиналось все с разработки метода анализа неоптерина в биологических жидкостях (идея принадлежит П. Б. Цыдендамбаеву). Это весьма интересное соединение, которое претендует на роль маркера иммунного статуса и может быть потенциальным онкомаркером. Здесь необходимо сделать небольшое пояснительное отступление. Плазму/сыворотку или мочу непосредственно в хроматограф не введешь, поскольку высокомолекулярные соединения необратимо повредят основной компонент - хроматографи-

¹ Речь пойдет о наиболее прогрессивном варианте - высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ или HPLC в английской транскрипции).

ческую колонку. Потому перед анализом из биологической жидкости извлекают интересующие соединения с помощью растворителей (жидкостная экстракция) или с использованием специальных сорбентов (твердофазная экстракция). По способности растворяться в воде, все химические вещества условно можно разделить на хорошо и плохо растворимые (полярные и неполярные, соответственно). С анализом неполярных соединений особых проблем не возникает, они хорошо экстрагируются в органические растворители и хорошо "салятся" на сорбенты. Однако, полярные соединения, к которым относятся и неоптерин, плохо экстрагируются органическими растворителями и плохо "салятся" на традиционные сорбенты. Дело осложнялось тем, что в крови неоптерин содержится в очень низких концентрациях порядка 5 нг/мл. Потому требовалась разработка простой и эффективной аналитической технологии. В итоге это удалось, но только с помощью уникального отечественного сорбента на основе сверхсшитого полистирола (Purosep-200), разработанного коллективом авторов под руководством проф. Даванкова В. А. [1] в Институте Элементоорганических Соединений РАН (Москва). В итоге все кончилось хорошо, аналитическая технология была разработана и опубликована [2], а один из сотрудников (Ринчинов З. Ц.) успешно защитил кандидатскую диссертацию.

Сорбент настолько всем понравился, что мы решили все разработанные ранее аналитические технологии улучшить именно с помощью сверхсшитого полистирола и адаптировать их для рутинного клинического применения. А также разработать новые. Приведу несколько примеров.

В настоящее время не существует надежных методов оценки детоксикационной функции печени. Между тем, это представляется весьма важным, например, для оценки прогноза при циррозах и гепатитах или при определении критических сроков в трансплантационной гепатологии. В разное время были предложены тесты с модельными лекарствами - антипирином и пропранололом (анаприлин). Суть в следующем: по скорости исчезновения лекарственных препаратов из крови или слюны, можно судить о детоксикационной функции печени. Чем быстрее препарат исчезает из биологических жидкостей, тем лучше работает печень (все лекарственные препараты метаболизируются в печени). Однако однозначной оценки эффективности этих тестов нет. В этой связи мы для начала решили разрабо-

тать аналитические неинвазивные ВЭЖХ-технологии определения этих препаратов в слюне, а уже затем оценить клиническую значимость указанных тестов. В итоге аналитические технологии были разработаны [3], клиническая оценка проведена [4], а кандидатская диссертация блестяще защищена (Пруткина Е.В.).

Анализ серосодержащих аминокислот в биологических жидкостях и, в первую очередь, гомоцистеина, представляется весьма важной клинической проблемой. Установлено, что гипергомоцистеинемия повышает риск раннего развития атеросклероза, тромбоза коронарных и церебральных сосудов, а также является прогностическим маркером летального исхода [5]. Существующие аналитические технологии сложны и затратны, как по времени, так и по финансам. Поскольку мы находились в ограниченном аппаратном и финансовом обеспечении, нам ничего не оставалось, как разработать простую и надежную аналитическую технологию. Здесь опять необходимо сделать небольшое пояснение. Тиолы, включая гомоцистеин, цистеин и глутатион, прозрачны для УФ лучей и потому не улавливаются хроматографической аппаратурой. Это, кстати, касается и других аминокислот, иминокислот (пролин и гидроксипролин) и кетокислот (аминолевулиновая кислота). Поэтому перед анализом их надо превратить в соединения, интенсивно поглощающие УФ лучи (хромофоры) или флюоресцирующие соединения (люминофоры). Это достигается с помощью химических веществ, которые называются дериватизационные реагенты, а сам раздел именуется как "Химические дериватизационные реакции в ВЭЖХ". Это очень перспективное направление, поскольку позволяет резко повысить не только чувствительность определения (в сотни и тысячи раз), но и его селективность (избирательность). К примеру, существуют специфические реагенты реагирующие избирательно с амино-, гидрокси-, карбоксильными или сульфгидрильными группами. Однако у дериватизационных реакций есть и весьма существенный недостаток - они протекают эффективно только при избытке дериватизационного реагента. Удалить или нейтрализовать его удастся далеко не всегда, а хроматографическому анализу он сильно мешает. И тем не менее, это оказалось возможным с помощью все того же сверхсшитого полистирола. В результате получили пробы высокой степени чистоты, причем, настолько чистые, что некоторые коллеги-хроматографисты отказывались верить. Результаты опублико-

