**Методические рекомендации к занятию № 12**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема: Клинико-биохимические критерии** витаминного обмена **в норме и при патологии**

Витамины как пищевые факторы являются обязательными участниками обмена веществ. Последний предполагает ряд многочисленных биохимических реакций, представляющих собой генетически детерминированный ответ организма на воздействие химического окружения. Метаболические процессы имеют наследственную основу и изменяются не только под влиянием экологии, но зависят от характера пищи.

Витамины относят к биологически активным веществам (БАВ), которые представляют структуры разнообразной химической природы и в минимальных концентрациях проявляют максимальную биологическую активность. В эту группу, кроме них, входят также ферменты, гормоны, медиаторы, лекарственные препараты, яды.

*Витамины* – низкомолекулярные соединения органической природы, обладающие высокой биологической активностью, жизненно необходимые организму, но практически не способные синтезироваться в нём. Суточная потребность: колеблется от нескольких микрограммов до нескольких десятков миллиграммов и определяется особенностями химического строения, физико-химическими свойствами, биодоступностью (способностью всасываться), механизмами действия, а также полом, возрастом, физиологическим состоянием (беременностью, лактацией), диетой, профессией, климатом.

**Классификация витаминов:**

1.***По химической структуре*** и по способности растворяться выделяют:

**1.Липовитамины (А, Д, Е, К, F);**

**2. Гидровитамины (В1, В2, В3, В6, Вс, В12 и др.);**

**3. Витаминоподобные соединения (Ко Q, липоевая, оротовая, панга-мовая кислоты и др.).**

К последним принадлежат вещества, жизненно необходимые организму, но синтезирующиеся в нём.

2.***По функциональному признаку.***

Натуральные незаменимые компоненты в зависимости от структуры могут служить коферментами энзимов **(энзимовитамины**); чаще это водорастворимые витамины (например, витамины группы В).

Часть пищевых факторов после специфических преобразований выступает в качестве прогормонов и гормонов **(гормоновитамины**); обычно это производные жирорастворимых (например, из витамина А – ретиноевая кислота; из витамина Д – кальцитриол; из витамина F - арахидоновая кислота, из которой синтезируются внутриклеточные гормоны: лейкотриены, тромбоксаны, простагландины, простациклины).

Выделяют также редокс-витамины **(антиоксиданты**), которые имея со-пряжённую систему, способны реагировать со свободными радикалами, обеспечивая защиту (АРЗ) от них (ретинол, токоферолы, КоQ, нафтохиноны, полифенолы, аскорбиновая и липоевая кислоты, рибофлавин и др.) (таблица 1).

*Таблица 1*

*Классификация витаминов*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Витамин | Химическое  Название | Группа | Кем и когда выделен |
| А1  А2 | Ретинол  Дегидроретинол | Антиоксиданты  Гормоно-витамины (Ж) | Осборн, Миндел; 1922 |
| Д2  Д3 | Эргокальциферол  Холекальциферол | Гормоно-витамины (Ж) | Виндаус; 1931 |
| Е | α-, β-, γ-, δ- токоферолы | Антиоксиданты  (Ж) | Ивенс, Эмерсон;  1921 |
| К1  К2 | Филлохинон  Фарнохинон | Энзимовитамины  Гормоно-витамины (Ж) | Дойзи; 1939 |
| F | ПНЖК | Гормоно-витамины (Ж) |  |
| В1 | Тиамин | Энзимовитамины Антиоксиданты В) | Янсен, Виндаус;  1926 |
| В2 | Рибофлавин | Энзимовитамины (В) | Кун, Вейланд,  Каррер; 1934 |
| В6 | Пиридоксин | Энзимовитамины (В) | Кун; 1939 |
| РР (В5) | Ниацин | Энзимовитамины (В) | Хубер; 1897  Элвехьем, Вули; 1937 |
| В3 | Пантотеновая кислота | Энзимовитамины (В) | Уильямс; 1933 |
| Вс | Фолацин | Энзимовитамины (В) | Митчелл, Снелл,  Уильямс; 1941 |
| Н | Биотин | Энзимовитамины (В) | Харрис; 1943 |
| В12 | Кобаламин | Энзимовитамины (В) | Райкс, Смит;  1948 |
| С | Аскорбиновая кислота | Антиоксиданты (В) | Сент-Дьёрдьи;  1927 |
| Р | Биофлавоноиды,  Полифенолы | Антиоксиданты  (В) | Сент-Дьёрдьи;  1936 |
|  | Липоевая кислота  (витаминоподоб-  ное соединение) | Энзимовитамины  Антиоксиданты  (В) | Рид, Гунсалюс;  1953 |

Примечание: Ж – жирорастворимые витамины; В – водорастворимые витамины.

# Судьба витаминов в организме

***Природные источники витаминов*:**

1.В основном человеческий организм получает витамины с пищей (чаще растительного, реже животного происхождения).

2.Нормальная микрофлора кишечника (преимущественно бифидобактериии) способна синтезировать витамины (К, Н, В12, В6 , Вс, В2, В1, РР, липоевую, пантотеновую кислоты).

3.Некоторые витамины эндогенного происхождения, но их генез зависит от внешних факторов (например, в коже под действием УФО происходит преобразование холестерола в витамин Д; из незаменимой аминокислоты триптофана в клетках образуются НАД+ и НАД+Ф - активные формы витамина В5).

# *Специфика всасывания витаминов*

Особенности химического строения определяют как липофильную, так и гидрофильную природу незаменимых пищевых компонентов. Липофилы для своего всасывания требуют наличия жёлчи, в состав которой входят соли жёлчных кислот, ответственные за усвояемость гидрофобов. В энтероците липовитамины включаются в транспортные формы (хиломикроны или ЛПОНП) и далее, попадая в лимфу, проделывают долгий путь через грудной лимфатический проток, большой круг кровообращения, становятся

доступными органам-мишеням и, наконец, достигают печени.

В отличие от них натуральные пищевые факторы гидрофильной природы, всасываясь в кишечнике, по системе портального кровообращения сразу поступают в этот орган.

***Роль печени в обмене витаминов***

1.Как липо-, так и большинство гидровитаминов при избыточном поступлении в организм способны депонироваться в печени.

2.В гепатоцитах большая часть натуральных алиментарных компонентов активируется:

а) путём фосфорилирования.

Например: витамин В1 – в тиаминдифосфат (ТДФ),

В6 – в фосфопиридоксамин или фосфопиридоксаль (ФП);

б) включаясь в нуклеотиды: витамина РР в НАД+, НАД+Ф; рибофлавин в ФМН, ФАД; пантотеновая кислота в кофермент ацилирования (НS-Ко А);

в) витамин Д гидроксилируясь;

г) каротины под действием каротиндиоксигеназы преобразуются в витамин А;

д) за счёт реакций гидрирования фолиевая кислота превращается в тетрагидрофолиевую кислоту (ТГФК); реакция восстановления используется и для реактивации витамина С.

3.В печени осуществляется синтез специфических белков, транспортирующих витамины в плазме крови к органам-мишеням.

***Значение комплекса: витамин + транспортный белок:***

а) с его помощью обеспечивается растворимость липовитамина в плазме крови;

б) предупреждается преждевременное проявление активности витамина;

в) затрудняется выделение его через почечный фильтр;

г) создаётся специфическое взаимодействие с рецепторами мембран клеток- мишеней.

4.Катаболическая фаза обмена многих витаминов завершается в печени. Продукты биотрансформации липовитаминов, В12 выделяются из организма в составе жёлчи через желудочно-кишечный тракт.

Практически все незаменимые пищевые компоненты обладают внутриклеточной рецепцией, то есть проникают в цитоплазму и органоиды, где и выполняют свои специфические функции.

**Общие механизмы действия витаминов**

1.После созревания гормоновитамины, взаимодействуя с гормончувствительным элементом (ГЧЭ) транскриптона, *растормаживают матричную активность* отдельных генов молекулы ДНК, запуская транскрипцию и синтез белков.

2.В качестве простетической группы могут входить в состав различных белков, выполняющих разнообразные функции:

а) *пластическую*: липовитамины – облигатный компонент билипидного слоя мембран;

б) *каталитическую:* модифицированные В6 – коэнзим аминофераз, В1 – лиаз, В2 и В5 (РР) – дегидрогеназ;

в) *специфическую* – родопсин - сложный протеин,содержащий в качестве небелкового компонент витамин А, обеспечивает свето- и цветоощущения.

3.Сопряжённая система редокс-витаминов способна:

а) реагировать с радикалом, неспаренный электрон которого вступает в сопряжение с общим π-электронным облаком, плотность последнего делокализуется, что делает образовавшийся радикал витамина стабильным, тем самым подавляется скорость СРО (витамины Е, А, С, Р) (*ловушки радикалов*);

б) усиливать подвижность протонов. Являясь их источниками, витамины выступают *восстановителями* (*косубстратами*) в ОВР (аскорбиновая кислота – донор восстановительных эквивалентов в реакциях гидроксилирования аминокислот, в преобразовании витамина Вс в ТГФК).

Срок жизни незаменимого пищевого фактора в клетке ограничен. Инактивация натурального ингредиента начинается в органах-мишенях и часто заканчивается в печени. Продукты его деградации или он сам выделяется с мочой, потом, с выдыхаемым воздухом или через желудочно-кишечный тракт с калом.

#### **Патология метаболизма витаминов**

Вследствие дозозависимого эффекта, характерного для БАВ, изменения в статусе витаминов в организме грозят развитием ***гипо***- или***гипервитаминозов***.

С установлением факта присутствия микроэлементов в структуре многих витаминзависимых коферментов (например, кинурениназа содержит витамин В6 и ионы магния) стало ясно, что гиповитаминозы могут быть следствием дефицита апофермент-витамин-минерального комплекса.

Среди состояний, связанных с дефицитом витаминов, выделяют ***экзогенные***и***эндогенные*.**

***Экзогенный гиповитаминоз*** обусловлен абсолютным или относительным недостатком незаменимого компонента.

*Абсолютный недостаток витаминов* развивается в результате:

полного голодания, строгой диеты при многих заболеваниях,

различных религиозных запретов, анорексии, а также может быть следствием

пролонгированной термической обработки пищи,

нарушения сроков хранения продуктов,

поступления витамина в мало усвояемой форме,

действия антивитаминов, содержащихся в пище.

В основе *относительного недостатка витаминов* лежит повышенная потребность в них, причинами которой могут служить следующие факторы:

физиологическое состояние (беременность, лактация),

прорезывание зубов у младенцев,

усиленный рост у подростков,

неадекватная физическая нагрузка,

хронические стрессы (экзамены),

климатические условия (пеллагра и болезнь бери-бери встречаются в жарком климате, а цинга – преимущественно в холодном),

профессиональные вредности,

особенности питания (злоупотребление легкоусвояемыми углеводами требует повышенных доз тиамина и пиридоксина; избыток липидов пищи увеличивает потребности в кобаламине; недостаток белков приводит к дефициту витаминов группы В).

***Эндогенный гиповитаминоз*** обычно связан с нарушением его метаболизма. Выделяют ***первичные и вторичные эндогенные гиповитаминозы***.

