

УДК. 577.164.1

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВИТАМИНА В-6 ПРИ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ

Л.А.ХАРИТОНЧИК, В.М.КОДЕНЦОВА, О.А.ВРЖЕСИНСКАЯ,
С.Н.ДЕНИСОВА, В.Б.СПИРИЧЕВ

Институт питания Российской академии медицинских наук
109240 Москва, Устьинский пр., 2/14, факс (095) 298-18-55

На основании исследования взаимосвязи между концентрацией пиридоксальфосфата в плазме крови и экскрецией 4-пиридоксильной кислоты с мочой, а также статистического анализа показано, что обмен витамина В-6 и, соответственно, критерии адекватной обеспеченности организма этим витамином больных ФКУ детей отличаются от таковых у здоровых детей. Для больных детей характерно повышенное содержание пиридоксальфосфата в плазме крови. В качестве нижней границы достаточной обеспеченности витамином В-6 мы склонны рекомендовать его концентрацию 11 нг/мл. При потреблении повышенных доз витамина В-2 показатели обеспеченности витамином В-6 больных ФКУ детей приближаются к наблюдаемым у здоровых. Обсуждается необходимость уточнения и биохимического обоснования оптимального содержания в диете витаминов В-2 и В-6 при данном заболевании.

Ключевые слова: витамин В-6, витамин В-2, критерии обеспеченности витаминами, обмен витаминов, фенилкетонурия

ВВЕДЕНИЕ. Оптимальная обеспеченность витамином В-6 и ее корректная оценка имеют принципиальное значение для больных фенилкетонурией (ФКУ), поскольку этому витамину принадлежит важная роль в регуляции процессов возбуждения и торможения центральной нервной системы, нарушения в функционировании которой наблюдаются при этом заболевании. Витамин В-6-зависимые декарбоксилазы катализируют превращение глутаминовой кислоты в гамма-аминомасляную, декарбоксилируют ароматические аминокислоты, участвующие в образовании катехоламинов и серотонина, гистамина и других биогенных аминов, витамин В-6-зависимая трансфераза функционирует в реакциях обмена тирозина [1].

Данные об обеспеченности организма витамином В-6 при ФКУ противоречивы. Так, в некоторых работах у больных ФКУ детей выявлялась повышенная концентрация в плазме крови коферментной формы витамина В-6 -

пиридоксальфосфата (ПАЛФ) [2,3], уровень которого обычно используют в качестве показателя обеспеченности этим витамином. По мнению авторов, это обусловлено обнаруженным в их работе незначительным уменьшением активности щелочной фосфатазы плазмы крови и, возможно, сниженной скоростью обмена витамина В-6 [2]. По данным одних авторов, при нагрузке триптофаном у пациентов с ФКУ значительного увеличения экскреции продуктов витамин В-6-зависимого метаболизма этой аминокислоты не отмечалось, что свидетельствует о достаточной обеспеченности организма витамином В-6 [4]; тогда как, по данным других, - наблюдалось более чем двукратное увеличение выведения кинуренина, отражающее снижение активности ПАЛФ-зависимой кинурениназы вследствие дефицита витамина В-6 [5].

Таким образом, ясности в вопросе об обмене этого витамина при данном заболевании нет; проблема усложняется еще и тем, что в образовании пиридоксальных коферментов из пиридоксина, поступающего с диетой, и его окислении в 4-пиридоксильную кислоту (4-ПК), принимают участие витамин В-2-зависимые ферменты [6], и, следовательно, метаболизм витамина В-6 зависит от рибофлавинового статуса организма [7]. Вместе с тем, в упомянутых выше работах обеспеченность рибофлавином во внимание не принималась.

В данной работе была предпринята попытка охарактеризовать обмен витамина В-6 при ФКУ на основе изучения взаимосвязи между содержанием ПАЛФ в плазме крови и часовой экскрецией метаболита витамина В-6 с мочой с учетом обеспеченности организма витамином В-2. Данный подход позволил выявить особенности обмена водорастворимых витаминов при ряде заболеваний [8,9].