ваны [6] и подготовлена к защите диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук (Никитин ДА, кафедра химии Читинского Государственного Университета). Направление, посвященное клинической значимости тиолов, возглавляет проф. Цыбиков НН, под руководством которого успешно защищена кандидатская диссертация (Цыбикова Е). Планируется одна докторская (Тихоненко ОА) и кандидатская диссертация, касающаяся клинической оценки нагрузочного теста с метионином при явной и скрытой гипергомоцистеинемии.

Стараясь не отставать от зарубежных коллег, а кое в чем даже опережая их, приобретена хроматографическая колонка с уникальным сорбентом Chromolith (Merck, Германия). Этими колонками мало кто пользуется в мире, а зря. Немецким исследователям удалось "вырастить" монокристаллический сорбент прямо в колонке. Благодаря такой структуре он оказывает минимальное сопротивление потоку жидкости, что позволило увеличить скорость анализа в 3 - 5 раз. Только благодаря такой колонке удалось заново разработать уникальную технологию анализа метаболитов катехоламинов и серотонина в моче. При этом скорость анализа сократилась с 30 мин до 8 мин, а при моноанализе на ваниллилминдальную кислоту (маркер хромоафиномы и нейроblastомы) процесс занимает не более 4 мин.

Ранее мы случайно разработали метод определения шести аминокислот в плазме/сыворотке для диагностики фенилкетонурии и болезни кленового сиропа - наиболее часто встречающихся врожденных патологий обмена аминокислот. Однако реализовать не могли из-за огромного давления в хроматографической системе и значительной продолжительности анализа (около 40 мин). На колонке Chromolith, разделение этих аминокислот (триптофан, метионин, валин, фенилаланин, лейцин и изолейцин) занимает чуть больше 8 мин. Подготовлена публикация [7].

Заново создан метод определения дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-сульфат) в биологических жидкостях. Разработан метод очистки производных ДГЭА-сульфата на сверхсшитом полистироле, что позволило получить чистые экстракты, а технология может быть легко адаптирована к очистке не только ДГЭА-сульфата, но и остальных стероидов.

Весьма перспективным представляется разработка метода анализа 6-гидрокортизола, который может претендовать на роль специфического маркера болезни Кушинга.

Разработан метод определения мелатонина и 6-гидроксимелатонина в моче, который может оказаться полезным для установления патофизиологических механизмов депрессий, аффективных расстройств, судорожных состояний и синдрома двигательной гиперактивности. Имеются сведения, что уровень мелатонина - маркер продолжительности жизни: чем он выше, тем дольше живут. Планируется серия исследований совместно с кафедрой неврологии и Областной Детской Клинической Больницей (Ширшов ЮА, Пляскина ЕВ, Гольтваница ГА).

Создан метод анализа иминокислот (пролин и гидроксипролин) в биологических жидкостях (маркеры повреждений соединительной ткани).

Перспективной представляется разработка ВЭЖХ-анализа метилированных аминокислот как потенциальных ингибиторов NO-синтетазы и лабораторных маркеров сосудистых катастроф. Для оценки риска мозговых сосудистых катастроф, по-видимому, будет предпочтительней анализ указанных соединений в цереброспинальной жидкости.

Совсем недавно разработан метод анализа алифатических аминов (путресцин и кадаверин) в слюне, что поможет расшифровке патофизиологических механизмов галитоза (неприятный запах изо рта) и других стоматологических заболеваний. Запланирована кандидатская диссертация (Мищенко МН).

