

УДК: 616.155.194.8+616.155.194.51-07:616.  
154:577.164.16-074

Черноброва О.І.<sup>1</sup>,  
Видиборець С.В.<sup>2</sup>, Ільченко О.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Вінницький національний медичний  
університет ім. М.І. Пирогова

<sup>2</sup>Національна медична академія  
післядипломної освіти

ім. П.Л. Шупика

<sup>3</sup>Інститут хімії поверхні НАН  
України

**Ключові слова:** метилмалонова  
кислота, сеча, спектро-фотомет-  
ричний метод, комбінована  
залізо- та  
В<sub>12</sub>-дефіцитна анемія.

## ВСТУП

Значне розповсюдження кобаламінового дефіциту з розвитком мегалобластозу й нейропатії, особливо у осіб похилого та старечого віку, диктує необхідність широкого застосування біохімічних тестів для визначення забезпеченості організму вітаміном В<sub>12</sub>. Дослідження останніх років доводять, що рівень кобаламіну в біологічних рідинах не завжди відображає його дефіцит, адже недостатність вітаміну В<sub>12</sub> може супроводжуватись його нормальними рівнями в сироватці і еритроцитах, так 50% хворих з В<sub>12</sub>-дефіцитом мали рівень вітаміну В<sub>12</sub> в сироватці вище 200 пг/л [11]. До того ж дефіцит фолієвої кислоти може хибно занижувати рівень сироваткового кобаламіну, адже С.Ф. Snow [15] виявив у 1/3 хворих з фолієводефіцитом рівень вітаміну В<sub>12</sub> в сироватці нижче 100 пг/л. Враховуючи високу спорідненість вітаміну до тироксину, загальна та несатурована кобаламінзв'язуюча здатність сироватки мають обмежену діагностичну значимість [16]. Такі релевантні тести, як голо- та апо-гаптокорін і транс-кобаламін II є високовартісними, що унеможливило їх широке використання в лікарській практиці [7, 16]. Радіоактивний тест Шилінга інформативний лише при відсутності внутрішнього фактору Кастла, як однієї з причин В<sub>12</sub>-дефіциту. Завдяки метаболічній блокаді гомоцистеїн-метіонінметилтрансферази, дефіцит кобаламіну супроводжується різким зростанням концентрації загального гомоцистеїну в плазмі. Проте слід зауважити, що гіпергомоцистеїнемія

## МЕТИЛМАЛОНОВА ГІПЕРАЦИДУРІЯ ЯК БІОХІМІЧНИЙ КРИТЕРІЙ КОБАЛАМІНОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ХВОРИХ КОМБІНОВАНОЮ ЗАЛІЗО- ТА ВІТАМІН В<sub>12</sub>-ДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ (КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

**Резюме.** Представлено модифікований спектрофотометричний метод визначення метилмалонової кислоти (ММА) в сечі, що полягає в пропусканні 1 мл сечі крізь іонообмінну колонку з сильноосновною смолою DOWEX 1X4 з подальшим елююванням ММА 2 М розчином NaCl, очищенням елюату активованим вугіллям та проведенням кольорової діазореакції. Встановлено особливості порушень сечової екскреції ММА при різних видах дефіцитних анемії: *uMMA/uCrea ratio* склав  $172,16 \pm 26,82$  мг/г,  $455,65 \pm 145,02$  мг/г,  $10,89 \pm 0,74$  мг/г та  $8,8 \pm 0,87$  мг/г при ЗДА+В<sub>12</sub>ДА, ВІІДА, ЗДА та у осіб контрольної групи відповідно. Екскреція ММА з сечею при ЗДА+В<sub>12</sub>ДА обернено корелює з RBC, Hb, Hb. Відсутність кореляційних зв'язків між: *uMMA/uCrea ratio* та tHcy, serum Per, NSI, еритроцитарними індексами у цієї категорії пацієнтів свідчить, що супутній дефіцит заліза здатен нівелювати характерні ознаки кобаламінового дефіциту. Запропоновано метод корекції мети/шалонової гіперацидурії при ЗДА+В<sub>12</sub>ДА з застосуванням сульфату заліза і вітаміну В<sub>12</sub> в стандартних дозах з додаванням оротату калію.

спостерігається за різних умов, в. т. ч. при дефіциті фолієвої кислоти, претромботичних та тромботичних станах, нирковій недостатності тощо [1].

Вітамін В<sub>12</sub> у формі 5-дезоксиаденозилкобаламіну є коферментом мітохондріальної метилмалоніл-СоА мутази, що каталізує перетворення L-метилмалоніл-СоА в сукциніл-СоА в процесі зміни пропіонової на бурштинову кислоту. Шляхом блокади вищевказаної реакції, кобаламіновий дефіцит викликає накопичення в клітині L-метилмалоніл-СоА, далі – ізомеризації і збільшення D-метилмалоніл-СоА за участі ферменту метилмалоніл-СоА рацемази. Завдяки ферменту гідролазі D-метилмалоніл-СоА перетворюється на метилмалонову кислоту (methylmalonic acid – ММА) (рис. 1). У здорових осіб 70% ММА метаболізується до невідомих продуктів і лише біля 30% ММА екскретується з сечею [3]. За умови дефіциту вітаміну В<sub>12</sub> в плазмі накопичується ММА, різко збільшується сечова екскреція ММА.