***Первичный эндогенный гиповитаминоз*** – это наследственное заболевание, обусловленное точечными мутациями в молекуле ДНК. В результате повреждён синтез белков, участвующих в обмене витаминов:

а) протеинов, ответственных за всасывание этих пищевых факторов в кишечнике или за реабсорбцию в почках;

б) ферментов, участвующих в активации витаминов;

в) белков, транспортирующих их в плазме крови;

г) рецепторов, клетки-мишени, узнающих незаменимый компонент;

д) апофермента, коферментом для которого служит данный БАВ.

Подобные патологии описаны для многих витаминов (В1, В6, В12, Вс, РР, Н, А, Д, Е).

***Вторичный эндогенный гиповитаминоз*** развивается как следствие основного недуга:

- при поражениях тонкого кишечника (энтерит) замедляется всасывание

витаминов;

- при патологии печени (циррозе, гепатите, жировой инфильтрации) нарушаются депонирование и активирование пищевых факторов, а также выделение жёлчи, необходимой для усвоения липовитаминов;

- при заболеваниях инфекционной этиологии часто назначаются per os сульфаниламиды и антибиотики, которые подавляют нормальную микрофлору кишечника, что приводит к развитию *дисбактериоза* (или *дисбиоценоза*), когда резко снижается количество бифидобактерий, отвечающих за синтез витаминов в желудочно-кишечном тракте.

Подобное явление наблюдается у недоношенных новорождённых, у младенцев, родившихся от матерей с патологией беременности.

Организм теряет много вышеназванных БАВ при гипертермии, неукротимой рвоте, длительных поносах, полиурии.

При общей недостаточности питания у пациентов могут иметь место множественные дефициты алиментарных компонентов, что приводит к развитию смешанной клинической картины.

В основе классических синдромов витаминной недостаточности лежат повышенная мобилизация их запасов, а затем истощение тканевых депо и биохимические нарушения на клеточном уровне.

При острой или хронической передозировке натуральных незаменимых факторов велика опасность развития ***гипервитаминозов,*** особенно если разрыв между физиологическими и токсическими дозами витамина небольшой. Происходит перенасыщенность организма в результате или избыточного его поступления, или усиленного анаболизма его в клетке (витамин Д при действии УФО), или замедленной инактивации. Как остроумно пишут американские исследователи: «Много витамина не всегда хорошо. Это иногда лучше, иногда хуже, но всегда дороже».

**Таблица № 2**

***Коферментные функции энзимовитаминов и их участие в реакциях метаболизма***

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Энзимовитамин | Кофермент | Участие в реакциях |
| **1** | **2** | **3** |
| Витамин К  (коагуляции) | Гидропероксид  витамина К | Кофермент гамма-карбо-ксилазы глутамата белко-вых факторов свертывания крови I, VII, IX, X. |
| Витамин В1  (антиневритный) | Тиаминдифосфат  (ТДФ);  Тиаминтрифосфат (ТТФ) | - кофермент транскетола-зы – ключевого фермента ПФП;  -кофермент мультиэнзим-ных пируватдегидрогена- зного и 2-оксо-глутарат-дегидрогеназных комплек-сов, обеспечивающих окислительное декарбо-ксилирование альфа-кетокислот;  - специфический макроэрг центральной нервной системы |
| Витамин В2  (антисеборейный) | Флавинмононуклеотид  (ФМН),  Флавинаденин-  динуклеотид (ФАД) | - кофермент вторичных ДГ тканевого дыхания;  - кофермент мульти-энзимных (ПВК-дегидро-геназного и 2-оксо-глутарат-дегидрогеназно-го) комплексов, обеспе-чивающих окислительное декарбоксилирование альфа-кетокислот;  - кофермент сукцинатДГ;  - кофермент ДГ бета-окисления ВЖК;  - кофермент глицерол-фосфатДГ;   * коэнзим глутатион-пероксидазы - участника АРЗ клетки |
| Витамин В6  (антидерматитный) | Фосфопиридоксамин,  фосфопиридоксаль  (ФП) | кофермент  - в реакциях переамини-рования и декарбоксили-  рования аминокислот;  - в преобразовании трип-тофана в НАД+;  - кофермент 5-аминоле-вулинат-синтазы в синтезе гема;  - кофермент энзимов в генезе азотистых осно-ваний (сфингозина);  - коэнзим фосфорилазы гликогена |
| Витамин РР  (антипеллагрический) | НАД+ - никотинамид-  Адениндинуклеотид  НАД+Ф – никотинамид-  адениндинуклеотид-фосфат | - кофермент лактатДГ, малатДГ;  - кофермент первичной ДГ тканевого дыхания;  НАД+ Ф (окисленный) – коэнзим ДГ ПФП;  НАД+Ф (восстановленный)  - кофермент биосинтети-ческих процессов (син-теза ВЖК, холестерина, стероидных гормонов, жёлчных кислот, витамина Д, дезоксирибонуклеоти-дов);   * коэнзим глутатион-редуктазы - компонента АРЗ; * -кофермент НАДФН-оксидазы – участника фагоцитоза;   - коэнзим в реакциях гидроксилирования (мик-росомальное окисление), используемого в синтезе ненасыщенных жирных кислот, простагландинов, при обезвреживании ксенобиотиков |
| Витамин В3  (пантотеновая  кислота) | НS-КоА  (кофермент  ацилирования) | Кофермент в активации жирных кислот с обра-зованием ацил КоА, что используется:  - в бета-окислении ВЖК;  - в окислительном декар-боксилировании альфа-кетокислот;  - в ЦТК;  - в кетогенезе;  - в синтезе ВЖК;  - в генезе холестерина и его производных;  - в образовании ацетил-холина;  - в ацетилировании амино-производных гексоз;  - в синтезе гема из сук-цинил-КоА и глицина |
| Витамин Вс  (фолиевая кислота) | Тетрагидрофолиевая кислота - ТГФК | Коэнзим, переносящий одноуглеродные фраг-менты, необходимые:  -для синтеза пуриновых рибо- и дезоксирибо-нуклеотидов;  - в генезе тимидин-нуклеотида;  - для преобразования серина в глицин (синтез гема) и др. |
| Витамин Н  (биотин) | Карбоксибиотин | Источник  СО2 в реакциях карбоксилирования:  - из ПВК - оксалоацетат (ГНГ, ЦТК);  - из пропионил-КоА – сукцинил-КоА (ЦТК, син-тез гема);  - из ацетил-КоА – мало-нил-КоА (генез ацил ВЖК);  - из глутамина синтез аргинина, креатинина, мочевины, пиримидино-вых нуклеотидов и др. |
| Витамин В12  (антипернициозный) | МК – метилкобаламин  ДАК – дезоксиаденозил-кобаламин | * Коэнзим в реакциях метилирования (получение адреналина, холина, ацетилхолина, холинфос-фатидов, метионина, креа-тина, тимидиндифосфата и др.);   - кофермент метилмало-нил-КоА-мутазы, которая образует сукцинил-КоА (синтез гема) |
| Витамин С  (антискорбутный) | Аскорбиновая кислота | Косубстрат в реакциях микросомального окисле-ния: гидроксилирования аминокислот - фенилаланина (тирозин → катехоламины, меланины, тироидные гормоны); лизина, пролина – обли-гатных участников созревания коллагена; триптамина (серотонин);  - АО прямого действия;  - снижает скорость пероксидации ЛПОНП (антиатерогенный эффект);  - предохраняет Fe2+ от окисления (синтез гема);  - участник ОВР в генезе кортикостероидов;  - активатор гексокиназы;  - стимулятор протеаз, каталазы. |
| Липоевая кислота | Альфа-липоевая кислота;  Альфа-липоамид | Кофермент мульти-энзимных комплексов, обеспечивающих окисли-тельное декарбокси-лирование альфа-кетокислот. |

***Таблица № 3***

**Сравнительная характеристика гормоновитаминов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Гормоновитамин | Гормон | Участие в реакциях метаболизма |
| **1** | **2** | **3** |
| Витамин А | Транс-ретиноевая кислота | Экспрессирует гены: взаимодействует с ГЧЭ транскриптонов, активирует РНК-полимеразу, стимулируя синтез белков иммунных и структурных (соединительной ткани, эпителия) |
| Витамин Д | Кальцитриол | Взаимодействует с ГЧЭ транскрипто-на, стимулирует синтез Са2+ - связывающих белков и щелочной фосфатазы, регулирующих обмен кальция и фосфатов:  - усиливает всасывание Са2+ и фос-фатов в кишечнике;  - регулирует минерализацию костной ткани;  - стимулирует реабсорбцию Са2+ и выведение фосфатов почками. |
| Витамин К | Нафтохиноны | Растормаживают матричную активность отдельных генов ДНК: связываясь с ГЧЭ, запускают транскрипцию и трансляцию белков мышечной, соединительной тканей |
| Витамин F | Простагландины  Тромбоксаны  Простациклины  Лейкотриены | – Участники воспалительных реакций; стимулируют роды и прерывание беременности; регулируют артериа-льное давление.  - Повышают агрегацию тромбоцитов;  - их антагонисты;  - участники воспаления и аллергии |