МЕТОДИКА. Средний возраст 36 обследованных детей (20 девочек, 16 мальчиков 6-8 лет) составил 7,5 лет. Все дети получали элементную диету (на основе специализированных продуктов "Фенил-фри" (США) по 190-200 г или по 90 г "Тетрафена" (РФ) в сутки) в течение 1-7,5 лет, что обеспечивало потребление в среднем по группе $2,16 \pm 0,09$ г белка на 1 кг массы тела ($1,35-2,76$ г/кг).

На момент исследования уровень фенилаланина в плазме крови составил $6,2 \pm 0,8$ мг/дл ($1,8-14,8$ мг/дл), концентрация белка - $72,1 \pm 0,7$ г/л ($66,3-72,6$ г/л).

Концентрацию ПАЛФ и пиридоксала (ПАЛ) в плазме крови по реакции образования гидрогена и 4-ПК в моче измеряли с помощью ВЭЖХ [10]. Рибофлавин в плазме крови определяли титрованием рибофлавинсвязывающим апопротеином [11].

Активность щелочной фосфатазы плазмы крови измеряли по гидролизу *n*-нитрофенилфосфата при 20° С в среде объемом 1 мл, содержащей 6 мМ субстрата, 1 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaOH-глициновый буфер, pH 9,85, 0,1 мл плазмы крови. Через 20 мин реакцию останавливали 2 мл 0,2 М NaOH, измеряли оптическую плотность при 405 нм. Для расчета активности фермента использовали коэффициент молярной экстинкции *n*-нитрофенола $18500 M^{-1}cm^{-1}$.

Коэффициент ранговой корреляции между показателями обеспеченности организма витаминами рассчитывали по Спирмену [12]. Уравнения, описывающие ветви кривых зависимости между показателями обеспеченности организма витаминами, рассчитывали с использованием программы "Quattro-Pro, v.1.0" (Borland). В качестве показателей вариационных кривых распределения данного уровня ПАЛФ в плазме крови использовали доверительный интервал, стандартное квадратичное отклонение, медиану (Me) и моду (Mo) [13].

В работе использовали рибофлавин, ПАЛФ, ПАЛ, 4-ПК фирмы "Serva" (ФРГ), остальные реактивы отечественного производства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Между пиридоксиновым и рибофлавиновым статусом организма, оцениваемым по содержанию витаминов в плазме крови, обнаруживалась положительная ранговая корреляция (табл. 1). Как и в случае здоровых людей [14], у больных ФКУ детей наблюдалась явная зависимость экскреции продукта катаболизма витамина В-6 - 4-ПК от обеспеченности организма витамином В-2. Так, у больных ФКУ детей с выраженным дефицитом рибофлавина (концентрация в плазме крови менее 4 нг/мл) экскреция 4-ПК была достоверно ($P \leq 0,001$) ниже, чем у адекватно обеспеченных витамином В-2, и составила 75 ± 13 мкг/ч ($n=9$) против 145 ± 11 мкг/ч ($n=24$). В обеих группах содержание ПАЛФ в плазме крови было одинаковым и достаточно высоким ($18,9 \pm 2,2$ и $18,8 \pm 1,5$ нг/мл).

Таблица 1. Коэффициенты ранговой корреляции между показателями обеспеченности витаминами В-2 и В-6 больных ФКУ детей 6-8 лет.

Параметр	ρ	n	Статистическая значимость
Концентрация рибофлавина в плазме крови- концентрация ПАЛФ в плазме крови	0,313	28	$P \leq 0,05$
Концентрация ПАЛФ в плазме крови - часовая экскреция 4-ПК с мочой	0,479	28	$P \leq 0,01$

В связи с этим для дальнейшего исследования обмена витамина В-6 принимались во внимание только показатели детей, адекватно обеспеченных витамином В-2.

На рис. 1 представлена гистограмма распределения частот встречаемости (в %) данной концентрации ПАЛФ в плазме крови 42 больных ФКУ детей, получавших помимо витамина В-6, содержащегося в продуктах естественного происхождения, по 1,7 мг пиридоксина за счет специализированного продукта, что близко к рекомендуемому суточному потреблению этого витамина для здоровых детей.