Сучасна діагностика базується на визначенні ММА в сироватці крові, що розглядається раннім чутливим біохімічним маркером тканинного дефіциту вітаміну В<sub>12</sub> [9], її зростання передуює гематологічній маніфестації. Використовуючи комбінацію клінічних та лабораторних, біохімічних критеріїв, було доведено, що всі хворі, які відповіли на терапію вітаміном В<sub>12</sub> мали підвищений рівень ММА, тоді як нормальний рівень цього показника виключав клінічні прояви В<sub>12</sub>ДА [12]. Однак ниркова не-



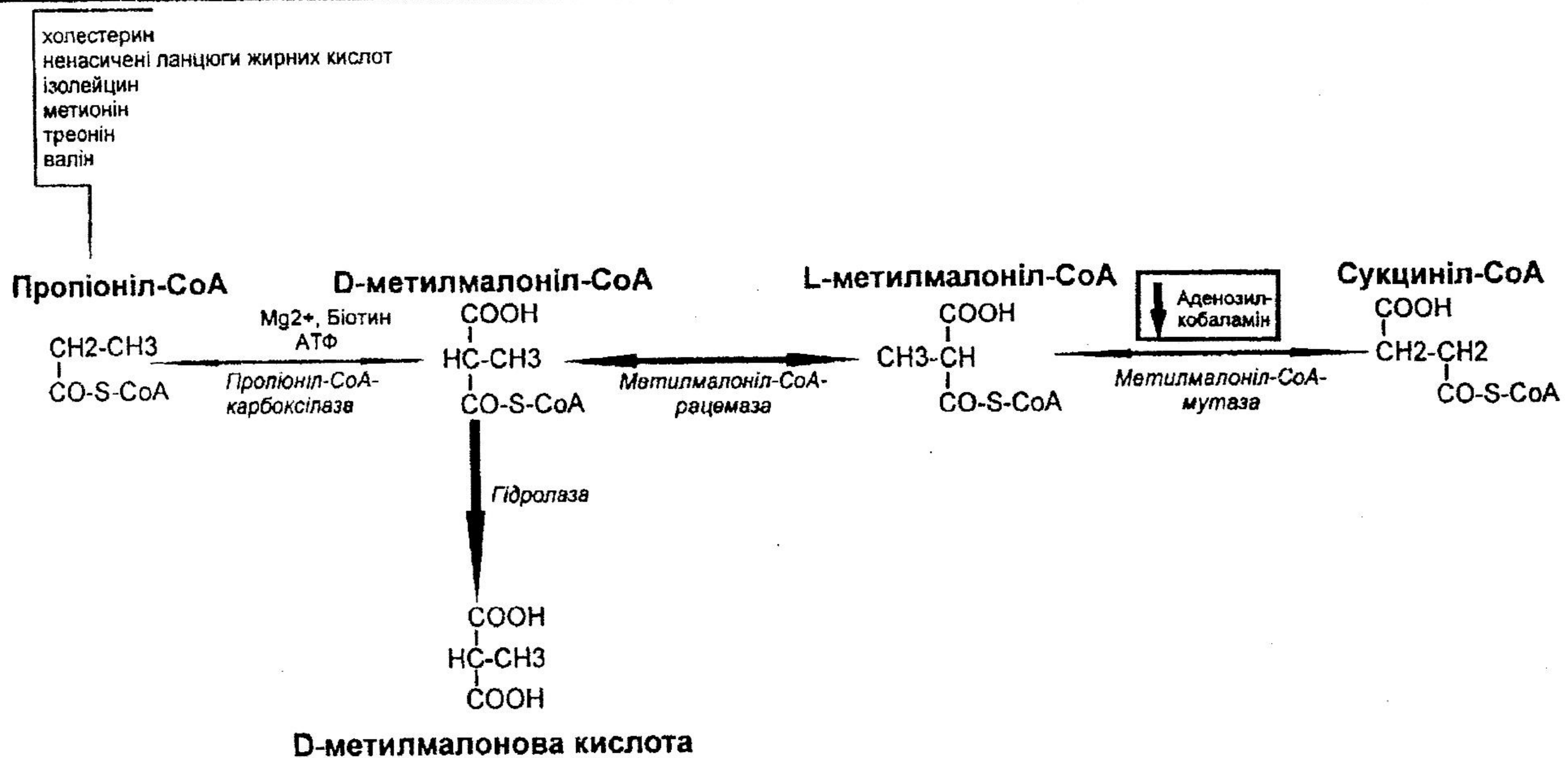


Рис. 1. Мітохондріальний пропіоніл-сукцинатний шлях циклу Кребса: елевація MMA за умови дефіциту вітаміну  $V_{12}$

достатність, зниження об'єму циркулюючої крові тощо можуть спричинювати елевацію сироваткової MMA [6]. Тому дослідники наполягають на визначенні сечової екскреції MMA (urinary MMA – иMMA), вміст якої в сечі в 40 разів вище за вміст в сироватці, встановлюючи її концентрацію в добовій сечі [4] чи співставляючи иMMA з концентрацією ендogenous креатиніну в сечі [5, 10]. Найсучасніші методи визначення MMA, що базуються на газовій хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням, є високовартісними і вимагають наявності відповідного обладнання [8], а традиційні методи тонкошарової хроматографії [14] є занадто працевіткими і повільними. Спектрофотометрія ж займає проміжну позицію, дозволяючи проводити відповідні вимірювання достатньо швидко і дешево [5, 14].