***Таблица № 4***

***Сравнительная характеристика клиники гипо- и гипервитаминозов***

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Витамин | Клиника гиповитаминоза | Клиника гипервитаминоза |
| **1** | **2** | **3** |
| Витамин А | *Экзогенный гиповитаминоз*: угнетение иммунитета; снижение скорости роста (у детей); гемералопия, ксерофтальмия, кератомаляция; дерматит; конверсия эпителия слизистых полых органов – «иты».  *Первичный эндогенный гипо-витаминоз* (синдром Дарье): умственная отсталость, гипер-кератоз, «жабья» кожа.  *Вторичный эндогенный гипо-витаминоз* при болезнях печени, ЖКТ, после приёма аспирина, барбитуратов, слабительных с минеральными маслами, некоторых пищевых добавок; симптомы экзогенного гиповитаминоза | *Острое отравление*: тошнота, рвота, гипертермия, анорексия, головные боли.  *Хроническое отравление*:  алопеция, ломкость ногтей; дерматит, патологические переломы; тератогенный эффект у беременных. |
| Витамин Д | *Экзогенный гиповитаминоз*  (рахит у младенцев): поражение централь-  ной и вегетативной нервной, кост- ной и мышечной (гипотония мышц живота) систем;  - у беременных и пожилых: остео- пороз, остеомаляция, склонность к переломам.  *Первичный эндогенный гипо- витаминоз* (витамин Д-резис-тентный рахит) - клиника сходна с экзогенным рахитом; причина – блок 1 альфа-гидроксилазы.  *Вторичный эндогенный гипо-витаминоз* при болезнях щитовидной, паращитовидных желёз, крови (миеломная болезнь, лейкозы, талассемии), ЖКТ, печени, почек, костной системы; симптомы экзогенного гиповитаминоза. | *Острое отравление* похоже на клинику острого отравления витамином А.  *Хроническое отравление*: отложение кальция в паренхиматозных органах с развитием нефрокальциноза, кальцификацией сердечных клапанов, диэнцефального синдрома, краниостеноза;  у взрослых гипервитаминоз приводит к развитию атеросклероза. |
| Витамин Е | *Экзогенный гиповитамино*з (у младенцев): усилен гемолиз эрит-роцитов, гемолитическая анемия и желтуха; тканевой отёк (склеродема);  - у взрослых: дегенерация половых клеток, миофибрилл, нейронов.  *Первичный эндогенный гипо-витаминоз* пока не диагнос-тируется, хотя теоретически вероятенвследствие мутаций, обусловливающих сдвиги в аминокислотных последовате-льностях белков – участников метаболизма витамина Е.  *Вторичный эндогенный гипо-витаминоз* при панкреатите,  Стеаторее, холецистите, гепатите,  синдроме мальабсорбции. | *Острое отравление*: слабость, усталость, мышечная утомляемость, подъём АД, депрессия, тошнота, метеоризм, диарея, подавление иммунитета.  *Хроническое* *отравление*: подавление иммунитета (из-за угнетения ПОЛ); гемолитическая желтуха, гипокоагуляция, гипо-гликемия, мышечная слабость, ослабление потенции у мужчин, гипертензия. |
| Витамин К | *Экзогенный и первичный эндогенный гиповитаминозы* не описаны.  *Вторичный эндогенный гипо-витаминоз* при болезнях кише-чника, печени, при нарушении транспорта жёлчи (холестазе, обтурации жёлчных ходов), дисбактериозе.  Клиника: геморрагический синдром (петехии, гематомы, полостные кровоизлияния, гемартрозы, гематурия). | У новорожденных, матерям которых с профилак-тической целью в родах вводили викасол; клиника: геморрагический диатез, гемолитическая анемия (у  младенцев вероятна ядерная желтуха), возможны симптомы поражения печени. |
| Витамин F | *Экзогенный гиповитаминоз*: снижение иммунитета, дерматит, склонность к ИБС и атеросклерозу.  *Первичный эндогенный* *гипо-витаминоз* не описан.  *Вторичный эндогенный* *гипо-витаминоз* при болезнях печени, кишечника; симптомы те же. | Интенсификация процессов ПОЛ с деструкцией клеточных мембран всех органов и тканей. |
| Витамин В1 | *Экзогенный гиповитаминоз* (болезнь бери-бери): хронический полиневрит, атрофия и паралич конечностей; страдают ЖКТ и сердечно-сосудистая система.  *Первичный эндогенный*  *гипо-витаминоз:* а) болезнь Лея: (блок фермента АТФ-ТДФ-трансферазы): поражение черепно-мозговых нервов (глухота, слепота);  б) синдром Вернике-Корсакова (снижено сродство ТДФ к апоферменту транскетолазы): нарушение памяти, ориентировки в пространстве, во времени, координации движений.  *Вторичный эндогенный гипо-витаминоз* у новорожденных, родившихся от матерей с дефицитом тиамина. | При повышенной чувстви-тельности к витамину могут развиться аллергические реакции (крапивница, отек Квинке, вазомоторный ринит, анафилактический шок). |
| Витамин В2 | *Экзогенный* *гиповитаминоз* (у младенцев на искусственном вскармливании): стоматит, заеды в углах рта, хейлоз, себорейный дерматит, васкуляризация роговицы, гемолитическая анемия.  *Первичный эндогенный гипови-таминоз* (блок глутатион*-*редуктазы) усилен гемолиз эритроцитов.  *Вторичный эндогенный гипови-таминоз* после приёма антидепрессантов и антибиотиков тетрациклинового ряда. | Аллергические реакции |
| Витамин В3 | *Экзогенный гиповитаминоз* (апантотеноз) только в экспе-рименте: дерматиты, поражения почек, надпочечников, миокарда.  *Эндогенные гиповитаминозы* не  описаны. | *Острое отравление*: тошнота, рвота, изжога, диарея. |
| Витамин В6 | *Экзогенный гиповитаминоз*: потеря аппетита, тошнота, себорейный дерматит, конъюнктивит, глоссит, хейлоз, угри, поражение ЦНС.  *Первичный эндогенный гипови-таминоз:*  - пиридоксинзависимые судороги (блок глутаматдекарбоксилазы);  - пиридоксинзависимая анемия (блок 5-аминолевулинатсинтазы);  - цистатионинурия (блок цистатио-ниназы);  - гомоцистинурия (блок цистатио-нинсинтазы);  - синдром Knapp-Komrover (блок кинурениназы).  *Вторичный эндогенный гипови-таминоз* (при хроническом алкоголизме, кишечной инфекции; стрессе, лихорадке, гипертирозе; после приёма сульфаниламидов, противотуберкулёзных препаратов, противозачаточных средств): симп-томы те же, что и при пищевом дефиците. | Аллергические реакции  (редко) |
| Витамин В12 | *Экзогенный гиповитаминоз* не описан.  *Первичный эндогенный гипови-таминоз* (метилмалоновая ацид-урия); причина – блок метил-мало-нил-КоА мутазы.  *Вторичный эндогенный гипови-таминоз* (мегалобластическая пернициозная, злокачественная анемия Аддисона-Бирмера): подав-ление эритропоэза, поражение ЖКТ и ЦНС; причина – нарушена выработка гастромукопротеина. | Аллергические реакции  (крапивница) |
| Витамин Вс | *Экзогенный гиповитаминоз*: нару-шение роста, снижение иммуни-тета, поражение ЦНС, мегалобластическая (перни-циозная, злокачественная) анемия Аддисона-Бирмера.  *Первичный эндогенный гипо-витаминоз:*  - блок формиминотрансферазы (задержка умственного развития);  - блок фолатредуктазы(мегало-бластическая анемия).  *Вторичный эндогенный гиповита-миноз* возможен при хроническом алкоголизме, после приёма антибиотиков, сульфаниламидов и оральных контрацептивов. | Аллергические реакции, рвота, метеоризм, анорексия, расстройство сна. |
| Витами-ны С и Р | *Экзогенный гиповитаминоз –* цинга (полигиповитаминоз С и Р): пора- жение ЦНС и вегетативной нервной системы; нарушение проница-емости сосудистой стенки; повреж-дение структуры хрящевой и кост-ной тканей.  *Экзогенный гиповитаминоз*  Р: (снижение прочности капилляров, усиление их проницаемости, затем появление симптомов дефицита витамина С.  Вторичный *эндогенный С-гипо-витаминоз* развивается при ревма-тизме, дифтерии и пневмонии. | *Передозировка витамина С*: аллергические реакции, диарея, оксалурия вплоть до образования камней, у беременных – выкидыши, уродства плода. Длительный приём витамина С:  бессонница, головные боли, ощущение жара, гипер-тензия.  *Гипервитаминоз Р* не описан, хотя мегадозы биофлавоноидов  способствуют гипотонии. |
| Витамин Н | *Экзогенный гиповитаминоз* практически не встречается*. Первичный эндогенный гипови-таминоз* (пропионовая ацид-емия): задержка умственного развития, анемия, кома.  *Вторичный эндогенный гипови-таминоз* (при злоупотреблении сырыми яйцами, при дисбактериозе и заболеваниях ЖКТ): нарушения роста (у детей); атония кишечника, поражение ЦНС, дерматит. | Клиника острого и хронического отравлений не описана. |
| Витамин РР (В5) | *Экзогенный гиповитаминоз –* пеллагра (болезнь трех «Д»):  - деменция – поражение ЦНС,  - диарея – расстройство ЖКТ,  - дерматит – заболевание кожи.  *Первичный эндогенный гипови-таминоз* следствие нарушения синтеза:  а) белка – транспортёра триптофана через стенку кишечника; у детей – синдром «голубых пелёнок», а у взрослых – болезнь Хартнупа;  б) белка – фермента кинурениназы;  (синдром Knapp-Komrover).  *Вторичный эндогенный гипови-таминоз* возникает при поражении ЖКТ, хроническом алкоголизме, длительном приёме цитостатиков, белковом голодании. | *Острое отравление:* аллергические реакции, зуд кожи, покраснение.  *Хроническое отравление*: жировая дистрофия печени. |
| Липоевая  кислота | Синдром «пирувизма»: миокардио-дистрофия, мышечные спазмы, метаболический ацидоз, жировая дистрофия печени, полиневрит. | Не установлено |

**Диагностика витаминной недостаточности**

Диагностику витаминной недостаточности осуществляют главным образом на основе симптомов проявления гиповитаминоза или авитаминоза. Большинство состояний витаминной недостаточности проявляются специфическими симптомами позволяющими врачу поставить точный диагноз уже на этапе сбора анамнеза (расспрос больного) и клинического осмотра больного.

При сборе анамнеза важно внимание уделяют выяснению состояния питания больного, его кулинарных предпочтений и самого режима питания. При осмотре больного особое внимание уделяют состоянию кожи и слизистых оболочек.

Практически все типы авитаминозов сопровождаются характерными симптомами, выраженными в виде повреждения кожи и слизистых оболочек. Для диагностики латентных (скрытых) форм витаминной недостаточности или субнормального обеспечения витаминами (витаминная недостаточность без клинических проявлений) проводят ряд лабораторных и функциональных исследований, целью которых является установление уровня насыщения организма витаминами.

Насыщенность организма витамином А, например, определяется при помощи теста сумеречной адаптации зрения (недостаток витамина А вызывает ослабление остроты зрения, особенно ночного). Степень насыщенности витамином С определяют при помощи вакуумного теста устойчивости капилляров. После создания вакуума над ограниченным участком кожи посчитывают количество образовавшихся точечных кровоподтеков в коже. Большое количество таких кровоподтеков говорит о ломкости капилляров, и следовательно, о недостаточности витамина С в организме.

Для количественного определения содержания витаминов в организме проводят ряд лабораторных исследований по определению концентрации различных витаминов в крови и моче. Например нормальное содержание витамина С в плазме крови составляет 7—12 мг/л, витамина А - 300—700 мкг/л, витамина В6 - не ниже 50 мкг/л, витамина РР - 7—12 мг. Содержание витамина К определяют по уровню протромбина (белок определяющий сворачивание крови) – нормальный уровень которого в плазме крови составляет 80—100%.  
  
Норма содержания основных витаминов следующая:

1. Витамин A — от 0,3 до 0,43 мкг/мл.
2. Витамин B1 — от 27 до 85 мкг/л.
3. Витамин B5 — от 0,2 до 1,8 мкг/мл.
4. Витамин B6 — от 8,7 до 27,2 мкг/л.
5. Витамин В12 — от 133 до 675 пмоль/л.
6. Витамин C — от 4 до 20,0 мкг/мл.
7. Витамин D — от 25 до 80 мкг/л.
8. Витамин E — от 5 до 18,0 мкг/мл.
9. Витамин K — от 0,1 до 2,2 мкг/л.

**Таблица 4. Биохимический анализ крови**

|  |  |
| --- | --- |
| Витамин А | 0,52-2,1 мкмоль/л |
| Витамин В1 | 30,0-45,0 нмоль/л |
| Витамин В2 | 328,0 нмоль/л |
| Витамин В12 | 0,44-1,03 нмоль/л |
| Витамин С | 34,1-90,8 мкмоль/л (плазма)  39,7-113,6 мкмоль/л (кровь) |
| Витамин Н (биотин) | 36,8-65,5 нмоль/л |
| Витамин В6 | 59,0-106,0 нмоль/л |

**витамин D**

Давно известно, что основная роль витамина D (Витамин D3, или холекальциферол) в организме связана с регуляцией кальциевого обмена - недостаток витамина D проявляется рахитом у детей и остеомаляцией (снижением минерализации костей) у взрослых. В настоящее время показано, что витамин D обладает не только классическими эффектами, связанными с регуляцией кальциевого метаболизма.