Полученное распределение достаточно близко к нормальному, характеризующемуся симметрией относительно средней по группе концентрации ПАЛФ ($M=17,6$ нг/мл), о чем свидетельствует близость к этой величине медианы ($Me=16,5$ нг/мл) и моды ($Mo=16,5$ нг/мл). Представленная кривая распределения сильно сдвинута вправо (в область высоких концентраций) относительно обычно наблюдаемых кривых распределения для здоровых, хорошо обеспеченных витамином В-6 людей [15]. Средняя по группе концентрация ПАЛФ в плазме крови обследованных детей в 2 раза выше величины, принятой в качестве критерия адекватной обеспеченности витамином В-6 здорового ребенка (8 нг/мл). Обращает на себя внимание, что лишь у одного ребенка исследуемый показатель не достигал этой величины. Если у здоровых детей концентрации ПАЛФ в плазме крови, превышающие 20 нг/мл, встречаются крайне редко, то у половины обследованных больных ФКУ детей этот параметр оказался выше 16,5 нг/мл. Наблюдения о повышенном уровне пиридоксальных коферментов в плазме крови согласуются с результатами других авторов, полученными при

обследовании больных ФКУ детей школьного возраста [2,3]. Однако данные этих авторов о сниженной активности щелочной фосфатазы плазмы крови у больных ФКУ детей, обнаруженные при использовании в качестве субстрата тимолфталейнмонофосфата, не подтвердились при использовании в качестве субстрата п-нитрофенилфосфата. Так, активность этого фермента у больных детей составила $23,0 \pm 1,4$ Е/л ($n=7$) против $23,3 \pm 2,4$ Е/л ($n=10$) у практически здоровых детей.

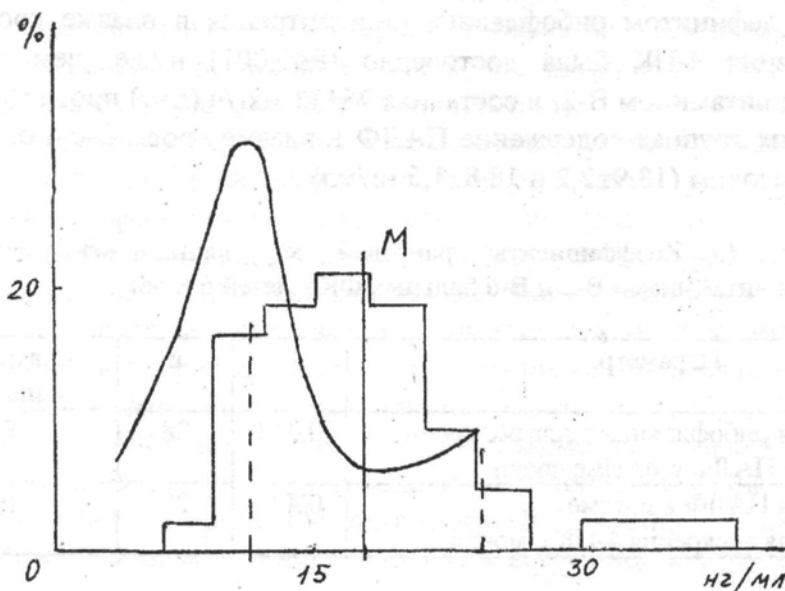


Рисунок 1.

Гистограмма распределения частот встречаемости данной концентрации ПАЛФ в плазме крови больных ФКУ детей. По оси абсцисс - концентрация ПАЛФ в плазме крови, нг/мл; по оси ординат - относительное количество лиц с данным уровнем ПАЛФ в плазме крови, %. Сплошной вертикальной линией отмечен средний по группе уровень, пунктирными вертикальными линиями - доверительный интервал для математического ожидания.

Сплошной кривой линией обозначено распределение частот встречаемости данной концентрации ПАЛФ в плазме крови здоровых адекватно обеспеченных витаминами В-2 и В-6 людей [15].