Наши разработки признаны на Федеральном и Международном уровнях - авторы являются постоянными участниками ежегодных Международных конференций по хроматографии и смежным наукам, ежегодно проводимых в Москве. Имеются тесные научные контакты и осуществляются совместные разработки с Институтом Физической Химии РАН (проф. О. Г. Ларионов) и Институтом Элементоорганических соединений им. Акад. Несмеянова РАН (проф. В.А. Даванков). На региональном уровне тесное сотрудничество осуществляется с кафедрой химии Читинского Госуниверситета (проф. К.И. Карасев, проф. Летунов В.И., асс. Никитин Д.А.).

Перспективные планы:

- Постоянная разработка новых "продвинутых" аналитических ВЭЖХ-технологий для практической медицины и экологии с использованием уникального сорбента - сверхсшитого полистирола - не имеющего зарубежных аналогов и по всем показателям значительно превосходящего имеющиеся на рынке импортные сорбенты (сорбент создан коллективом иссле-

дователей под руководством проф. Даванкова В.А., ИНЭОС РАН, Москва и производится в Англии фирмой Purolite Inc по лицензии).

- По возможности, разработать новые сферы применения сорбента в практической медицине, например, в почечном гемодиализе взамен дорогих и "одноразовых" импортных сорбентов. Другая сфера применения - детоксикация при отравлениях (наркотики, алкоголь, яды, лекарственные препараты) - сорбент обладает уникальной способностью сорбировать низкомолекулярные соединения, независимо от их способности растворяться или не растворяться в воде (полярные и неполярные соединения).
- Создание межрегиональной школы-семинара по подготовке специалистов в области биомедицинской ВЭЖХ (клинические фармакологи, врачи клинической лабораторной диагностики, судебные химики и криминалисты, сотрудники центров санэпиднадзора и др.). Имеется 3-х летний опыт преподавания практической аналитической ВЭЖХ на кафедре химии Читинского Госуниверситета (Дутов А.А. и Никитин Д.А.).
- Постоянная методическая и техническая помощь в подготовке кандидатов и докторов наук (медицинских и химических), создание условий для проверки новых научных идей и амбициозных проектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даванков ВА, Цюрупа МП, Пастухов АВ, Маслова ЛА, Ильин ММ, Павлова ЛА, Андреева АИ, Тарабаева ОГ. Сверхсшитый полистирол: чужой среди своих. "Природа", 1997, N 10, с. 51-54.
2. Dutov AA, Nikitin DA, Rinchinov ZTs, Tereshkov PP, Tsydendambaev PB and Fedotova AA. HPLC Determination of Neopterin in Biological Liquids for Clinical Purposes. "Russian Journal of Physical Chemistry A", 2007, v. 81, No. 3, pp. 421-423.
3. Дутов АА, Никитин ДА, Биктимеров РР, Жамбалов ДБ, Пруткина ЕВ, Федотова АА. Универсальный экстракционный протокол для последующего ВЭЖХ анализа бета-адреноблокаторов в биологических жидкостях. Всероссийский симпозиум "Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях" (Тезисы), 2007, с 169.
4. Пруткина ЕВ, Дутов АА, Цыбиков НН. Возможности анаприлинового теста как метода оценки детоксикационной функции печени. "Сибирский Медицинский Журнал", 2007, № 3, с. 44-47.
5. Шевченко ОП, Олефиренко ГА. Гипергомоцистеинемия и ее клиническое значение. "Лаборатория", 2002, № 1, с.3-6.
6. Дутов АА, Никитин ДА, Федотова АА. ВЭЖХ анализ тиолов в биологических жидкостях с твердофазной экстракцией на полимерном сорбенте. Всероссийский симпозиум "Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях" (Тезисы), 2007, с 170.
7. Дутов АА, Никитин ДА, Титова ЮЛ, Бельникова ЕВ и Гатиятов ЮФ. Простой и чувствительный ВЭЖХ метод для диагностики и мониторинга фенилкетонурии и кетоацидурии. "Клиническая лабораторная диагностика", 2008 (в печати).