Мета дослідження – модифікація спектрофотометричного методу визначення MMA в сечі і встановлення особливостей порушень сечової екскреції MMA та їх корекція у хворих комбінованою залізо- та вітаміну  $V_{12}$  дефіцитною анемією (ЗДА+ $V_{12}$ ДА) у співставленні з даними хворих ізольованою залізодефіцитною (ЗДА) та  $V_{12}$  дефіцитною анеміями ( $V_{12}$ ДА).

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### Характеристика об'єктів обстеження

Для виконання обраної мети обстежено 103 хворих дефіцитним анеміями віком від 16 до 83 років, що знаходились на стаціонарному лікуванні в гематологічному відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М.І. Пирогова або перебували на диспансерному обліку і амбулаторному лікуванні в Вінницькій міській поліклініці № 2. Серед них 42

хворих ЗДА+  $V_{12}$ ДА – основна група. 47 хворих ЗДА та 14 хворих  $V_{12}$ ДА увійшли до двох груп порівняння. Відібрані групи пацієнтів були репрезентативні за віком, статтю та ступенем тяжкості анемії (табл. 1).

При призначенні замісної терапії хворі ЗДА+ $V_{12}$ ДА були довільно поділені на 2 групи: 1 підгрупа отримувала базисну комбіновану терапію сульфатом заліза з розрахунку на елементарне залізо 2 мг/кг/добу протягом 12 тижнів разом з вітаміном  $V_{12}$  протягом 40 днів; пацієнти 2 підгрупи окрім базисного лікування додатково вживали регос оротат калію в дозі 1,5 г/добу впродовж перших 30 днів лікування.

Контрольну групу склали 13 практично здорових осіб (6 чоловіків (46,15%) та 7 жінок (53,85%)) віком від 16 до 83 років (середній вік  $41,85 \pm 6,06$  років), стан здоров'я яких оцінювався на основі комплексу діагностичних досліджень, що включав лабораторні тести, анамнестичні та клінічні дані.

### Процедура аналізу

1 мл сечі, з величиною рН попередньо доведеної до 6,5, пропускався крізь іонообмінну колонку ( $d = 6$  мм), до якої було вміщено 600 мг сильноосновної аніонообмінної смоли DOWEX® 1x4, CF form strongly basic (SIGMA-ALDRICH) з розміром гранул 50–100 mesh. Висота шару смоли складала 25–30 мм. Після пропускання сечі через колонку смола промивалась 30 мл дистильованої води. Далі сорбована на смолі MMA елюювалась 10 мл 2 М розчину хлориду натрію (NaCl). До елюату додавали 375 мг активованого вугілля (подрібнений фармакопейний препарат, розмір частинок менше 1 мм), одержану суспензію перемішували протягом 10 хв., після чого активоване вугілля відокремлювалося центрифугуванням при 1500 об/хв впродовж 30 хвилин.



Таблиця 1  
Розподіл хворих дефіцитними анеміями по віку, статі та ступеню тяжкості анемії

Характеристика		ЗДА+В <sub>12</sub> ДД (n=42)	ЗДА (n=47)	В <sub>12</sub> ДД
Середній вік, років	M±m (min-max)	55,67±2,19 (27-83)	41,87±2,42 (16-80)	55,71±4,42 (25-76)
Стать	чоловіки	абс.	10	8
		%	23,81	21,28
	жінки	абс.	32	37
		%	76,19	78,72
Ступінь тяжкості анемії	легка	Абс.	8	12
		%	19,04	25,53
	середня	Абс.	15	13
		%	35,71	27,66
	тяжка	Абс.	19	22
		%	45,25	46,81

Готували діазореагент додаванням 8 мл 0,5% розчину нітриту натрію (NaNO<sub>2</sub>) до 30 мл 5,4 мМ розчину пара-нітроаніліну (75 мг пара-нітроаніліну на 100 мл 0,2 М соляної кислоти (HCl)). Після витримання при кімнатній температурі протягом 15 хв., суміш охолоджувалась на льоду до 2-6 °С, далі до неї додавали 8 мл 0,2 М розчину ацетату натрію.

Стандартні розчини готували розведенням навжки MMA (Methylmalonic acid, 99%, SIGMA) у 2 М розчині хлориду натрію (NaCl) до концентрації 0,5 мг/мл з подальшим розведенням 2 М розчином хлориду натрію (NaCl) до концентрацій 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 мг/мл. 1 мл елюату або стандартного розчину перемішували з 1,5 мл 1 М ацетатного буфера рН=4,3. Далі до суміші додавали 1,5 мл холодного діазореагенту, пробірку закорковували для запобігання контакту з вуглекислотою (CO<sub>2</sub>) атмосферного повітря, ретельно перемішували і поміщали до водяної бані на 30 хв. при 37 °С. Потім до суміші додавали 1 мл 3 М розчину гідроксиду натрію (NaOH), вільного від карбонатів. Після додаткової інкубації при 37 °С протягом 30 хв. вимірювали оптичну густину розчину (MMA з діазотованим пара-нітроаналіном в лужному середовищі спричинює ізумрудно-зелений колір) на спектрофотометрі ЛОМО-26 при довжині хвилі світла 620 нм в кюветі товщиною 10 мм відносно контролю на реактиви (1 мл дистильованої води, який було оброблено за аналогічною методикою).