В соответствии с рассчитанным для данной выборки среднеквадратичным отклонением (6,5 нг/мл), в доверительный интервал для математического ожидания от 11,1 до 24,1 нг/мл попали показатели 78,6% обследованных. Из представленной гистограммы следует, что если учесть долю детей с уровнем ПАЛФ в плазме крови, превышающим верхнюю границу доверительного интервала (т.е. более 24,1 нг/мл), (в сумме составило в данной выборке 90,5%), то в качестве нижней границы адекватной обеспеченности витамином В-6 следует принять концентрацию ПАЛФ в плазме крови - 11 нг/мл.

На рис. 2 представлена метаболическая кривая (1) зависимости экскреции 4-ПК от содержания ПАЛФ в плазме крови для больных ФКУ детей, полученная путем объединения в группы близких по величине концентраций ПАЛФ и расчета для каждой образовавшейся группы среднего значения экскреции 4-ПК с мочой [16]. Между этими двумя показателями обеспеченности организма витамином В-6 обнаруживается высокая степень ранговой корреляции (табл. 1).

Кривая расположена существенно ниже и сдвинута вправо относительно аналогичной кривой (2), полученной ранее для здоровых детей [14,15]. Другими словами, у обследованных больных ФКУ детей содержание ПАЛФ в плазме крови выше, чем обычно наблюдается у здоровых детей, причем при одинаковой концентрации ПАЛФ в плазме крови выведение 4-ПК у больных детей существенно снижено по сравнению со здоровыми детьми того же возраста.

Для здоровых и больных сахарным диабетом людей кривая зависимости выведения 4-ПК от концентрации ПАЛФ в плазме крови имеет сигмообразную форму [8]. В данном случае кривая 1 (рис. 2) имеет двухфазный характер. Обращает на себя внимание отсутствие для обследованных детей пологой ветви, соответствующей низким концентрациям ПАЛФ, то-есть отражающей ситуацию, когда организм не насыщен витамином В-6, и при возрастании уровня ПАЛФ в плазме крови (диапазон концентраций ПАЛФ менее 10 нг/мл) экскреция практически не увеличивается. Возрастающая ветвь представленной кривой отражает функциональное состояние организма, при котором существует определенная пропорциональность между уровнем ПАЛФ в плазме крови и экскрецией 4-ПК с мочой ($y=9,04x-19,13$). Обычно это наблюдается в ситуации, когда организм насыщен витамином В-6. При концентрациях ПАЛФ свыше 20 нг/мл происходит переход в другое функциональное состояние, при котором экскреция слабо зависит от уровня ПАЛФ в плазме крови ($y'=0,41x'+138,7$), оставаясь практически на одном и том же уровне. Это может отражать наличие некоей лимитирующей стадии в метаболизме витамина В-6. Возможно, этим звеном является витамин В-2-зависимая альдегидоксидаза, окисляющая пиридоксальные коферменты в 4-ПК [6].

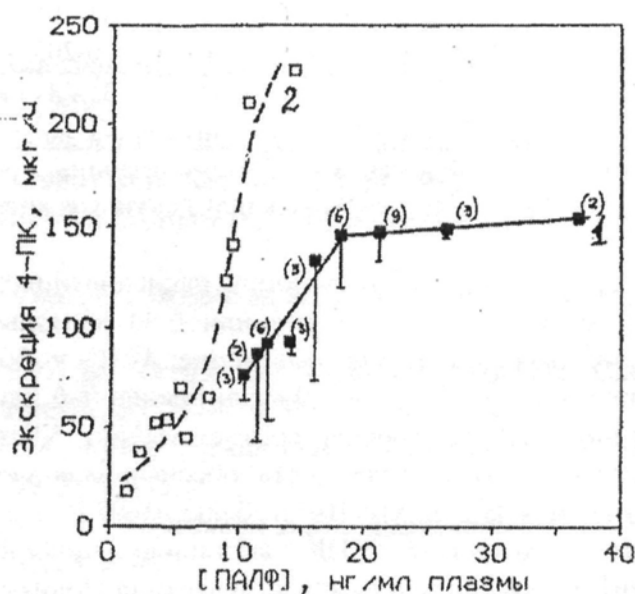


Рисунок 2.

Зависимость экскреции 4-ПК с мочой от концентрации ПАЛФ в плазме крови для больных ФКУ детей (1). По оси абсцисс - концентрация ПАЛФ в плазме крови, нг/мл; по оси ординат - экскреция 4-ПК, мкг/ч. В скобках рядом с точкой указано количество обследованных. Пунктирной линией нанесена соответствующая кривая (2) для здоровых детей [15].

