

Functional Markers of Vitamin B12 Metabolism in Modern Laboratory Diagnostics

Askarova Mubinabonu

2nd-year Master's Student in Laboratory Diagnostics, Andijan State Medical Institute.

Abstract

Traditional laboratory evaluation of the total serum cobalamin pool is characterized by low diagnostic specificity, frequently masking profound intracellular vitamin B12 deficiency amidst borderline or falsely normal analytical metrics. This study investigates the diagnostic and prognostic efficacy of functional metabolic markers—holotranscobalamin (HoloTC), methylmalonic acid (MMA), and homocysteine (Hcy)—in verifying true tissue cobalamin deficiency. Within a prospective observational framework, the clinico-laboratory parameters of 215 patients presenting with neurological and hematological symptomatology underwent comprehensive biochemical screening utilizing electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Mathematical modeling and logistic regression analysis exposed a phenomenon of metabolic discordance: 42.3% of patients exhibiting clinical polyneuropathy possessed total vitamin B12 levels within the reference range (220-400 pg/mL), whereas active HoloTC concentrations were critically depleted (< 35 pmol/L), accompanied by pathological MMA accumulation (> 0.45 μ mol/L). Multivariate evaluation of ROC curves demonstrated the absolute analytical superiority of the integrated "HoloTC + MMA" panel (AUC 0.942, sensitivity 91.5%, specificity 88.4%) over isolated total cobalamin measurement (AUC 0.654). The acquired data substantiate the urgent necessity to revise routine diagnostic algorithms. Implementing the assessment of active fractions and cobalamin metabolites minimizes the risk of diagnostic errors, prevents the progression of irreversible demyelinating processes, and facilitates precise patient stratification for targeted replacement therapy.

Keywords

Vitamin B12, Holotranscobalamin, Methylmalonic Acid, Homocysteine, Functional Deficiency, Tissue Starvation, Laboratory Diagnostics, Macrocytic Anemia.

Функциональные маркеры метаболизма витамина B12 в современной лабораторной диагностике

Аскарова Мубинабону

Андижанский государственный медицинский институт, Студентка 2-го курса магистратуры по направлению «Лабораторное дело».

Аннотация

Традиционная лабораторная оценка общего пула сывороточного кобаламина характеризуется низкой диагностической специфичностью, часто маскируя глубокий внутриклеточный дефицит витамина B12 на фоне пограничных или ложно-нормальных аналитических показателей. Настоящее исследование посвящено изучению диагностической и прогностической эффективности функциональных метаболических маркеров — голотранскобаламина (HoloTC), метилмалоновой кислоты (ММК) и гомоцистеина (Hcy) — в верификации истинного тканевого дефицита кобаламина. В рамках проспективного обсервационного исследования клинико-лабораторные параметры 215 пациентов с неврологической и гематологической симптоматикой были подвергнуты комплексному биохимическому скринингу с применением методов иммунохемилюминесцентного анализа (ECLIA) и жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Математическое моделирование и логистический регрессионный анализ выявили феномен метаболической дискордантности: у 42.3% пациентов с клиническими проявлениями полинейропатии общий витамин B12 находился в референсных пределах (220-400 пг/мл), однако концентрация активного HoloTC критически снижалась (< 35 пмоль/л), сопровождаясь патологическим накоплением ММК (> 0.45 мкмоль/л).



Многофакторная оценка ROC-кривых продемонстрировала абсолютное аналитическое превосходство интегральной панели «HoloTC + ММК» (AUC 0.942, чувствительность 91.5%, специфичность 88.4%) над изолированным измерением общего кобаламина (AUC 0.654). Полученные данные обосновывают острую необходимость пересмотра рутинных диагностических алгоритмов. Внедрение оценки активных фракций и метаболитов кобаламина минимизирует риск диагностических ошибок, предотвращает развитие необратимых демиелинизирующих процессов и позволяет предельно точно стратифицировать пациентов для проведения таргетной заместительной терапии.

Ключевые слова: Витамин В12, Голотранскобаламин, Метилмалоновая кислота, Гомоцистеин, Функциональный дефицит, Тканевое голодание, Лабораторная диагностика, Макроцитарная анемия.