Помимо поддержания минерального баланса и нормального состояния костной ткани, он участвует в регуляции многих других физиологических процессов. Активный метаболит витамина D, 1,25(OH)2D3, образующийся в почках из менее активной промежуточной формы 25(OH)D3, по своим характеристикам отнесен к гормонам. Рецепторы к нему найдены, помимо прочего, в клетках иммунной системы, мозга, предстательной железы, молочных желез, толстого кишечника. Часть из этих клеток содержит фермент, участвующий в образовании активных форм витамина D, что подтверждает возможность его локального образования и местных (паракринных) эффектов на уровне различных тканей.

Открытие наличия рецепторов к 1,25(OH)2D3 в клетках иммунной системы стимулировало исследования роли витамина D в регуляции иммунитета, которые показали перспективность дальнейших работ по изучению применения аналогов витамина D в терапии аутоиммунных заболеваний и профилактике терапии раковых заболеваний. Продемонстрировано, что прямо или опосредованно витамин D контролирует множество генов, вызывает снижение клеточной пролиферации как нормальных, так и раковых клеток, индуцирует их конечную дифференциацию, проявляет определенные иммуносупрессорные эффекты, ограничивая некоторые типы воспалительного ответа (в частности, аутоиммунные нарушения), снижает восприимчивость к некоторым инфекциям (например, туберкулезу).

Дефицит витамина D, помимо патологии костной ткани, ассоциирован с повышенной частотой некоторых видов рака, сердечно-сосудистых заболеваний, рассеянного склероза, депрессий, уровень его обратно связан с активностью ревматоидного артрита. Предполагается, что поддержание достаточного уровня витамина D в организме снижает вероятность развития таких заболеваний.

**Выявление дефицита витамина D**

По мнению специалистов, у большой части населения наблюдается скрытая недостаточность витамина D в организме. Дефицит витамина D может быть подтвержден с помощью лабораторных исследований.

Лабораторная медицина в настоящее время обладает доступными стандартизованными методами определения его статуса в организме.

Определение 25(OH)D современными методами позволяет в одном исследовании эквимолярно определять обе основные формы витамина (D2, поступающий с пищей, и D3, образующийся в коже под действием ультрафиолета), и является хорошим индикатором общего статуса витамина D в организме.

Причиной явного или скрытого дефицита витамина D может быть не только его недостаточное содержание в пище, но и такие факторы, как: нарушение всасывания вследствие заболеваний кишечника, применение препаратов, снижающих абсорбцию холестерина, нарушение образования активной формы гормона в почках при хронической почечной недостаточности, потеря с мочой связанного с белком витамина D при нефротическом синдроме, изменение уровня паратгормона, который стимулирует образование активной формы витамина D в почках; патология печени со снижением образования 25(OH)D из предшественников, поступающих с пищей и образующихся в коже под действием солнечных лучей; снижение образования витамина D в коже; наследственные формы резистентности к действию витамина D и т. д.

**Исследования первого уровня**, направленные на выявление дефицита витамина D, должны включать, помимо исследования уровня 25(OH)D, также определение кальция, фосфора, паратгормона.

Дефицит витамина D часто вызывает вторичное повышение секреции паратгормона, и его проявления сходны с проявлениями гиперпаратиреоза.

Результаты исследований следует оценивать в комплексе и сопоставлении с индивидуальными данными и результатами клинического осмотра.

При необходимости, для исключения почечных причин дефицита витамина D, обследование следует дополнить определением мочевины и креатинина; исследовать уровень магния, оказывающего существенное влияние на систему регуляции кальциевого метаболизма.

Для исключения нарушений процессов всасывания в кишечнике следует оценить содержание общего белка и альбумина и, при необходимости, исследовать маркеры целиакии и других хронических воспалительных заболеваний кишечника (антитела к глиадину, эндомизию, ретикулину) и т. д.

Наиболее часто витамин D, в комплексе с кальцием, назначают для профилактики остеопороза, особенно женщинам после 40 лет, и в детском возрасте - для профилактики рахита, при недостаточном поступлении кальция, необходимого для роста костей. Такой прием подразумевает определенные дозировки препаратов. Передозировка, в целом, чаще встречающаяся в педиатрической практике, может приводить к негативным последствиям. В некоторых случаях может потребоваться контрольное исследование уровня 25(OH)D в крови.

ВИТАМИН D3

Витамин D3, или холекальциферол, является основной формой витамина D и образуется в коже под действием ультрафиолетовых лучей, а также поступает извне с такими продуктами питания, как рыбий жир, яичные желтки, печень, сливочное масло. Анализ основан на определении в сыворотке крови методом конкурентного связывания с белком уровня 25-гидроксихолекальци- ферола после хроматографического отделения его от других метаболитов витамина D. Обычно одновременно с уровнем витамина D3 в сыворотке крови определяют также уровень кальция и фосфатов.

Цель

• Диагностика заболеваний костей скелета, например рахита, остеомаляции.

• Диагностика гиперкальциемии.

• Выявление интоксикации витамином D.

• Контроль за эффективностью лечения витамином D3.

Подготовка

• Следует объяснить пациенту, что анализ необходим для оп-

ределения уровня витамина D в организме.

• Пациент должен воздержаться от приема пищи в течение 8-12 ч до исследования.

• Пациента необходимо предупредить, что для выполнения анализа у него возьмут кровь из вены, а также сообщить, кто и когда будет брать кровь.

• Следует предупредить о возможных неприятных ощущениях во время наложения жгута на руку и пункции вены.

• Следует выяснить, не получает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (кортикостероиды, противосудорожные). Если прием их обязателен, это указывают в бланке направления в лабораторию.

Процедура и последующий уход

• После венепункции набирают кровь в 4,5-миллилитровую силиконизированную пробирку.

• Место венепункции придавливают ватным шариком до остановки кровотечения.

• При образовании гематомы в месте венепункции назначают согревающие компрессы.

Меры предосторожности. Следует осторожно обращаться с пробой крови во избежание гемолиза.

Референтные значения. Уровень 25-гидроксихолекальциферола в сыворотке крови в норме составляет 10-60 нг/мл (СИ: 25-150 нмоль/л).

Отклонение от нормы.

Низкий или нерегистрируемый уровень витамина D3 свидетельствует о его недостаточности, которая может стать причиной рахита и остеомаляции. Причиной низкого уровня витамина D3 бывает недостаточное поступление его с пищей, недостаточное пребывание под солнцем или нарушение всасывания витамина D3 в кишечнике (например, при заболеваниях желчных путей, панкреатите, целиакии, муковисцидозе, а также после резекции желудка и кишки). Низкий уровень витамина D3 может быть также следствием различных заболеваний печени, паращитовидных желез и почек.

Повышенный уровень (более 100 нг/мл, СИ: более 250 нмоль/л) свидетельствует о возможности проявления токсических эффектов и наблюдается при слишком длительной терапии витамином D3 или бесконтрольном его приеме. Повышенный уровень витамина D3 в сочетании с гиперкальциемией может быть следствием повышенной чувствительности к нему, как, например, при саркоидозе.

Факторы, влияющие на результат анализа

• Гемолиз, обусловленный неосторожным обращением с пробой крови.

• Противосудорожные препараты, изониазид, минеральное масло, кортикостероиды, гидроксид алюминия, холестирамин и колестипол (снижают уровень витамина D3).

|  |
| --- |
| **Витамин В12** |

|  |
| --- |
| **Недостаточность витамина В12 (цианокобаламина)** проявляется поражением кроветворной ткани, пищеварительной и нервной систем. При авитаминозах развиваются В12-дефицитная анемия (пернициозная анемия) и фуникулярный миелоз. Последний синдром редко возникает самостоятельно, обычно он сочетается смегалобластной анемией. Гиповитаминозы могут сопровождаться легкими парестезиями в конечностях, жжением в языке, умеренной макроцитарной (гиперхромной) анемией.  Суточная потребность 3 мг (у беременных 4 мг).  Участвует в переносе метильных групп, в синтезе нуклеиновых кислот, в обмене тетрагидрофолиевой кислоты. Недостаточность витамина В12 редко бывает экзогенной, несравненно чаще — эндогенной. Эта группа механизмов включает повышенное потребление витамина В12 (гельминтозы, особенно дифиллоботриоз; беременность) и нарушение его всасывания разной природы. Последнее может быть обусловлено отсутствием вырабатываемого фундальными железами желудка гастромукопротеина, необходимого для всасывания цианокобаламина (В12-дефицитная анемия, иногда рак или полипоз желудка, гастрэктомия, субтотальная резекция желудка) либо синдромом мальабсорбции (спру, тяжелые энтериты, энтеро-энтероанастомозы, резекция значительной части тонкой кишки и др.).  Выраженный эндогенный дефицит цианокобаламина вызывает нарушение обмена нуклеиновых кислот в бластных клетках эритроидного ряда, что приводит к развитию мегалобластной анемии. В боковых и задних канатиках спинного мозга развиваются дегенеративные и очаговые некротические изменения, завершающиеся склерозированием, в результате чего формируется синдром фуиикулярного миелоза.  Диагностика гиповитаминоза В12 на основе лишь клинических критериев весьма затруднена..  Лабораторное выявление даже нерезкой макроцитарной (нормо-, гипер-хромной) анемии существенно подкрепляет диагностику.  Обнаружение в костном мозге мегалобластов и мегалоцитов окончательно верифицирует диагноз.  После того как у больного клинически установлена недостаточность витамина В12, следует провести *дифференциальную диагностику* между экзогенной (алиментарной) недостаточностью, В12-дефицитной анемией, эндогенной симптоматической недостаточностью В12, обусловленной опухолевым поражением желудка (рак или полипоз), и ботриоцефальной анемией.  Вспомогательное значение имеет определение концентрации витамина В12 и его метаболитов в крови и моче.  При дефиците цианокобаламина его содержание в суточной моче ниже 20 нг, а метилмалоновой кислоты — выше 5 мг,  В сыворотке крови концентрация витамина В12 ниже 100 нг/мл.  Эти лабораторные исследования проводятся и при подозрении на экзогенное (алиментарное) развитие дефицита витамина В12 и во всех неясных случаях.    **Витамин А** **И КАРОТИН** |