В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что употребление больными ФКУ детьми дополнительно к рациону по 2 мг рибофлавина сопровождалось достоверным уменьшением концентрации ПАЛФ и тенденцией к снижению уровня ПАЛ в плазме крови, а также приводило к увеличению в 1,3 раза экскреции 4-ПК с мочой (табл. 2). Таким образом, средние значения обоих показателей приближались к параметрам, характерным для здоровых детей. Эти наблюдения можно рассматривать также как косвенный аргумент в пользу более высокой потребности больных ФКУ детей в витамине В-2. Кроме того, при дополнительном приеме витамина В-2 наблюдалась тенденция к уменьшению выведения с мочой ксантуреновой кислоты, экскреция которой возрастает у здоровых людей при нагрузке триптофаном в условиях недостаточной обеспеченности организма витамином В-6 [6].

Таблица 2. Влияние 3-недельного дополнительного употребления 2 мг рибофлавина в день на показатели обеспеченности организма больных ФКУ детей витамином В-6.

Исследуемый показатель	n	Об-сле-дова-ние	$\bar{x} \pm m$	Пределы колебаний	Количество обследованных с уровнем ниже нормы, %
ПАЛФ, нг/мл плазмы	16	1	$21,4 \pm 2,0$	10,1-38,1	56
		2	$15,8 \pm 1,2$ *	9,6-26,1	44
ПАЛ, нг/мл плазмы	16	1	$9,4 \pm 0,8$	4,1-16,1	-
		2	$6,3 \pm 1,5$	1,2-21,8	-
экскреция 4-ПК, мкг/ч	11	1	88 ± 16	31-192	71
		2	118 ± 14	60-205	36
экскреция ксантуреновой кислоты, мкг/ч	9	1	92 ± 15	35-241	-
		2	60 ± 13	31-131	-

Примечание: 1 - обследование до витаминизации; 2 - обследование после витаминизации. * - достоверное отличие ($P \leq 0,05$) от показателя витаминизации.

Суточная экскреция 4-ПК с мочой у обследованных детей составила в среднем $10,9 \pm 0,7$ мкмоль ($2,08 \pm 0,13$ мг) или $0,43$ мкмоль/кг массы тела. По данным некоторых исследователей, выведение 4-ПК у больных ФКУ детей, получавших с рационом 39 г белка и 1,9 мг витамина В-6 или 46 г белка и 2,4 мг витамина, экскреция 4-ПК составляла, соответственно, $5,9 \pm 4$ и 8 ± 3 мкмоль/сут. [2]. В нашем случае используемая диета обеспечивала суточное потребление детьми 1,9 мг витамина В-6 и $51,9 \pm 0,5$ г белка ($0,037$ мг витамина В-6 на 1 г белка), при этом экскреция 4-ПК составила приблизительно 80% от потребленного витамина В-6, что отличается от описанного в литературе (около 40% при потреблении $0,043$ мг/г белка [2]). Суточное выведение этого метаболита у больных ФКУ несколько повышено по сравнению с измеряемым у здоровых обеспеченных витамином В-6 детей, у которых эти параметры, по данным разных авторов, обычно составляют $0,8$ мг/сут. [2], или $0,12$ мкмоль/кг массы тела в сут. [17]. При недостаточном потреблении витамина В-6 ($1,3-1,4$ мг) экскреция 4-ПК как у больных, так и у здоровых детей снижается и практически не различается между собой [2].

В целом, подводя итоги, следует отметить, что для большинства страдающих ФКУ детей характерно повышенное по сравнению со здоровыми детьми содержание ПАЛФ в плазме крови. Это наблюдение полностью согласуется с данными других авторов, обследовавших страдающих ФКУ детей 6-17 лет [2,3]. По нашим данным, повышенный уровень ПАЛФ обнаруживается и у детей младенческого возраста. Так, у 6 обследованных детей в возрасте 2-9 мес. средняя концентрация ПАЛФ в плазме крови составила $15,9 \pm 3,7$ нг/мл, при этом лишь у 2 детей она находилась в пределах, характерных для здоровых детей, а у остальных - была близка к 20 нг/мл.