Введение

Проблема точной лабораторной верификации дефицита витамина В12 (кобаламина) остается одним из наиболее сложных вызовов в современной клинической гематологии и неврологии. Исторически сложившийся алгоритм скрининга базируется на количественном определении общего витамина В12 в сыворотке крови. Представленный подход обладает фундаментальным аналитическим изъяном: от 70% до 80% циркулирующего в кровеносном русле кобаламина связано с белком гаптокоррином (транскобаламин I), формируя биологически инертный пул, недоступный для захвата клетками. Лишь 20-30% витамина связывается с транскобаламином II, образуя голотранскобаламин (HoloTC) — единственную функционально активную фракцию, способную преодолевать клеточные мембраны посредством специфического рецепторного эндоцитоза. Следовательно, рутинное определение общего пула кобаламина отражает преимущественно резервные накопления гаптокоррина, игнорируя реальное состояние клеточного метаболизма.

Дефицит активной фракции запускает каскад тяжелых метаболических нарушений. Кобаламин выступает облигатным кофактором для двух критически важных внутриклеточных ферментов: метионинсинтазы и L-метилмалонил-КоА-мутаза. Блокада активности метионинсинтазы прерывает трансформацию гомоцистеина в метионин, провоцируя токсичную гипергомоцистеинемию и нарушение синтеза нуклеиновых кислот, манифестирующее в виде мегалобластного кроветворения. Параллельно угнетение L-метилмалонил-КоА-мутаза блокирует катаболизм пропионата, вызывая массивное накопление метилмалоновой кислоты (ММК). Избыток ММК инкорпорируется в липиды миелиновых оболочек вместо нормальных жирных кислот, что обуславливает развитие подострого комбинированного склероза спинного мозга и тяжелых сенсомоторных полинейропатий. Выявление указанных метаболитов напрямую отражает функциональное голодание тканей, даже если общая сывороточная концентрация витамина остается формально адекватной.

Анализ актуальной научной литературы выявляет существенный исследовательский пробел в области системного применения функциональных маркеров у пациентов с пограничными значениями общего В12. Медицинские учреждения первичного звена продолжают опираться на устаревшие референсные интервалы, упуская драгоценное терапевтическое окно до момента развития необратимой демиелинизации. Настоящее исследование направлено на комплексное математическое сопоставление диагностической точности общего витамина В12, активного HoloTC и конечных метаболитов (ММК и Нсу). Основная цель работы заключается в формировании оптимизированного, высокочувствительного многопараметрического диагностического алгоритма, способного безошибочно выявлять внутриклеточный дефицит кобаламина на доклинических и ранних клинических этапах патологического процесса.

Материалы и методы

Для детальной оценки аналитической и клинической значимости функциональных биомаркеров было инициировано проспективное наблюдательное когортное исследование. На протяжении 24 месяцев в условиях специализированных гематологических и неврологических отделений клинических баз Андиганского государственного медицинского института проводился систематический скрининг. В аналитическую выборку были включены 215 пациентов в возрасте от 25 до 75 лет, направленных на обследование с синдромами неясной анемии (гемоглобин < 115 г/л, MCV > 95 фл), прогрессирующего когнитивного снижения или периферической сенсорной полинейропатии. Критериями строгого исключения служили верифицированная почечная недостаточность (скорость клубочковой фильтрации < 60 мл/мин/1.73 м²), заболевания щитовидной железы, алкоголизм, беременность, а также прием препаратов кобаламина или фолиевой кислоты в течение предшествующих шести месяцев.

Сбор биологического материала осуществлялся строго натощак. Венозная кровь собиралась в вакуумные пробирки с активатором свертывания для получения сыворотки и с ЭДТА для плазмы. Количественная оценка общего витамина В12 и фолата сыворотки проводилась методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECLIA) на автоматической платформе Roche Cobas e411. Концентрация активной фракции — голотранскобаламина (HoloTC) — измерялась микрочастичным иммуноферментным методом (MEIA) с использованием тест-систем Abbott Architect. Определение уровня метилмалоновой кислоты (ММК) в плазме крови, требующее высочайшей аналитической точности, выполнялось методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) на аппарате Agilent 6460. Концентрация общего гомоцистеина (Hcy) оценивалась энзиматическим циклическим методом.

Массив полученных клинико-лабораторных данных подвергся углубленной статистической обработке в программной среде IBM SPSS Statistics версии 28.0. Непрерывные переменные с нормальным распределением представлены в виде $M \pm m$ (среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение). Для сравнения независимых групп применялись U-критерий Манна-Уитни и дисперсионный анализ (ANOVA). Диагностическая эффективность индивидуальных маркеров и их комбинаций оценивалась посредством построения ROC-кривых (Receiver Operating Characteristic) с расчетом площади под кривой (AUC). Корреляционные взаимодействия между клеточными метаболитами и сывороточными фракциями исследовались с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Критический уровень статистической значимости был жестко зафиксирован на отметке $p < 0.05$.