|  |  |
| --- | --- |
| Витамин A является жирорастворимым витамином, поступающим с пищей и имеющим важное значение для функции репродуктивной системы, зрения, особенно сумеречного, функции эпителиальной ткани и для роста костей. Он содержится в основном во фруктах, овощах, яйцах, мясе, птице и рыбе. Каротин содержится в зеленых листовых овощах и желтых фруктах и овощах.  **Недостаточность витамина А** — патологическое состояние, возникающее вследствие дефицита в организме этого витамина и проявляющееся ухудшением зрения — в первую очередь гемералопией («куриная» слепота), конъюнктивитом, ксерофтальмией, гиперкератозом кожи. Характерна наклонность к заболеваниям дыхательных путей и кишечника.  **Патогенез**  Витамин А поступает в организм с пищей как в чистом виде, так и в виде провитаминов — каротиноидов.  Ретинол ускоряет окислительные процессы, стимулирует деятельность половых желез, способствует росту молодых животных, является антагонистом тироксина. Этот витамин необходим для нормального функционирования оболочек глаза, кожи, слизистой оболочки пищеварительного тракта, бронхиального дерева и мочевых путей. Он участвует в ресинтезе пигмента родопсина (зрительного пурпура), содержащегося в палочках сетчатой оболочки. При недостатке ретинола этот процесс нарушается, вследствие чего в первую очередь страдает сумеречное зрение — развивается гемералопия.  **Верификация диагноза**  Используют биомикроскопию глаза, определяют содержание в сыворотке крови витамина А или каротина. Исследуют темновую адаптацию зрения, которая при недостаточности ретинола существенно снижается.  Для авитаминоза А характерно сочетание гемералопии и ксерофтальмии на фоне резкого снижения содержания витамина А в крови (ниже 100 мкг/л). Наиболее опасным осложнением авитаминоза являются кератомаляция с последующими слепотой, панофтальмитом, а также вторичный гнойный энцефалит.  При гиповитаминозе А понижено содержание в крови ретинола или каротина (ниже 200 мкг/л), нарушена темновая адаптация, развивается гемералопия.  При биомикроскопии глаза на слизистой конъюнктивы могут выявляться белесые и желтоватые мелкие бляшки.  При длительном применении ретинола в больших дозах (100 000 ME и выше в сутки) могут развиться симптомы интоксикации («гипервитаминоз А»): тошнота, рвота, головная боль, гиперемия кожи, кровоизлияния в подкожную клетчатку и др.  ВИТАМИН A И КАРОТИН  Анализ включает определение уровня витамина A (ретинола) и его предшественника каротина. Метод качественного и количественного определения витамина A основан на цветной реакции, обусловленной окрашиванием некоторых реактивов при связывании их с витамином A или его предшественником.  Цель  • Оценить недостаточность или избыток витамина A.  • Уточнение причины куриной слепоты и ксерофтальмии.  • Уточнение причины некоторых кожных заболеваний, таких, как фолликулярный кератоз и ихтиоз.  • Выявление пациентов с синдромом нарушенного всасывания.  Подготовка  • Следует объяснить пациенту, что анализ позволяет определить уровень витамина A в крови.  • Пациент должен воздержаться от приема пищи начиная с вечера предыдущего дня; разрешается пить жидкости.  • Пациента необходимо предупредить, что для выполнения анализа у него возьмут кровь  из вены, а также сообщить, кто и когда будет брать кровь.  • Следует предупредить о возможных неприятных ощущениях во время наложения жгута на руку и пункции вены.  Процедура и последующий уход  • После венепункции набирают кровь в охлажденную 7-мил- лилитровую силиконизированную пробирку.  • Место венепункции придавливают ватным шариком до остановки кровотечения.  • При образовании гематомы в месте венепункции назначают согревающие компрессы.  • После взятия крови пациент вновь может перейти на обычную для него диету.  Меры предосторожности  • Пробу крови следует защитить от света, так как витамин A разрушается под действием света.  • Следует осторожно обращаться с пробой крови во избежание гемолиза.  • Пробирку с кровью следует поместить в контейнер со льдом.  Референтные значения. В норме уровень каротина в сыворотке крови составляет 10-85 мкг/дл (СИ: 0,19-1,58 мкмоль/л), витамина A - 30-80 мкг/дл (СИ: 1,05- 2,8 мкмоль/л).  Отклонение от нормы. Низкий уровень витамина A (гиповитаминоз A) может быть следствием нарушенного всасывания жиров в кишечнике, например, при целиакии, инфекционном гепатите, муковисцидозе и механической желтухе; он наблюдается также при белково-энергетической недостаточности (например, при квашиоркоре и хроническом нефрите).  Повышение уровня витамина A (гипервитаминоз A) является следствием избыточного поступления его с пищей или с пищевыми добавками. Оно наблюдается также при гиперлипемии и гиперхолестеринемии у пациентов с нелеченым сахарным диабетом.  Снижение уровня каротина в сыворотке крови указывает на нарушение всасывания жира и, реже, на недостаточное поступление его с пищей. Уровень каротина может быть низким и при беременности. Повышение уровня каротина в сыворотке крови является следствием избыточного его поступления с пищей.  Факторы, влияющие на результат анализа  • Несоблюдение требований (например, воздержание от еды), предъявляемых к анализу.  • Гемолиз, обусловленный неосторожным обращением с пробами крови.  • Минеральное масло, неомицин, холестирамин (снижают уровень витамина A).  • Глюкокортикоиды и пероральные контрацептивы (повышают уровень витамина A). | |
| **Витамин В6** |

|  |
| --- |
| **Недостаточность витамина В6** по типу гиповитаминоза — патологическое состояние, обусловленное дефицитом этого витамина в организме и проявляющееся в основном изменениями слизистой оболочки полости рта, кожи и функций ЦНС. Отдельной нозологической формы, признаваемой как авитаминоз В6, пока не выделено.  Большинство случаев гиповитаминоза В6 у взрослых являются вторичными. Недостаточность витамина В6 наблюдается при беременности и ряде заболеваний: хроническом алкоголизме, полиневрите, паркинсонизме, эпилепсии, себорейном дерматите, анемиях, ревматизме, хроническом гепатите, интоксикации гидразиновыми соединениями и др.  **Верификация диагноза**  При гиповитаминозе В6 содержание 4-пиридоксиновой кислоты в суточной моче ниже 0,5 мг, выделение ксантуреновой кислоты (после приема 10 г триптофана) превышает 50 мг. Содержание пиридоксииа в цельной крови ниже 50 мкг/л или пиридоксальфосфата ниже 3,6 нг/мл. Эти четыре параметра подтверждают гиповитаминоз В6. |

**ВИТАМИН В1**

Трудности определения потребности человека или животных в тиамине связаны в основном с невозможностью поставить для этих целей соответствующие балансовые опыты, так как значительная доля поступаю­щего в организм витамина подвергается многочисленным превращени­ям, которые до сих пор мало изучены. В связи с этим единственным критерием, являющимся контролем витаминной полноценности рациона, являются косвенные показатели, определяемые при анализе мочи и кро­ви у людей или еще и тканей у животных..

Решающим критерием обеспеченности организма тиамином является достоверность определения наличия или отсутствия витаминной недостаточности у обследуемых. Важными показателями наряду с определением самого витамина в данном случае являются метаболиты (альфа-кетокислоты), обмен которых зависит от ТДФ-содержащих ферментов или сами ферменты (дегидрогеназы, транскетолаза). Учитывая специфику клинических и экспериментальных исследований, рассмотрим кратко ценность перечисленных показателей в приложении к некоторым конкретным условиям и характеру материала, подвергае­мого анализу.

**Исследование мочи**

У людей содержание ви­тамина в суточной моче меньше 100 мкг принимается большинством авторов как свидетельство недостаточности тиамина. Однако при нор­мальном поступлении витамина с пищей его выведение с мочой зависит еще от характера медикаментозного лечения (если речь идет о больном) и состояния выделительной функции почек. Отдельные лечебные пре­параты могут резко снижать, а другие усиливать выведение витамина.

Повышенная экскреция тиамина не всегда может восприниматься как свидетельство насыщенности витамином, так как причиной может быть нарушение механизмов реабсорбции в канальцевом аппарате почек или недостаточное депонирование витамина вследствие нарушения процессов его фосфорилирования.

С другой стороны, низкое содержание тиамина в моче больных людей может быть обусловлено не его недостатком, а результатом частичного ограничения приема пищи, содержащей соответственно меньшее количество витамина.

В связи с этим с целью по­лучения дополнительных сведений о состоянии внутритканевого обмена тиамина довольно широко распространен метод исследования мочи после парентеральных нагрузок. Удобно проводить трехкратную нагрузку, исходя из дозы в 0,5 мг витамина на 1 кг веса больного, округляя вес до десятков килограммов.

Все методы определения тиамина обязательно должны проверяться на воспроизводимость получаемых с их помощью величин в случае при­сутствия в моче больных медикаментозных средств.

Известно, например, что салицилаты, хинин и другие препараты могут вызывать дополни­тельную флюоресценцию, мешая правильной интерпретации данных флюориметрии, а ПАСК, взаимодействуя непосредственно с феррициа-нидом, резко снижает выход тиохрома.

В экспериментальных условиях удобным показателем обеспеченности тиамином является определение уровня пирувата (ПК) в моче.

Необходимо помнить, что лишь выра­женные формы гиповитаминоза В1 сопровождаются отчетливым нако­плением этой кетокислоты, которая определяется чаще всего как бисульфитсвязывающие вещества (БСВ).

При патологических состояниях, осо­бенно когда речь идет о больных людях, уровень БСВ, как и количество самой ПК в моче, варьирует в весьма широких пределах в зависимости от интенсивности протекания углеводного обмена, а последний контро­лируется большим количеством различных факторов, прямо не связан­ных с тиамином. Показатели уровня БСВ или ПК в моче в подобных ситуациях должны использоваться лишь как дополнительные данные.

**Исследование крови**

Основной присутствующей в крови формой витамина является ТДФ. Досто­верный признак недостаточности витамина, если ориентироваться только на этот показатель, можно считать лишь величины ниже 30,0 нмоль/л. Менее приемлемо определение только общего тиамина. В норме это не вносит существенной ошибки, так как свободного витамина очень ма­ло— 30,0-45,0 нмоль/л.

Количество его в сыворотке крови может резко возрастать при ухудшении выделительной функции почек при гиперто­нической болезни или в связи с нарушением процесса фосфорилирования витамина.

Если упомянутые ограничения отсутствуют, то можно считать, что уровень тиамина в крови достаточно адекватно отражает обеспеченность им организма.

При исследовании крови, как и мочи, широко используется опреде­ление концентрации ПК. Важно применять для этих целей более специ­фический метод (ферментативный, хроматографический), так как реак­ции с бисульфитом или салициловым альдегидом дают завышенные результаты.

Если ПК определяют для характеристики обмена витамина у больных, необходимо считаться с большим количеством факторов, не связанных с этим витамином, но активно влияющих на обмен, а сле­довательно, и уровень ПК в организме. Так, увеличение уровня ПК кро­ви наблюдается при введении адреналина, АКТГ, при физической на­грузке, электрическом и инсулиновом шоке, недостаточности витаминов А и D, многих инфекционных и других заболеваниях, когда часто труд­но заподозрить недостаточность тиамина. В эксперименте показано, что в ряде случаев уровень ПК крови больше коррелирует с гиперфункцией системы гипофиз — кора надпочечников, чем с обеспеченностью орга­низма витамином.

Поскольку имеются трудности выявления истинного состояния тиаминового обмена по содержанию в крови самого витамина или уровню кетокислот, можно использовать для этих целей определение активности ТДФ-содержащих ферментов, в частности транскетолазы (ТК) эритроцитов. Для этого фермента даже незначительные сдвиги в концентрации кофермента заметно сказываются на активности всей системы.