На основі визначень оптичної густини стандартних розчинів будували калібрувальний графік, за яким визначали концентрації MMA в дослідних розчинах, враховуючи розведення в ході аналізу (з 1 мл сечі утворюється 10 мл елюату). Метод дозволяє виміряти концентрацію MMA в сечі від 3 мкг/мл та вище.

Вміст креатиніну в сечі (uCrea) визначали за реакцією з пікриновою кислотою у лужному середовищі з використанням стандартного набору ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна). Далі знаходили співвідношення MMA до відповідних концентрацій креатиніну (uMMA/uCrea ratio) в кожному зразку сечі. Визначення екскреції uMMA проводили до лікування в момент верифікації діагнозу та на 40 добу лікування. uMMA/uCrea ratio нижче ніж 20 мг/г розглядали як ознаку оптимального забезпечення організму вітаміном В<sub>12</sub>, в межах 20–25 мг/г – як ознаку субнормального статусу, а понад 25 мг/г – як дефіцит вітаміну В<sub>12</sub> [2].

#### Лабораторні тести

У всіх обстежених уніфікованими методами визначались показники периферичної гемограми (гемоглобін (Hb), кількість еритроцитів (RBC), гематокрит (Ht) тощо), розрахунковим методом – еритроцитарні індекси (середній об'єм еритроциту (MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH)). При світловій мікроскопії мазку периферичної крові, забарвленому за Романовським-Гімзе, визначали індекс сегментації нейтрофілів (NSI) за методом Bills et Spatz (1977) (референс-інтервал 2,5–25%) [13].

ЗДА діагностувалась на основі зниження рівню феритину, що визначався в сироватці (serum Per) методом твердофазного імуноферментного аналізу ELISA з використанням сертифікованої стандартної тест-системи фірми Diagnostic Automation Inc (USA); а В В<sub>12</sub>ДА – на основі одночасної елевації загального гомоцистеїну плазми (tHcy), що досліджувався методом імуноферментного аналізу з використанням стандартизованої тест-системи фірми Axis-Shield Diagnostic Ltd. (United Kingdom), та uMMA, а також підтвердженого мегалобластичного типу кровотворення при аспіраційній біопсії кісткового мозку. За умови поєднання вказаних критеріїв діагностували ЗДА+ В<sub>12</sub>ДА.

Статистичну обробку отриманих даних проводили на персональному комп'ютері «Pentium 4» з використанням стандартних програмних пакетів «Biostatistics» version 4,03 та «STATISTICA» version 5,5a (фірми Statsoft Inc., USA) для Windows XP. За величинами ексцесу та асиметрії визначали характер розподілу отриманих даних, використовували методи варіаційної статистики і кореляційний аналіз. Для оцінки достовірності різниці в статистичних групах (незалежні вибірки) використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (Mann-Whitney), а для оцінки достовірності різниці в динаміці лікування (двох пов'язаних сукупностей) використовували непараметричний критерій Вілкоксона (Wilcoxon).



## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За основу було прийнято колориметричний метод визначення  $\mu\text{MMA}$ , вперше запропонований A.J. Giorgio та G.W. Plaut [5] і модифікований в подальшому M. Gultere зі співавторами [6]. Різниця нашого методу від запропонованих раніше полягає у різних підходах до усунення заважаючого впливу деяких органічних речовин (ацетооцтова кислота, сечова кислота, креатинін, аскорбат та ін.), які містяться у сечі. Ці речовини переносяться з сечі на іонообмінній смолі разом з  $\text{MMA}$  і аналогічно  $\text{MMA}$  реагують з діазотованим пара-нітроаніліном, спричинюючи інтенсивно буру кольорову реакцію, що перешкоджає подальшому визначенню  $\text{MMA}$  [5, 14]. Залежність оптичної густини розчину продуктів взаємодії цих сполук з діазореагентом від довжини світла наближається до лінійної (але не є лінійною). Вважаючи цю залежність лінійною, M. Gultere зі співавт. [5] запропонували математичний вираз, за допомогою якого відокремлюється частина оптичної густини, яка відповідає за поглинання світла саме продуктами реакції з  $\text{MMA}$ . За умов визначення, оптична густина розчину перевищує величини 0,2 – 0,4, тобто знаходиться в тій ділянці значень, де зростає відносна похибка визначення. Цю похибку в деякій мірі автори компенсували застосуванням високочутливого цифрового спектрофотометра.

Однак існує і інша складова помилки визначення, яка полягає в певній нелінійності залежності оптичної густини розчину продуктів взаємодії речовин, що перешкоджають визначенню, з діазореактивом на ділянці від 570 нм до 670 нм. Урахування цієї складової є досить важкою задачею, оскільки будь-який зразок сечі є індивідуальним за своїм складом. Тому ми дещо змінили саму методику аналізу, видаляючи ті компоненти сечі, які заважають визначенню.

Однак існує і інша складова помилки визначення, яка полягає в певній нелінійності залежності оптичної густини розчину продуктів взаємодії речовин, що перешкоджають визначенню, з діазореактивом на ділянці від 570 нм до 670 нм. Урахування цієї складової є досить важкою задачею, оскільки будь-який зразок сечі є індивідуальним за своїм складом. Тому ми дещо змінили саму методику аналізу, видаляючи ті компоненти сечі, які заважають визначенню.

