

1. Týždeň

Diferenciálna diagnostika megaloblastickej anémie

Teoretická časť:

Vitamíny patria do skupiny organických zlúčenín, ktoré sú pre človeka esenciálne. Vitamíny možno rozdeliť na základe viacerých kritérií, jedným z nich je ich rozpustnosť:

- ✓ vo vode rozpustné: tiamín, riboflavín, niacín, kyselina pantoténová, biotín, kobalamín, kyselina listová, pyridoxín a vitamín C. Vitamíny tejto skupiny sú v prípade ich zvýšeného príjmu ľahko z organizmu vylučované – močom. Ich toxicita pre organizmus je preto nízka. Naopak v prípade ich zníženého príjmu, alebo zvýšenej potreby, sa môže prejaviť ich nedostatok.
- ✓ rozpustné v tukoch: A, D, E a K. Z potravy sú uvoľňované, resorbované a transportované v krvnom riečisku prostredníctvom chylomikrónov. Viaceré z nich sa v organizme ukladajú do zásob a ich vylučovanie nie je také jednoduché. Preto je potrebné zbytočne nezaťažovať organizmus ich vysokými dávkami, ktoré by mohli pôsobiť na organizmus toxicky (známe sú najmä hypervitaminózy u vitamínu A a D).

Všetky vitamíny rozpustné vo vode sa po premene na aktívne formy (koenzýmy) zúčastňujú na viacerých enzýmových reakciách ako nebielkovinová zložka enzýmu. Väčšina z nich (komplex vitamínov B) sa zapája ako koenzýmy najmä do intermediárneho metabolizmu. Vitamín C je koenzýmom viacerých hydroxylačných reakcií (*prolyl hydroxyláza*, *lyzyl hydroxyláza*, *dopamín hydroxyláza*) s významom hlavne pri tvorbe spojivového tkaniva či syntéze katecholamínov. Kyselina listová zohráva vo svojej aktívnej forme ako tetrahydrolistová kyselina (THF) dôležitú úlohu pri prenose jednouhlíkových zvyškov (hydroxymetyl-, metylén-, metenyl-, metyl-, formyl-) z aminokyselín serín, glycín, histidín, tryptofán na syntézu purínových nukleotidov *de novo*, metylácii dUMP na dTMP, premenu homocysteínu na metionín, metyláciu tRNA. Pre syntézu metionínu z homocysteínu je ako koenzým *metionín syntázy* potrebný aj kobalamín (B₁₂). Vitamín B₁₂ je aj koenzýmom *metylmalonylCoA mutázy*, teda premeny metylmalonylCoA na sukcinylCoA. V prípade nedostatku B₁₂ sa metylmalonylCoA hromadí a vo väčšej miere sa premieňa na kyselinu metylmalónovú, ktorej koncentrácia stúpa v sére aj v moči. Stanovenie množstva kyseliny metylmalónovej v krvi, alebo v moči je citlivým indikátorom hypovitaminózy B₁₂.

Praktická časť:

Názov úlohy: Diagnostika megaloblastickej anémie ako následku nedostatku vitamínu B₁₂ stanovením metylmalónovej kyseliny v kyslom eluáte moču pacienta.

Roztoky:

1. kyslý eluát získaný z moču
2. 1 mol/l acetátový tlmivý roztok pH 4,3
3. 3 mol/l NaOH
4. 0,1 mol/l HCl
5. diazotačné činidlo (diazoreagens)

Princíp:

Kyselina metylmalónová sa izoluje z moču použitím slabobázickej, anión vymieňajúcej živice Dowex AG. Z náhodného odberu (ranného) moču sa vzorka **5 ml** (po úprave pH na 6,5) naniesie na kolónu a nechá sa pretiecť. Kolónka sa premyje 50 ml destilovanej vody. Zachytená metylmalónová kyselina sa vyluuje použitím **20 ml** 0,1 mol/l HCl. Vznikne tzv. kyslý eluát. Metylmalónová kyselina v tomto kyslom eluáte následne reaguje s diazotačným činidlom za vzniku modro sfarbeného produktu, ktorý sa stanovuje spektrofotometricky.

Postup stanovenia:

vzorka	M ₁	M ₂	slepá vzorka (Bl)
kyslý eluát 1	1 ml	---	---
kyslý eluát 2	---	1 ml	---
0,1 mol/l HCl	---	---	1 ml
acetátový tlm. roztok	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
diazoreagens	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Necháme postáť 5 minút.			
3 mol/l NaOH	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Absorbanciu meriame oproti slepej vzorke pri 620 nm.			

Vyhodnotenie:

Stanovenie hladiny kyseliny metylmalónovej v sére, alebo jej vylučovanie močom sú vhodným parametrom diferenciálnej diagnostiky anémií hlavne pri hraničných hodnotách vitamínu B₁₂. Vzostup kyseliny metylmalónovej v kombinácii so zvýšenou hladinou homocysteínu v sére poukazujú na deficit vitamínu B₁₂, pri deficite kyseliny listovej je zaznamenaná len zvýšená hladina homocysteínu. Zvýšené množstvo kyseliny metylmalónovej v sére sa prejaví aj jej zvýšeným vylučovaním močom, ktoré sa vyjadruje v mg/l moču resp. v mmol/mol kreatinínu. Bez deficitu vitamínu B₁₂ sa jej močom vylúči menej ako 20mg/l, čo predstavuje množstvo **menšie ako 0,2mmol/24 hodín**, resp. 3,6mmol/mol kreatinínu.