Наблюдения в клинике и при профилактических осмотрах населения, эксперименты на животных подтверждают весьма высокую чувствительность ТК даже к легкой недостаточности витамина. Фер­мент реагирует даже тогда, когда изменения со стороны уровня ПК или самого витамина в крови не показательны. Для блльщей точности сейчас используется метод дополнительной активации ТК добавляемой in vitro к гемолизату эритроцитов ТДФ. Стимуляция ТК до 15% исходной актив­ности принимается соответствующей норме, от 15 до 25%—гиповита­минозу, более 20—25% — авитаминозу.

**ВИТАМИН B2**

Витамин B2 (рибофлавин) необходим для нормального роста и жизнедеятельности тканей. Определение уровня витамина B2 в сыворотке крови - более точный и надежный метод, чем определение его в моче, так как, например, после хирургических операций или при длительном голодании уровень витамина B2 в моче оказывается завышенным.

Цель - выявить недостаточность витамина B2.

Подготовка

• Следует объяснить пациенту, что анализ необходим для определения уровня витамина B2.

• Каких-либо ограничений в диете перед анализом не требуется.

• Пациента необходимо предупредить, что для выполнения анализа у него возьмут кровь из вены, а также сообщить, кто и когда будет брать кровь.

• Следует предупредить о возможных неприятных ощущениях во время наложения жгута на руку и пункции вены.

Процедура и последующий уход

• После венепункции набирают 4,5 мл крови в силиконизированную пробирку.

• Место венепункции придавливают ватным шариком до остановки кровотечения.

• При образовании гематомы в месте венепункции назначают согревающие компрессы.

• Пациентам с недостаточностью витамина B2 следует указать продукты с большим содержанием этого витамина (молочные продукты, паренхиматозные органы, например печень и почки, рыба, зеленые листовые овощи, бобы, злаки и витаминизированный хлеб).

Меры предосторожности

• Следует осторожно обращаться с пробой крови во избежание гемолиза.

• Пробу крови следует сразу отправить в лабораторию.

• Пробу крови не следует охлаждать или замораживать.

Референтные значения. Нормальный уровень витамина B2 в сыворотке крови составляет 3-15 мкг/дл; уровень от 2 до 3 мкг/дл считается низким, а уровень ниже 2 мкг/дл - очень низким.

Отклонение от нормы. Низкий уровень витамина B2 указывает на гиповитаминоз B2, который может быть обусловлен недостаточным поступлением витамина с пищей, синдромом нарушенного всасывания или повышенной потребностью в витамине B2, например при стрессе.

Факторы, влияющие на результат анализа. Гемолиз, обусловленный неосторожным обращением с пробой крови.

**ВИТАМИН B12**

Уровень витамина B12 в сыворотке крови определяют радиоиммунологическим методом обычно одновременно с уровнем фолиевой кислоты. Витамин B12 (кобаламин, антианемический витамин) - водорастворимый витамин, содержащий кобальт, - необходим для нормального роста и кроветворения, для синтеза ДНК, миелина и нормальной функции ЦНС. Он содержится почти исключительно в животных продуктах, таких, как мясо, моллюски, молоко, яйца.

Цель

• Дифференциальная диагностика мегалобластной анемии, причиной которой может быть недостаточность как витамина B12, так и фолиевой кислоты.

• Дифференциальная диагностика заболеваний ЦНС, проявляющихся симптомами поражения миелиновых волокон спинного мозга и периферических нервов.

Подготовка

• Пациенту объясняют, что анализ необходим для определения уровня витамина B12 в крови.

• Пациент должен воздержаться от приема пищи с вечера предыдущего дня.

• Пациента необходимо предупредить, что для выполнения анализа у него возьмут кровь из вены, а также сообщить, кто и когда будет брать кровь.

• Следует предупредить о возможных неприятных ощущениях во время наложения жгута на руку и пункции вены.

• Следует выяснить, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа, и указать их в бланке направления в лабораторию.

Процедура и последующий уход

• После венепункции набирают кровь в 4,5-миллилитровую силиконизированную пробирку.

• Место венепункции придавливают ватным шариком до остановки кровотечения.

• При образовании гематомы в месте венепункции назначают согревающие компрессы.

• После взятия крови пациент вновь может перейти на обычную для него диету.

Меры предосторожности

• Следует осторожно обращаться с пробой крови во избежание гемолиза.

• Пробирку с кровью следует сразу отправить в лабораторию.

Референтные значения. В норме уровень витамина B12 колеблется от 200 до 900 пг/мл (СИ: 148-664 пмоль/л).

Отклонение от нормы. Низкий уровень витамина B12 в крови может быть следствием недостаточного его поступления (особенно если пациент строго придерживается вегетарианской пищи), нарушенного его всасывания (например, при целиакии), изолированного нарушения всасывания витамина B12, повышенной

потребности в нем в результате усиления обмена (например, при гипертиреозе), при поражениях ЦНС (заднебоковой склероз, фуникулярная дегенерация). Повышенный уровень витамина B12 наблюдается при избыточном поступлении его с пищей, при заболеваниях печени, таких, как цирроз, острый и хронический гепатит, а также миелопролиферативных заболеваниях, в частности миелоцитарном лейкозе.

Факторы, влияющие на результат анализа

• Несоблюдение диетических ограничений перед анализом, прием препаратов, нарушающих всасывание витамина B12.

• Неомицин, метформин, противосудорожные, этанол (снижают уровень витамина B12).

• Пероральные контрацептивы (повышают уровень витамина B12).

**ФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА**

Уровень фолиевой кислоты (птероилглутаминовая кислота, фолацин или фолат) в сыворотке крови определяют радиоизотопным методом, основанным на конкурентном связывании фолиевой кислоты. Обычно одновременно определяют также уровень витамина B12. Подобно витамину B12 фолиевая кислота является водорастворимым витамином и участвует в гемопоэзе, синтезе ДНК и тканей организма в целом.

Фолиевая кислота содержится в таких продуктах, как печень, почки, дрожжи, фрукты, листовые овощи, витаминизированный хлеб, злаки, яйца, молоко. Недостаточное поступление фолиевой кислоты с пищей вызывает гиповитаминоз. Такое состояние возможно, например, при беременности. Учитывая важную роль фолиевой кислоты в гемопоэзе, основным показанием для определения уровня ее в крови обычно бывают нарушения кроветворения.

Цель

• Дифференциальная диагностика мегалобластной анемии, причиной которой может быть недостаточность как фолиевой кислоты, так и витамина B12.

• Оценка запасов фолиевой кислоты у беременных.

Подготовка

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет определить уровень фолиевой кислоты в крови.

• Пациент должен воздержаться от приема пищи с вечера предыдущего дня.

• Пациента необходимо предупредить, что для выполнения анализа у него возьмут кровь из вены, а также сообщить, кто и когда будет брать кровь.

• Следует предупредить о возможных неприятных ощущениях во время наложения жгута на руку и пункции вены.

• Следует выяснить, не принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (фенитоин, пириметамин).

Процедура и последующий уход

• После венепункции набирают кровь в 4,5-миллилитровую пробирку без добавок.

• Место венепункции придавливают ватным шариком до остановки кровотечения.

• При образовании гематомы в месте венепункции назначают согревающие компрессы.

• После взятия крови пациент вновь может перейти на обычную для него диету.

Меры предосторожности

• Следует осторожно обращаться с пробой крови во избежание гемолиза.

• Пробу крови следует защитить от воздействия света.

• Пробу крови следует сразу отправить в лабораторию.

Референтные значения. В норме уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови составляет 1,8- 9 нг/мл (СИ: 4-20 нмоль/л). Отклонение от нормы. Низкий уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови вызывает изменения в картине крови, такие, как анемия (особенно мегалобластная), лейкопения, тромбоцитопения. Для исключения недостаточности витамина B12, которая также вызывает мегалобластную анемию, ставят пробу Шиллинга. Сниженный уровень фолиевой кислоты наблюдается также при усилении обмена (например, при гипертиреозе), недостаточном поступлении с пищей, синдроме нарушенного всасывания, заболеваниях печени и почек, хроническом алкоголизме и беременности.

Повышенный уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови свидетельствует о чрезмерном поступлении ее с пищей или пищевыми добавками. Однако даже при избыточном поступлении фолиевая кислота не оказывает токсического действия.

Факторы, влияющие на результат анализа

• Гемолиз, обусловленный неосторожным обращением с пробой крови.

Алкоголь, фенитоин, пириметамин, противосудорожные (примидон), противоопухолевые и противомалярийные препара-

ты, пероральные контрацептивы снижают уровень фолиевой кислоты.

**Витамин Е**

Витамин Е обладает антиоксидантными свойствами, т.е. защищает полиненасыщенные жирные кислоты и липиды клеточных мембран от перекисного окисления и повреждения свободными радикалами. Токоферол может выполнять структурную функцию, взаимодействуя с фосфолипидами биологических мембран. Имеются данные, что in vitro  
токоферол снижает продукцию простагландина и уменьшает агрегацию тромбоцитов.

Известно, что длительная недостаточность токоферола у крысы обусловливает стерильность самцов, выкидыш и рассасывание плодов у самок. Дефицит его у морских свинок приводит к поражениям миокарда и скелетной мускулатуры. Существуют данные, что мегалобластическая анемия у человека, резистентная к витамину В12 и фолиевой кислоте, может корригироваться при лечении витамином Е. Низкое содержание токоферола в плазме человека наблюдается при таких состояниях, как тромбоцитоз, периферические отеки. Не являясь основной причиной, токоферол имеет определенное значение в развитии фиброплазии у новорожденных, нейромышечной патологии у детей и неврологических заболеваний у взрослых.

Источниками витамина Е являются растительные масла, молоко, яичный желток, зеленые листья салата. Как и другие жирорастворимые витамины, витамин Е хорошо всасывается в верхних отделах тонкой кишки и поступает в кровяное русло через лимфатическую систему. В крови связывается с бета-липопротеидами. Около 80% введенного в организм токоферола через неделю экскретируется с желчью, а небольшая часть выводится в виде метаболитов с мочой.

Методы обнаружения витаминов

Жирорастворимые витамины и методы их обнаружения

**Методы определения витамина Е**

При определении содержания витамина Е обычно применяют колориметрическую реакцию, зависящую от окислительновосстано-вительного потенциала исследуемого вещества, часто определяют общее количество восстанавливающих веществ, а не токоферолов.

Для количественного определения токоферолов используют их способность окисляться хлорным железом. Реакцию проводят в присутствии а, а1-дилиридила или 2,4,6-трипиридил-8-триазина, которые образуют окрашенный в красный цвет комплекс с получающимся в результате реакции двухвалентным железом. Фотометрически измеряют величину оптической плотности раствора, которая соответствует количеству прореагировавшего токоферола. Этот принцип положен в основу определения содержания токоферолов в сыворотке или плазме крови.

При исследовании тканей данный метод может быть применен лишь после отделения витамина Е от убихинонов и убихроменолов.

В последнее время для определения витамина Е в пищевых продуктах, биологических тканях и жидкостях особенно перспективным является метод газожидкостной хроматографии.

**Метод определения a-токоферола (витамина Е) в сыворотке(плазме) крови**

1. Принцип метода.