При модифікуванні методу ми вирішили:

– замінити елюент з 0,1 М розчину хлориду водню ( $\text{HCl}$ ), як це запропоновано [5], на 2 М розчин хлориду натрію ( $\text{NaCl}$ ). Виявлено, що при цьому кількість  $\text{MMA}$ , яка визначається, не зменшується і складає 97–99% від доданої;

– ввести обробку елюату активованим вугіллям, що призводить до повної адсорбції на вугіллі заважаючи домішок з сечі. Причому, як з'ясувалось за умов визначення,  $\text{MMA}$  на вугіллі практично не сорбується, що збігається з даними Л.В. Снегиревой і Л.Я. Арешкиной [14]; 3. вимірювати оптичну густину фінального розчину відносно контролю на реактиви.

Залежність оптичної густини ( $D$ ) фінального розчину від концентрації  $\text{MMA}$  ( $C$ ) добре описується рівнянням типу:

$$D = \frac{D_{\max} \cdot k \cdot C}{1 + k \cdot C}$$

Вище вказана залежність в обернених координатах  $\frac{1}{D} = f\left(\frac{1}{C}\right)$  являє собою пряму лінію, що значно полегшує математичну обробку експериментальних даних.

Слід зауважити, що хімічні реакції, які відбуваються в ході визначення  $\text{MMA}$ , є чутливими до зовнішніх факторів, зокрема температури в приміщенні. Міжсерійні коливання можуть складати до 20% в обидві боки від певних середніх значень. Саме тому важливим і обов'язковим є відтворення градуировочної шкали при кожній серії визначень.

При вивченні особливостей порушень сечової екскреції  $\text{MMA}$ , доведено за величинами ексцесу та асиметрії, що розподіл одержаних величин не відповідає нормальному закону, отже отримані в кожній з сукупностей дані є непараметричними. За критерієм Мана–Уїтні було встановлено істотні відмінності між помірно високою сечовою екскрецією  $\text{MMA}$  ( $\mu\text{MMA}$ ,  $\mu\text{MMA}/\mu\text{Crea}$  ratio) у хворих ЗДА+ $\text{V}_{12}$ ДА та нормальною її величиною у здорових осіб ( $\mu\text{MMA}/\mu\text{Crea}$  ratio в 19,56 разів вище при ЗДА+ $\text{V}_{12}$ ДА порівняно з контролем) та хворих ЗДА ( $\mu\text{MMA}/\mu\text{Crea}$  ratio в 15,81 раз вище при ЗДА+ $\text{V}_{12}$ ДА порівняно з ЗДА) (табл. 2). При приєднанні залізодефіциту до кобаламінового дефіциту закономірно можна припустити більш тяжкий перебіг такої комбінованої дефіцитної анемії, ніж ізольованої, адже і дефіцит заліза, і дефіцит вітаміну  $\text{V}_{12}$ , хоча й за різними механізмами, але пригнічують одну мішень – еритроїдний паросток, що повинно призводити до поглиблення всіх біохімічних порушень, в. т. ч. посилення явища метилмалонової ацидурії. Проте нами встановлено достовірно більш низький рівень  $\mu\text{MMA}$ ,  $\mu\text{MMA}/\mu\text{Crea}$  ratio у хворих ЗДА+ $\text{V}_{12}$ ДА порівняно з різко збільшеними рівнями цих показників у хворих ізольованою  $\text{V}_{12}$ ДА ( $\mu\text{MMA}/\mu\text{Crea}$  ratio в 5,62 разів менше при ЗДА+ $\text{V}_{12}$ ДА порівняно з  $\text{V}_{12}$ ДА). Отримані дані можна пояснити лише тим, що дефіцит заліза у хворих ЗДА+ $\text{V}_{12}$ ДА здатен маскувати всі, в. т. ч. біохімічні, ознаки дефіциту вітаміну  $\text{V}_{12}$ .



**Екскреція ММА з сечею в динаміці лікування у хворих ЗДА+В<sub>12</sub>ДА, В<sub>12</sub>ДА, ЗДА та осіб контрольної групи (M±m (min-max))**

Групи обстежених		uMMA (мг/л)	uCrea (г/л)	uMMA/uCrea ratio (мг/г)	
ЗДА+В <sub>12</sub> ДА	(n=42)	114,45±8,19*,**,* (43,93-328,51)	0,99±0,09*** (0,06-3,22)	172,16±26,82*,**,* (40,18-872,32)	
	В динаміці	2 підгрупа (n=11): до лікування	162,58±22,23 (91,43-328,51)	1,12±0,26 (0,11-3,22)	236,68±70,19 (77,37-872,32)
		на 40 добу терапії	24,24±2,26, (13,65-35,48) <sup>а,п</sup>	1,42±0,19 (0,79-3,03) <sup>а,п</sup>	19,71±2,82 (4,51-41,83) <sup>а,п</sup>
		1 підгрупа (n=10): до лікування	91,41±7,79 (55,01-126,19)	0,92±0,11 (0,43-1,43)	115,74±18,14 (47,73-227,78)
		на 40 добу терапії	51,83±5,15 (26,12-84,95) <sup>а</sup>	0,98±0,11 (0,57-1,73)	55,65±5,61 (28,94-83,59) <sup>а</sup>
В <sub>12</sub> ДА	(n=14)	286,19±96,12* (120,9-1522,89)	0,81±0,13 (0,22-1,93)	455,65±145,02* (104,95-2189,79)	
	в динаміці (n=8)	до лікування	376,15±165,01 (120,9-1522,89)	0,84±0,17 (0,41-1,93)	541,4±241,91 (104,95-2189,79)
		на 40 добу терапії	19,64±3,33 (7,38-37,94) <sup>а</sup>	1,05±0,11 (0,46-1,4)	20,67±4,07 (5,27-38,47) <sup>а</sup>
ЗДА (n=47)		15,08±0,91 (4,21-38,05)	1,55±0,1 (0,68-4,65)	10,89±0,74 (1,97-21,99)	
Контроль (n=13)		9,78±1,39 (3,29-18,47)	1,23±0,19 (0,29-2,45)	8,8±0,87 (3,34-12,69)	