Выявленная тенденция к нормализации показателей обеспеченности витамином В-6 у больных ФКУ детей при потреблении повышенных доз витамина В-2 указывает на необходимость дальнейших исследований по установлению оптимальных уровней потребления этих витаминов при данном заболевании.

Таким образом результаты проведенного исследования показали:

1. Для больных ФКУ детей характерно повышенное содержание ПАЛФ в плазме крови по сравнению со здоровыми.
2. В качестве нижней границы достаточной обеспеченности витамином В-6 мы склонны рекомендовать концентрацию ПАЛФ в плазме крови - 11 нг/мл.
3. При потреблении повышенных доз витамина В-2 показатели обеспеченности витамином В-6 больных ФКУ детей приближаются к наблюдаемым у здоровых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. (1981) Основы биохимии. М., Мир.
2. Prince A.P., Leklem J.E. (1994) Am. J. Clin. Nutr., **60**, 262-268.
3. Anderson K. (1986) Nutr. Rep. Int., **34**, 387-392.
4. Kochen W., Buhrlen E., Byrd D.J. (1975) Acta Vitaminol. Enzymol., **29**, 177-184.
5. Buhrdel P., Grimm U., Wasser St. et.al. (1982) Padiatr. Grenzgeb., **21**(4), 309-317.
6. Ebadi M. (1986) In: Vitamin B-6 pyridoxal phosphate: Chemical, biochemical and medical aspects, pp.449-476. Pt B., New York.
7. Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Сокольников А.А. и др. (1993) Вопр. мед. химии, **39**(5), 29-33.
8. Вржесинская О.А., Коденцова В.М., Харитончик Л.А. и др. (1995) Вопр. мед. химии, **41**(6), 58-62.
9. Коденцова В.М., Успенская И.Д., Вржесинская О.А. и др. (1995) Вопр. мед. химии, **41**(4), 41-45.
10. Коденцова В.М., Бекетова Н.А., Рисник В.В. и др. (1993) Клин. лаб. диагностика, № 6, 22-27.
11. Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Рисник В.В. и др. (1994) Приклад. биохимия и микробиол., **30**, 603-609.
12. Гублер Е.В., Генкин А.А. (1973) Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 141.

13. *Лакин Г.Ф.* (1990) Биометрия. М.: Высшая школа, 352.
14. *Коденцова В.М., Вржесинская О.А., Денисова С.Н. и др.* (1993) *Вопр. мед. химии*, **39**(4), 27-31.
15. *Харитончик Л.А., Коденцова В.М., Вржесинская О.А.* (1995) *Вопр. мед. химии*, **41**(3), 46-50.
16. *Horwitt M.K.* (1986) *Am. J. Clin. Nutr.*, **44**, 973-985.
17. *Editorial.* (1974) *Pediatr. Patol.*, **9**, 301-309.

Поступила 7.9.97.

VITAMIN B-6 METABOLISM IN PHENYLKETONURIC PATIENTS

**L.A.KHARITONCHIK, V.M.KODENTSOVA, O.A.VRZHESINSKAYA,
S.N.DENISOVA, V.B.SPRICHEV**

Institute of Nutrition at Russian Medical Academy, Moscow, fax (095)298-1855

Based on the analysis of the dependence of 4-pyridoxic acid urinary excretion from pyridoxal-5'-phosphate blood plasma level and its statistic distribution it has been shown that vitamin B-6 metabolism in children suffering from phenylketonuria and therefore the criteria of the body saturation with this vitamin differ from those for healthy people. Increased pyridoxal-5'-phosphate blood plasma level has been demonstrated for PKU children. The concentration of 11 ng/ml should be considered as a bottom border of the adequate supply with vitamin B-6. The elevated vitamin B-2 intake approximates vitamin B-6 status indexes of sick children to those usually measured in healthy children. The necessity for the reevaluation of vitamin B-2 and B-6 optimal diet content under this disease and its biochemical validation are discussed.

Key words: Vitamin B-6, vitamin B-2, criteria of vitamin supply