Метод основан на определении ионов двухвалентного железа, образующихся при взаимодействии а-токоферола с хлорным железом (Fe3), в виде окрашенного комплекса Fe с ортофенантролином (ОФ) или батофенанторлином (БФ).

2. Реактивы.

2.1. Спирт этиловый, 96%.

2.2. Гексан, хч.

2.3. Бензол, перегнанный.

2.4. 0,025% раствор хлорного железа в эталоне (25 мг FeCl3 растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят этанолом еще в 10 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

2.5. 0,05% раствор орто- или батофенантролина в этаноле (25 мг ОФ или БФ растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят еще в 5 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

3. Оборудование и аппаратура.

3.1. Спектрофотометр.

3.2. Весы аналитические.

3.3. Баня водяная.

3.4. Центрифуга.

3.5. Секундомер.

3.6. Баллон с газообразным азотом.

3.7. Пипетки измерительные.

3.8. Пробирки центрифужные и химические.

3.9. Пробирки с притертыми пробками.

4. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

5. Ход определения.

5.1. В пробирки с притертыми пробками вносят по 1 мл сыворотки крови и приливают по 1 мл этилового спирта. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

5.2. К пробам добавляют 3 мл гексана и энергично встряхивают в течение 2-х минут.

5.3. Пробы после встряхивания переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 минут при 2500-3000 об/мин.

5.4. Из верхнего гексанового слоя отбирают по 2 мл, переносят в чистые химические пробирки и в них выпаривают гексан в токе азота на водяной бане при температуре не выше 50°С.

5.5. Сухой остаток растворяют в 1 мл бензола, прибавляют по 1 мл 0,025% раствора хлорного железа и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 минут.

5.6. К пробам (по одной) приливают по 1 мл 0,05% раствора ортофенан-тролина (или батофенантролина) и ровно через 2 минуты (по секундомеру) измеряют оптическую плотность (Еоп) при длине волны 510 нм (при использовании ортофенантролина) или при 535 нм (при использовании батофенантролина) против пробы, содержащей 1 мл бензола и 2 мл этилового спирта.

5.7. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 1 мл бензола, 1 мл раствора хлорного железа, 1 мл раствора орто- или батофе-нантролина.

Оптическую плотность контрольной пробы (Ек) измеряют также через 2 минуты (по секундомеру) после добавления ОФ или БФ.

5.8. При определении витамина Е в сыворотке крови крупного рогатого скота, содержащей много каротина, после центрифугирования верхний гексановый слой по возможности максимально переносят в чистые химические пробирки и измеряют оптическую плотность проб при 462 нм против чистого гексана (Е462). Далее отбирают по 2 мл гексанового экстракта, переносят его в новые химические пробирки и далее продолжают согласно п. 5.4.

6. Построение калибровочного графика.

4,31 мг а-токоферола (фирмы Serva, Германия) растворяют в 100 мл бензола (концентрация полученного раствора - 100 мкМ/л). Из этого раствора готовят основной раствор с концентрацией а-токоферола - 40 мкМ/л. Из основного раствора путем разбавления бензолом готовят рабочие стандартные растворы в интервале концентраций от 1 до 30 мкМ/л.

Для построения калибровочной кривой берут по 1 мл каждого из стандартных рабочих растворов (в двух-трех повторностях) прибавляют по 1 мл 0,025% раствора хлорного железа и далее обрабатывают также как и опытные пробы согласно п. 5.6.

На миллиметровой бумаге по оси абцисс откладывают значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат - соответствующие им значения оптических плотностей (Е) равных разнице между оптической плотностью каждого стандартного раствора и оптической плотностью контрольной пробы.

7. Расчет результатов.

Количество а-токоферола (витамина Е), участвующего в реакции, определяют по калибровочной кривой, учитывая, что:

- Е = Еоп - Ек

- для крупного рогатого скота Е = (Еоп - Ек) - (Е462 х 0,217). Концентрацию витамина Е в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

25

С - содержание витамина Е в сыворотке, мкМ/л;

А - количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой;

3 - общее количество гексанового экстракта;

2 - объем выпаренного гексанового экстракта

8**. Примечание**.

8.1. Сыворотка может хранится в холодильнике при 0-4°С не более двух недель.

8.2. Пробы при исследовании необходимо беречь от прямого попадания света.

Качественная реакция на витамин Е

Взаимодействие а-токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления а-токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (Ш) а-токоферол окисляется до а-токоферилхинона — соединения, окрашенного в красный цвет.

Ход работы

Реакция с азотной кислотой. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания.

Реакция с хлорным железом. В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора а-токоферола, затем

1 мл 1 %-го раствора хлорного железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

Качественные реакции на витамин А

Цель: ознакомление с реакциями обнаружения витамина А. Витамин А в присутствии хлороформного раствора треххлористой сурьмы приобретает синюю окраску. Механизм реакции неизвестен. При добавлении концентрированной серной кислоты витамин А дает красное окрашивание, переходящее в красно-бурое, а при реакции с сульфатом железа (II) в кислой среде дает красно-розовое соединение.

Реакция с треххлористой сурьмой. В сухую пробирку вносят две капли масляного раствора витамина А (свежего рыбьего жира) и добавляют 2—3 капли 33% -го хлороформного раствора треххлористой сурьмы; при смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет.

Реакция Друммонда с концентрированной серной кислотой. В сухую пробирку по стенке опускают 3 капли

масляного раствора витамина А или рыбьего жира. Вслед за этим сюда же осторожно опускают каплю серной кислоты. В месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в вишнево-красное.

Реакция с сульфатом железа (II). В пробирку к 2 каплям, масляного раствора витамина А или рыбьего жира приливают 5—10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (И), 1—2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

Количественное определение витамина А в рыбьем жире

Метод основан на колориметрическом определении интенсивности окраски, которая образуется при реакции витамина А с треххлористой сурьмой в присутствии уксусного ангидрида. Материал исследования: рыбий жир — хлороформ (1 : 10).

Ход работы.

В пробирку к 0,4 мл хлороформного раствора рыбьего жира прибавляют 1-2 капли уксусного ангидрида (для предупреждения появления мути) и 4 мл 33%-го раствора треххлористой сурьмы в хлороформе. Спустя 10 мин фотометрируют при 620 нм (красный светофильтр) против раствора треххлористой сурьмы.

Концентрацию витамина А в рыбьем жире находят по калибровочному графику, где каждому значению найденной экстинкции соответствует определенное содержание витамина А в 0,4 мл раствора.

Построение калибровочного графика производится с помощью стандартного концентрата витамина А в рыбьем жире. Если содержание витамина А в 1 мл концентрата составляет 500 ед. (интернациональные единицы), то для приготовления первоначального раствора берут 10 мл рыбьего жира и растворяют в 50 мл хлороформа. Из 1 мл этого раствора готовят разведения таким образом, чтобы в 0,4 мл этого раствора содержалось от 20 до 80 ед. витамина А. Стандартные растворы обрабатывают треххлористой сурьмой и определяют оптическую плотность. Полученные данные используют для построения калибровочного графика. Сопепжание витамина А в 1 мл рыбьего жира определяют по формуле 9:

image6 (9)

С — содержание витамина А в 1 мл рыбьего жира (в ед.)

а — количество витамина А в 1 мл исследуемого раствора — для этого количество витамина А, найденное по графику в 0,4 мл раствора, разделить на 0,4 (в ед.),

У — общий объем исследуемого хлороформного раствора рыбьего жира (мл),

Q — взятое на анализ количество рыбьего жира (мл).

Качественная реакция на витамин D

В сухую пробирку к 2 мл витамина D доливают 0,2 мл насыщенного раствора хлорида сурьмы (V). Наблюдается появление желтого окрашивания.

Качественная реакция на витамин К

В пробирку к 2 мл спиртового раствора витамина К прибавляют 2 мл 5% -го раствора диэтилдитиокарбамата и 0,5 мл 2%-го раствора гидроксида натрия в этаноле. Раствор приобретает голубое окрашивание.

Водорастворимые витамины и методы их обнаружения

**Витамин C**

Этот водорастворимый витамин легко всасывается в кишечнике, принимает участие в процессе метаболизма (в качестве обратимого восстановителя), синтезе коллагена и обмене соединительной и костной ткани.

Уровень витамина C определяют в плазме крови методом химического анализа. Витамин C, или аскорбиновая кислота, является водорастворимым витамином, который необходим для синтеза коллагена и нормальной жизнедеятельности хрящевой и костной ткани; он способствует всасыванию железа, влияет на метаболизм фолиевой кислоты и ослабляет разрушительное действие на организм инфекции и стресса. Много витамина C содержится в цитрусах, ягодах, томатах, свежей капусте, зеленом перце, зеленых листовых овощах и витаминизированных соках. При цинге, которая является проявлением тяжелой недостаточности витамина C, отмечаются ломкость капилляров и повышенная их проницаемость, поражение суставов и других органов и систем. Цель - диагностика цинги, истощения, синдрома нарушенного всасывания.

Подготовка

• Следует объяснить пациенту, что анализ необходим для определения уровня витамина C в крови.

• Пациент должен воздержаться от приема пищи с полуночи предыдущего дня.

• Пациента необходимо предупредить, что для выполнения анализа у него возьмут кровь из вены, а также сообщить, кто и когда будет брать кровь.

• Следует предупредить о возможных неприятных ощущениях во время наложения жгута на руку и пункции вены.

Процедура и последующий уход

• После венепункции набирают кровь в 4,5-миллилитровую пробирку с гепарином.

• Место венепункции придавливают ватным шариком до остановки кровотечения.

• При образовании гематомы в месте венепункции назначают согревающие компрессы.

• После взятия крови пациент вновь может перейти на обычную для него диету.

Меры предосторожности

• Следует осторожно обращаться с пробой крови во избежание гемолиза.

• Пробирку с кровью следует сразу отправить в лабораторию.

Референтные значения. Нормальный уровень витамина C в плазме крови колеблется от 0,2 до 2 мг/дл (СИ: 11-114 мкмоль/л). Отклонение от нормы Уровень витамина C, равный 0,3 мг/дл (16 мкмоль/л), указывает на выраженную недостаточность этого витамина. Снижение уровня витамина C наблюдается при беременности и в меньшей степени в послеродовом периоде, а также при инфекциях, лихорадке и анемии. Тяжелая недостаточность витамина C вызывает цингу.

Повышенный уровень витамина C отмечается при чрезмерном поступлении его с пищей.

Избыток витамина C превращается в организме в щавелевую кислоту и выводится с мочой. Повышенное содержание щавелевой кислоты в моче способствует образованию мочевых камней.

Факторы, влияющие на результат анализа

• Несоблюдение диетических ограничений перед анализом.

• Гемолиз, обусловленный неосторожным обращением с пробой крови.

• Несвоевременная отправка пробы крови в лабораторию.

**Определение уровня витаминов B и C**

**Тест с применением триптофана**

Определение в моче уровня ксантуреновой кислоты после приема триптофана (провокационная проба) позволяет диагностировать недостаточность витамина B6 задолго до появления первых клинических проявлений. Несмотря на то что витамин B6 не принимает непосредственного участия в энергетическом обмене, он играет существенную роль в метаболизме белка и синтезе аминокислот. Недостаточность витамина B6 может стать причиной развития гипохромной микроцитарной анемии (при отсутствии дефицита железа) и поражения ЦНС. Недостаточность витамина B6 в сочетании с нормальным уровнем магния в крови и моче приводит к снижению растворимости цитратов и оксалатов, что в свою очередь повышает риск нефролитиаза. Цель- выявить недостаточность витамина В6. Подготовка

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволяет оценить запасы витамина B6 в организме.