достовірність різниці за критерієм Мана-Уїтлі (p<0,05) щодо: \* - контролю, \*\* - хворих В<sub>12</sub>ДА, \*\*\* - хворих ЗДА;

<sup>а</sup> достовірність різниці в динаміці лікування за критерієм Вілкоксона (p<0,05);

<sup>п</sup> достовірність різниці за критерієм Мана-Уїтлі (p<0,05) між хворими ЗДА+В<sub>12</sub>ДА 1 і 2 підгрупи на 40 добу терапії.

**Коефіцієнти кореляції між uMMA/uCrea ratio та показниками гемопоезу, tHcy та serum Fer**

Показники	ЗДА+В <sub>12</sub> ДА (n=42)	В <sub>12</sub> ДА (n=14)	ЗДА (n=47)	Контроль (n=13)
uMMA-tHcy	0,17	0,46	-0,08	0,05
uMMA-serum Fer	0,07	0,02	-0,14	-0,47
uMMA-RBC	-0,45*	0,38	0,29	-0,19
uMMA-Ht	-0,41*	0,28	0,29	-0,17
uMMA-Hb	-0,36*	0,21	0,29*	-0,24
uMMA-MCV	0,29	0,50	0,05	0,08
uMMA-MCH	0,19	0,32	0,20	-0,10
uMMA-NSI	0,18	0,42	-0,10	-0,15

достовірні коефіцієнти кореляції (p<0,05)

Додаткові докази вище наведеної гіпотези у хворих основної групи було отримано під час кореляційного аналізу (табл. 3). Виявилось, що у пацієнтів з ЗДА+В<sub>12</sub>ДА практично відсутні кореляційні зв'язки tHcy, serum Fer, NSI, еритроцитарних індексів з uMMA/uCrea ratio. Винятком є наявність достовірного помірної сили оберненого кореляційного зв'язку метилмалонової ацидурії з такими показниками гемопоезу, як RBC, Ht та Hb, адже чим глибший кобаламіновий дефіцит, тим тяжчий ступінь анемічного синдрому. Нами не отримано достовірної кореляції між uMMA та tHcy при ЗДА+В<sub>12</sub>ДА, що суперечить даним авторів, які вивчали обмін вітаміну В<sub>12</sub> при психічних розладах [5] та ювенільному ревматоїдному артриті з анемічним синдромом [2].

**Таблиця 2** Однак в попередніх дослідженнях у патогенезі вище названих патологій поряд з кобаламіновим дефіцитом суттєву роль відводять дефіциту фолієвої кислоти, рівень якої тісно корелює з tHcy.

В нашому експерименті дефіцит вітаміну В<sub>12</sub>, як один з факторів розвитку анемії, був виключений. За даними літератури, рівень сечової екскреції ММА прямопропорційно корелює з MCV [2, 5]. Відсутність кореляції uMMA з еритроцитарними індексами у пацієнтів з комбінованою дефіцитною анемією можна пояснити тим, що супутній дефіцит заліза з притаманним йому мікроцитозом і гіпохромією нівелює макроцитоз і гіперхромію при дефіциті вітаміну В<sub>12</sub>, адже таку анемію називають диморфною. Так у хворих ЗДА+В<sub>12</sub>ДА MCV склав 99,36±2,28 фл (нормоцитоз), а MCH – 26,57±1,26 пг/еритроцит (наближається до нормохромії).

Цей факт стосується й NSI, адже цей показник у пацієнтів з комбінованим дефіцитом був достовірно нижчим за пацієнтів з ізольованою В<sub>12</sub>ДА (77,43±8,82% та 159,7±25,58% відповідно).

Відомо, що ММА є токсичною речовиною, при накопиченні здатна інгібувати метаболізм жирних кислот з непарною кількістю атомів вуглецю із-за чого в мієлін вбудовуються аномальні жирні кислоти, викликаючи демієлінізацію нервових стовбурів з розвитком характерних неврологічних розладів (фунікулярний мієлоз, церебральні порушення, периферійна полінейропатія) при В<sub>12</sub>ДА. Так хвора Г. з ізольованою В<sub>12</sub>ДА була госпіталізована у відділення у вкрай тяжкому стані, самостійно не пересувалась. Було діагностовано повний нижній спастичний парапараліч з порушенням функції тазових органів. При обстеженні екскреція ММА з сечею була надзвичайно високою (uMMA склала 1522,89 мг/л, uMMA/uCrea ratio – 2189,79 мг/г), ми не знайшли в доступній літературі даних про такий значний рівень екскреції. Доведено, що чим вищий гематокрит при кобаламіновому дефіциті, тим тяжчі неврологічні прояви, що підтверджується в нашому дослідженні тенденцією до прямої кореляції між uMMA/uCrea ratio та Ht у хворих В<sub>12</sub>ДА. В тих випадках, коли кількість ММА в сечі перевищує 300 мг/л, потрібно повторно змішати елюат з ацетатним буфером і діазореактивом, проте замість 1 мл треба



взяти елюату в 10 разів менше і довести об'єм до 1 мл 2 М розчином хлориду натрію (NaCl), а при розрахунку концентрації враховувати розведення.