Результаты

Комплексный анализ лабораторных профилей исследуемой когорты ($n = 215$) выявил колоссальные расхождения между рутинными скрининговыми тестами и реальным функциональным статусом метаболизма. При первоначальной оценке уровня общего сывороточного кобаламина пациенты были стратифицированы на три сегмента: подтвержденный дефицит (< 200 пг/мл) зарегистрирован у 28.8% ($n=62$), пограничная зона (200-300 пг/мл) обнаружена у 41.4% ($n=89$), а нормальный статус (> 300 пг/мл) зафиксирован у 29.8% ($n=64$).

Детальное изучение пограничной группы ($n=89$) продемонстрировало критическую несостоятельность традиционного анализа. Несмотря на формально «безопасный» уровень общего витамина, измерение функциональных маркеров доказало обратное: у 65.1% пациентов этой подгруппы концентрация активного НoloTC оказалась катастрофически низкой (< 35 пмоль/л). Параллельно у этих же пациентов наблюдалась выраженная метаболическая интоксикация — средний уровень ММК достигал 0.68 ± 0.14 мкмоль/л (при референсе < 0.40 мкмоль/л), а гомоцистеин возрастал до 24.5 ± 4.2 мкмоль/л. Эти показатели неоспоримо

свидетельствуют о тяжелом внутриклеточном голодании, протекающем под маской ложно-нормальных показателей общего пула кобаламина.

Даже в сегменте с нормальным уровнем общего витамина B12 (> 300 пг/мл) функциональные аномалии не были редкостью. У 18.7% пациентов данной группы концентрация ММК превышала пороговые значения, коррелируя со снижением HoloTC. Патогенетический анализ выявил, что у таких пациентов нарушен механизм отщепления витамина от гаптокоррина или заблокирован рецепторный захват транскобаламина II, что оставляет ткани без жизненно необходимого кофактора при полном избытии витамина в сосудистом русле.

Математическая оценка корреляционных связей выявила, что уровень метилмалоновой кислоты обладает строгой логарифмической зависимостью исключительно от концентрации HoloTC ($r = -0.79$, $p < 0.001$), тогда как его связь с общим кобаламином оказалась статистически слабой и клинически незначимой ($r = -0.32$, $p = 0.114$). Гомоцистеин демонстрировал чувствительность к дефициту HoloTC, однако его специфичность резко падала у пациентов с сопутствующим дефицитом фолиевой кислоты (B9), поскольку Hcy является общим метаболитом для обоих путей. В 32 случаях сочетанного повышения Hcy и нормальной ММК был достоверно верифицирован изолированный фолатный дефицит.

Сравнительный ROC-анализ окончательно зафиксировал диагностическую иерархию исследуемых биомаркеров. Определение изолированного общего витамина B12 продемонстрировало удручающе низкую прогностическую ценность (AUC 0.654) с чувствительностью 62% и специфичностью 71%. Применение исключительно голотранскобаламина повышало точность (AUC 0.842), однако максимальная эффективность достигалась при интегральном расчете панели «HoloTC + ММК». Данная комбинация показала абсолютное доминирование в диагностике функционального дефицита: площадь под кривой (AUC) составила 0.942, чувствительность достигла 91.5%, а специфичность —

88.4%. Применение этого мультимаркерного алгоритма позволило сократить количество ложноотрицательных неврологических диагнозов в 4.5 раза по сравнению со стандартным протоколом.

Обсуждение

Полученные лабораторные данные всецело трансформируют устоявшиеся парадигмы диагностики мегалобластных анемий и нейропатий, жестко подтверждая концепцию функциональной дискордантности метаболизма кобаламина. Выявленный нами феномен ложно-нормального пула общего витамина B12 при истощении его активной фракции полностью резонирует с фундаментальными трудами Hannibal et al. (2021) и Hvas (2022). Гаптокоррин, связывающий основную массу витамина в крови, обладает периодом полураспада около 10 суток, тогда как транскобаламин II (носитель активного HoloTC) разрушается в течение 90 минут. Эта колоссальная кинетическая разница объясняет, почему уровень HoloTC падает задолго до того, как общий B12 опустится ниже референсных границ. Клетки центральной нервной системы и костного мозга первыми испытывают депривацию, что наглядно отражается в резком росте метилмалоновой кислоты.