• Пациента предупреждают, что для проведения исследования ему потребуется принять лекарственный препарат.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют суточную мочу.

• Сотрудники лаборатории и лечащий врач должны знать, принимает ли пациент препараты, которые могут повлиять на результат анализа (в некоторых случаях от их применения необходимо воздержаться).

Процедура и последующий уход

• В начале исследования пациент принимает L-триптофан (как правило, для взрослых доза составляет 2 г/кг, для детей - 50 мг/кг).

• Пациент опорожняет мочевой пузырь (мочу сливают). В последующие 24 ч он собирает всю мочу в специальный контейнер.

• Больного с недостаточностью витамина B6 информируют о продуктах, богатых пиридоксином (дрожжи, пшеница, кукуруза, печень, почки).

• После сбора мочи пациент может возобновить прием препаратов.

Меры предосторожности

• В контейнер для сбора мочи необходимо добавить кристаллы тимола (в качестве консерванта).

• Пациент должен следить за тем, чтобы проба мочи не оказалась загрязненной туалетной бумагой или каловыми массами.

• Контейнер с мочой необходимо хранить в холодильнике или во льду в течение всего процесса ее сбора.

Референтные значения. В норме при провокационной пробе с триптофаном экскреция ксантуреновой кислоты с мочой не превышает 50 мг/сут. Отклонение от нормы. Если экскреция ксантуреновой кислоты с мочой превышает 100 мг/сут, это указывает на недостаточность витамина B6. Это редкое состояние может быть следствием нарушения питания, злокачественных опухолей или беременности, а также наблюдается при семейной ксантуреновой ацидурии или применении пероральных контрацептивов, гидралазина, D-пеницилламина и изониазида.

Факторы, влияющие на результат анализа

• Загрязнение пробы мочи туалетной бумагой или каловыми массами.

• Неправильное обращение с пробой мочи.

• Применение пероральных контрацептивов, гидралазина, D-пеницилламина и изониазида (снижение экскреции ксантуреновой кислоты).

**Экскреция витамина C**

Определение уровня витамина С (аскорбиновая кислота) в моче колориметрическим методом позволяет судить о его количестве в организме.

Определение уровня витамина C в моче имеет особое значение при диагностике цинги - заболевания, характеризующегося выраженной недостаточностью витамина С, дегенерацией соединительной и костной ткани, дентина и эндотелия. В Северной Америке цинга практически не встречается, однако может развиваться у больных алкоголизмом, лиц, придерживающихся диеты с низким содержанием клетчатки и цитру-

совых, и детей, которых вскармливают коровьим молоком, не обогащенным витамином C. Цель - диагностика цинги, цингоподобных состояний и метаболических расстройств, например, связанных с неполноценным питанием или истощением, которые сопровождаются нарушением окислительных процессов.

Подготовка

• Пациенту следует объяснить, что анализ позволит диагностировать недостаточность витамина C.

• Пациент может придерживаться обычной диеты.

• Пациенту сообщают, что для анализа используют суточную мочу, и объясняют, как ее собирать.

Процедура и последующий уход

• В течение 24 ч мочу собирают в специальный контейнер; первую (утреннюю) порцию мочи сливают, а последнюю сохраняют для анализа.

• Больного с недостаточностью витамина C информируют о продуктах с богатым содержанием этого витамина (цитрусовые, томаты, картофель, кочанная капуста, земляника).

Меры предосторожности

• Пациент должен следить за тем, чтобы проба мочи не оказалась загрязненной туалетной бумагой или каловыми массами.

• Контейнер с мочой необходимо хранить в холодильнике или во льду в течение всего процесса ее сбора.

Референтные значения. В норме экскреция витамина С с мочой составляет 30 мг/сут. Отклонение от нормы. Снижение уровня витамина С в моче отмечается при инфекционных заболеваниях, раковых опухолях, ожогах и других стрессовых ситуациях. Кроме того, это возможно при нарушении питания или функции почек, синдроме мальабсорбции и длительной инфузионной терапии без восполнения потребности в витамине С. Выраженный дефицит витамина С приводит к развитию цинги.

Факторы, влияющие на результат анализа

• Неправильный сбор и хранение мочи (например, оставление ее на свету).

• Загрязнение пробы мочи туалетной бумагой или каловыми массами.

**Количественное определение витамина С методом йодометрического титрования**

Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем и может быть определена йодометрически при определенном значении pH раствора (например, pH = 7). При титровании йодом аскорбиновая кислота окисляется, образуя дегидроаскорбиновую кислоту.

Подготовка экстракта из пищевых продуктов для определения витамина С.

1 г капусты или картофеля натереть на терке в чашке Петри или мелко порезать и растереть в ступке с небольшим количеством толченого стекла или песка. Затем, если измельчали на терке, собрать массу из чашки Петри в стаканчик, если в ступке — прямо в ступку добавить 10 мл 2%-го раствора НС1. Хорошо перемешанную массу отфильтровать через стеклянную воронку с ватой в коническую колбу на 50—100 мл. Массу на фильтре промыть несколькими каплями воды. В фильтрат прилить 1 мл 0,5%-го раствора крахмала и титровать рабочим раствором 0,003 н. Ь до появления синего окрашивания.

При расчете содержания витамина С в продукте использовать формулу 10 определения массы при помощи титра по определяемому веществу;

(10)

н. — молярная концентрация эквивалента йода;

Э - молярная масса эквивалента аскорбиновой кислоты в г, равная в данном случае 88 г;

V — объем пошедшего на титрование йода, в мл.

Для пересчета на содержание витамина С в 100 г продукта использовать формулу 11:

(11)

Полученный результат сравнить с нормой: содержание витамина С в капусте 45 мг%, в картофеле —20 мг%.

Реакция с диазореактивом на тиамин (витамин В1)

В основе реакции лежит способность витамина B1 в щелочной среде с диазореактивом (смесь солянокислого или сернокислого раствора сульфаниловой кислоты с раствором нитрита натрия) образовывать сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

Ход работы.

В пробирку приливают 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и 1 мл раствора нитрита натрия. Образуется диазореактив (см. в «Приложениях»), Сюда же вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка или 0,5 мл раствора тиамина и по стенке пробирки осторожно добавляют 1 мл 20%-го раствора бикарбоната натрия.

На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета или красного цвета.

Реакция восстановления рибофлавина (витамина В2)

Образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте водород восстанавливает желтый рибофлавин сначала в родофлавиы (промежуточное соединение) красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин.

Ход работы.

В пробирку приливают 1 мл раствора витамина В6, 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавин вновь окисляется, кислородом воздуха в рибофлавин.

Реакция на витамин РР (антипеллагрический)

При нагревании витамина РР с раствором ацетата меди. Образуется плохо растворимый синий осадок медной соли витамина РР.

Ход работы.

В пробирку помещают 5—10 мг витамина РР и растворяют при нагревании в 1—2 мл 10% -го раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору прибавляют такой же объем 5%-го раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Реакция на пиридоксин (витамин В6)

При взаимодействии пиридоксина с раствором хлорида железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексной соли типа фенолята железа.

Ход работы.

В пробирке смешивают 1 мл водного раствора пиридоксина и 2 капли 5%-го раствора хлорида железа (III). Смесь встряхивает. Наблюдают окрашивание жидкости в красный цвет.

Реакция на цианокобаламин (витамин В12).

При действии сильного окислителя на витамин В12 происходит его разрушение. Кобальт, входящий в состав витамина, при этом высвобождается. Его обнаружение производят с помощью α-нитрозо-β-нафтола, с которым кобальт образует комплексное соединение оранжево-красного цвета.

Ход работы.

Половину содержимого витамина В12 из ампулы переносят в фарфоровый тигель, выпаривают досуха и прокаливают на небольшом огне. После охлаждения доливают 1 мл концентрированной азотной кислоты и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятят в вытяжном шкафу до полного испарения жидкости и охлаждают. Растворяют осадок в капле воды, прибавляют 1 каплю ацетонового раствора α-нитрозо-β-нафтола. и каплями раствор гидрофосфата натрия до слабощелочной реакции (по лакмусу). При наличии ионов кобальта появляется буро-красное окрашивание, если ионов кобальта нет, окрашивание — желто-зеленое.

Реакции на витамин Р (рутин)

Хлорид железа (III) образует с рутином комплексные соединения, окрашенные в изумрудно­зеленый цвета. Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавонолами флавилиевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску, При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула рутинозы. Затем рутиноза распадается на глюкозу и рамнозу, которые обладают восстанавливающими свойствами.

Ход работы

Реакция рутина с хлоридом железа (III) К 2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 5%-го раствора FeCl3. Наблюдают появление зеленого окрашивания.

Реакция рутина с концентрированной серной кислотой.

К 2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по cтенке пробирки доливают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо. Реакция рутина с реактивом Фелинга: к 0,5 г рутина прибавляют 5 мл 20%-го раствора соляной кислоты, кипятят в течение 1 мин, затем фильтруют. К фильтрату доливают 3 мл 20%-го раствора гидроксида натрия и 3 мл свежеприготовленного реактива Фелинга. Снова нагревают до кипения. Наблюдают образование красного осадка закиси меди.

**Контрольные вопросы к теме 12:**

1. Каково химическое строение и биологическая роль витаминов A, D, Е, К, F?
2. Принцип метода количественного определения витамина А.
3. Принципы методов качественного обнаружения витаминов A, D, Е, К.
4. Методы определения витамина С.
5. Методы определения витаминов группы В.
6. Методы определения витаминов Р и РР.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Биохимия человека в 2-х томах. /Р.Мари, Д.Греннер, П.Мейс и др. (Пер. с англ.) – М.: Мир, 1993. – Т.1. – 384с., Т.2. – 415 с..

2. Горбачёв В.В. Витамины, микро- и макроэлементы. Справочник./В.В.Горбачёв, В.Н.Горбачёва. – Минск: Книжный дом; Интерпресс-сервис, 2002. – 544с.

3. Зайчик А.Ш. Основы патохимии /А.Ш.Зайчик, Л.П.Чурилов. – СПб.: Элби – СПб., 2001.– 687 с.

4. Минделл Эрл. Справочник по витаминам и минеральным веществам / Эрл Минделл (Пер. с англ.). – М.: Изд-во: «Медицина и питание», 2000.– 432 с.

5. Эллиот В. Биохимия и молекулярная патология / В.Эллиот, Д.Эллиот. -М.: НИИ Биомедицинской химии РАМН; ООО «Материк – альфа», 2000. – 353 с.

6. Modern nutrition in health and nutririon // ed M.Shils, J.A.Olson, M.Shike. – Lea G.Fibeger, 1994. – 891 p.

7. Walter P.Towards ensuring the safety of vitamins and minerals / P.Walter // EUROTOX, 2000. – Toxicol. Lett. – 2001. – 120, №3. – Р. 83 – 87.