На нашу думку,  $uMMA/uCrea$  ratio можна розглядати як один з критеріїв ефективності лікування, так на 40 добу лікування рівень екскреції MMA достовірно знижувався у хворих ЗДА+ $V_{12}$ ДА 1 і 2 підгрупи та у хворих ізольованою  $V_{12}$ ДА (табл. 2). Відомо, що оротова кислота (урацил 4-карбонова кислота) є попередником піримідинових основ, в т. ч. урацилу, який входить до складу РНК - ключового компоненту в білковому синтезі. Отже завдяки своїм анаболічним властивостям, оротат калію сприяє зменшенню кількості вільних амінокислот (вони споживаються на синтез поліпептидів), в т. ч. таких незамінних, як ізолейцин, метіонін, треонін, валін, що здатні катаболізуватись до пропіоніл-СоА з подальшим перетворенням на D-метилмалоніл-СоА; вітамін  $V_{12}$  прискорює метаболізм L-метилмалоніл СоА (рис. 1). Означені факти стали теоретичним підґрунтям для розробки нами схеми корекції метилмалонітової гіперацидурії при ЗДА+ $V_{12}$ ДА. Встановлено, що у пацієнтів з комбінованою дефіцитною анемією, які додатково отримували окрім стандартної замісної терапії оротат калію (2 підгрупа), показник  $uMMA/uCrea$  ratio нормалізувався (зменшився на 91,67% від вихідного рівня) і достовірно відрізнявся від рівню сечової екскреції MMA (зменшився на 51,92%, проте не нормалізувався) у пацієнтів ЗДА+ $V_{12}$ ДА, які отримували лише базисну терапію дефіцитними факторами (1 підгрупа). У хворих ЗДА+ $V_{12}$ ДА 2 групи рівень екскреції MMA з сечею на 40 добу терапії в 3 рази менше знизився за хворих ізольованою  $V_{12}$ ДА, що вказує на торпідність відновлення метаболічних змін при ЗДА+ $V_{12}$ ДА.

M. Gultepe зі співавторами [5] вказують на наявність прямої тісної кореляції  $uMMA$  і концентрації вітаміну  $V_{12}$  в сироватці. Лише недостатність кобаламіну і спадкова метилмалонітова ацидурія, спричинена генетичним дефектом метилмалоніл-СоА мутази, здатні спричинювати зростання  $uMMA/uCrea$  ratio [10]. Отже елевация сечової екскреції MMA є специфічним індикатором тканинного дефіциту вітаміну  $V_{12}$ .

## ВИСНОВКИ

1. Запропоновано модифікований спектрофотометричний метод визначення MMA в сечі, що завдяки обробці елюату активованим вугіллям усуває вплив заважаючих субстанцій з сечі, які взаємодіють з діазореагентом в лужному середовищі, і робить його придатним до виконання на відносно чутливих спектрофотометрах.

2. У всіх хворих ЗДА+ $V_{12}$ ДА спостерігається помірно висока уринарна екскреція MMA, що досто-

вірно відрізняється від нормальної екскреції у хворих ЗДА і осіб контрольної групи та значно збільшеної екскреції у хворих  $V_{12}$ ДА.

2. Екскреція MMA з сечею при ЗДА+ $V_{12}$ ДА знаходиться у зворотньопрпорційній корелятивній залежності від змін RBC, Ht, Hb. Відсутність кореляційних зв'язків між  $uMMA/uCrea$  ratio та tHcy, serum Per, NSI, еритроцитарними індексами у цієї категорії пацієнтів свідчить, що супутній дефіцит заліза здатен нівелювати характерні ознаки кобаламінового дефіциту.

3. Включення оротату калію в дозі 1,5 г/добу протягом 4 тижнів до комбінованої замісної терапії ЗДА+ $V_{12}$ ДА забезпечує більш ефективне зниження (на 91,67%) на 40 добу інтенсивності метилмалонітової гіперацидурії проти 51,92% при стандартній комбінованій терапії дефіцитними факторами.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Carmel R., Green R., Rosenblatt D. S., Watkins D. Update on cobalamin, folate and homocysteine. *Hematology*, 2003; 2003(1): 62–81.
2. Дуднік В.М., Омельченко Л., Пендюк О.О. Патогенетична роль недостатності вітамінів  $B_6$ ,  $B_9$  і  $B_{12}$  у формуванні анемічного синдрому при ювенільному ревматоїдному артриті. *Ліки України* 2005; 2:119–123.
3. Elin R.J., Winter W.E. Methylmalonic acid. A test whose time has come? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001; 125:824–827.
4. Giorgio A.J., Plaut G.W. A method for the colorimetric determination of urinary methylmalonic acid in pernicious anemia. *J. Lab. Clin. Med.* 1965; 66(4): 667–676.
5. Gultepe M., Ozcan O., Avsar K. et al. Urine methylmalonic acid measurements for the assessment of cobalamin deficiency related to neuropsychiatric disorders. *Clin. Biochem.* 2003; 36:275–282.
6. Hvas A.M., Ellegaard J., Nexø E. Increased plasma methylmalonic acid level does not predict clinical manifestations of vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Arch. Intern. Med.* 2001; 161 (12): 1534–1541.
7. Koebnick C., Heins U. Longitudinal concentrations of vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>12</sub>-binding proteins during uncomplicated pregnancy. *Clin. Chem.* 2002; 48(6):928–933.
8. Kushnir M.M., Komaromy-Hiller G. Optimization and performance of a rapid gas chromatography-mass spectrometry analysis for methylmalonic acid. *J. Chromatogr. B.* 2000; 741: 231–241.
9. Morris M.S., Jacques P.P., Rosenberg I.H., Selhub J. Elevated serum methylmalonic acid concentrations are common among elderly americans. *J. Nutr.* 2002; 132(9):2799–2803.
10. Norman E.J. Urinary methylmalonic acid / creatinine ratio defines true tissue cobalamin deficiency. *Br. J. Haematol.* 1998; 100:614–615.
11. Rasmussen K., Pedersen K.O., Sillesen S. Cobalamin deficiency despite normal serum cobalamins. *Ugeskr. Laeger.* 1992; 6:346–347.
12. Refsum H., Yajnik CS, Gadkari M. et al. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74:233–241