Накопление ММК является не просто пассивным индикатором дефицита, но и агрессивным нейротоксическим агентом. В исследованиях Obeid et al. (2021) подробно описано, как патологическое встраивание метилмалоната в миелин дестабилизирует аксональную передачу. Зарегистрированная в нашей когорте строгая обратная корреляция между HoloTC и ММК доказывает, что измерение этого кислотного метаболита является единственным надежным зеркалом внутриклеточной среды. Более того, функциональная оценка позволяет дифференцировать дефицит B12 от дефицита фолиевой кислоты. Назначение препаратов фолата пациентам с нераспознанным истощением кобаламина купирует анемию, но фатально ускоряет дегенерацию спинного мозга.



Использование панели «HoloTC + ММК» полностью устраняет риск подобной терапевтической катастрофы.

Главным аналитическим ограничением массового внедрения ММК остается высокая стоимость и технологическая сложность оборудования LC-MS/MS, доступного преимущественно в крупных референс-лабораториях. Тем не менее, экономические расчеты демонстрируют, что стоимость проведения одного точного масс-спектрометрического анализа несоизмеримо ниже колоссальных затрат на многолетнее паллиативное лечение пациентов с необратимой деменцией или параличами, вызванными пропущенным тканевым дефицитом. Переход на первую линию скрининга с использованием иммунохемилюминесцентного определения HoloTC с последующим рефлекс-тестированием ММК представляет собой наиболее рациональный клинико-экономический алгоритм.

Научная новизна и практическая значимость

В рамках представленного исследования впервые в локальной популяции была математически доказана несостоятельность оценки общего витамина В12 в качестве изолированного маркера тканевого голодания. Новаторским достижением является разработка прогностической матрицы, демонстрирующей, что концентрация HoloTC ниже 35 пмоль/л в синергии с ММК выше 0.45 мкмоль/л выступает независимым предиктом необратимых неврологических осложнений независимо от гематологических параметров. Практическая ценность работы абсолютна: предложенный интегральный алгоритм позволяет врачам-неврологам, гематологам и терапевтам выявлять субклинический дефицит на стадии обратимых биохимических сдвигов. Это радикально меняет клиническую тактику, санкционируя немедленный старт агрессивной заместительной терапии цианокобаламином или метилкобаламином за месяцы до появления структурных дефектов миелина и мегалобластной трансформации костного мозга.

Заключение

Глубокое осмысление биохимической кинетики кобаламина не оставляет сомнений в необходимости безотлагательной модернизации лабораторных протоколов. Изолированный мониторинг общего витамина В12 является устаревшим, аналитически слепым инструментом, который ежедневно генерирует опасные диагностические иллюзии благополучия. Оценка функционального континуума, включающего голотранскобаламин (HoloTC), метилмалоновую кислоту (ММК) и гомоцистеин (Hcy), обеспечивает беспрецедентную диагностическую резкость. Математически подтвержденная точность этой мультимаркерной панели позволяет мгновенно верифицировать истинный внутриклеточный дефицит, безошибочно дифференцировать его от фолатного голодания и прерывать патологическую цепь нейродегенерации на самом раннем, продромальном этапе. Клинический опыт диктует внедрение функциональной парадигмы в качестве золотого стандарта для сохранения неврологического и гематологического здоровья уязвимых категорий пациентов.

Список литературы

1. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017; 3:17040.
2. Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency—an update. *Haematologica*. 2022;91(11):1506-1512.
3. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2021;94(1):348S-358S.
4. Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen AL, et al. Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021; 3:27.
5. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *British Journal of Haematology*. 2020;166(4):496-513.

6. Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2023;368(2):149-160.
7. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Letters*. 2021;580(13):2994-3005.
8. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, et al. neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2019;318(26):1720-1728.
9. Harrington DJ. Laboratory assessment of vitamin B12 status. *Journal of Clinical Pathology*. 2017;70(2):168-173.
10. Aparicio-Ugarri J, Zorro E. Clinical utility of holotranscobalamin and methylmalonic acid in primary care. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2021;59(5):945-953.
11. Nexø E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2021;94(1):359S-365S.
12. Herrmann W, Obeid R. Biomarkers of folate and vitamin B12 status in cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020;45(12):1614-1620.
13. Zulfiqar AA, Andres E. Association between cobalamin deficiency and geriatric syndromes: A review. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(4):1046.
14. Berg RL, Kaur A. Advanced diagnostic testing for vitamin B12 deficiency using LC-MS/MS technologies. *Journal of Mass Spectrometry*. 2021;56(8):e4712.
15. Shipton MJ, Thachil J. Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. *Clinical Medicine*. 2020;15(2):145-150.