13. Базарнова М.А., Воробьёв А.И., Баркаган З.С. и др. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Київ: Вища школа, 1991: 615с.

14. Снегирева Л.В., Арешкина Л.Я. Метод определения метилмалоновой кислоты. Прикладная биохимия и микробиология. 1972; 8(3):363–366.

15. Snow C.F. Laboratory diagnosis of vitamin B<sub>12</sub> and folate deficiency: a guide for the primary care physician. Arch. Intern. Med. 1999; 159:1289–1298.

16. Wickramasinghe S.N., Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorin and total B<sub>12</sub> in serum samples from healthy subjects and patients. J. Clin. Pathol. 1993; 46:537–539.

**МЕТИЛМАЛОНОВАЯ ГИПЕРАЦИДУРИЯ КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ КОБАЛАМИНОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У БОЛЬНЫХ КОМБИНИРОВАННОЙ ЖЕЛЕЗО- И ВИТАМИН В<sub>12</sub>-ДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ (КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

*Чернобровая Е.И., Выдыборец С.В., Ильченко А.В.*

**Резюме.** Представлен модифицированный спектрофотометрический метод определения метилмалоновой кислоты (ММА) в моче, который состоит из пропускания 1 мл мочи через ионообменную колонку с сильноосновной смолой DOWEX 1X4 с последующей элюацией ММА 2 М раствором NaCl, очищением элюата активированным углём и проведением цветной диазореакции. Приведены особенности нарушений мочевого экскреции ММА при различных видах дефицитных анемий: uMMA/uCrea ratio составил 172,16±26,82 мг/г, 455,65±145,02 мг/г, 10,89±0,74 мг/г та 8,8±0,87 мг/г при ЖДА+ В<sub>12</sub>ДА, ЖДА, В<sub>12</sub>ДА и у пациентов контрольной группы соответственно. Экскреция ММА с мочой при ЖДА+ В<sub>12</sub>ДА имеет обратную корреляцию с RBC, Ht, Hb. Отсутствие корреляционных связей между uMMA/uCrea ratio и tHcy, serum Per, NSI, эритроцитарными индексами свидетельствует, что сопутствующий дефицит железа способен нивелировать характерные признаки кобаламинового дефицита.

Предложен метод коррекции метилмалоновой гиперацидурии при ЖДА+ В<sub>12</sub>ДА с использованием сульфата железа и витамина В<sub>12</sub> в стандартных дозах с добавлением орота-та калия.

**Ключевые слова:** метилмалоновая кислота, моча, спектрофотометрический метод, комбинированная железо- и В<sub>12</sub>дефицитная анемия.

**METHYLMALONIC HYPERACIDURIA AS A BIOCHEMICAL CRITERION OF COBALAMIN INSUFFICIENCY IN PATIENTS WITH IRON AND VITAMIN B<sub>12</sub> DEFICIENCY ANEMIA**

*Chernobrova O.I., Vydyborets S.V., Il'chenko O.V.*

**Summary.** Modified spectrophotometric method for measuring urine methylmalonic acid (MMA) has been presented. 1 ml of urine were mixed with a column containing strongly basic anion exchanger resin DOWEX 1X4. After that, MMA was eluted from the resin with 2 M solution NaCl. The eluate was cleared by activated charcoal. Following this, aliquot portion was treated with diazo reagent. Patterns of urinary MMA excretion disorders in patients with IDA & B<sub>12</sub>DA, IDA, B<sub>12</sub>DA and control have been submitted. An inverse correlation between uMMA/uCrea ratio and RBC, Ht, Hb in patients with IDA & B<sub>12</sub>DA was found. No dependent relationship was found between uMMA/uCrea ratio and tHcy, serum Per, NSI, erythrocytes indexes in the same patients, because concomitant iron deficiency may masked character features of cobalamin deficiency. The method of methylmalonic hyperaciduria treatment using standards doses iron and vitamin B<sub>12</sub> with potassium orotas in IDA & B<sub>12</sub>DA has been proposed.

**Key words:** methylmalonic acid, wetting, spectrofotometric method, combined iron & vitamin B<sub>12</sub> deficiency anemia.

**Адреса для листування:**

Видиборець С.В.

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9, Тел.: (044) 483-16-61.

Надійшла: 12.06.2006