Određivanje holotranskobalamina u ispitivanju statusa B12 vitamina

Vuk, Darko

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:077782

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Darko Vuk

ODREĐIVANJE HOLOTRANSKOBALAMINA U ISPITIVANJU STATUSA B12 VITAMINA

Završni rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Darko Vuk

ODREĐIVANJE HOLOTRANSKOBALAMINA U ISPITVANJU STATUSA B12 VITAMINA

Završni rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Završni rad**
Medicinski fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij
Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

ODREĐIVANJE HOLOTRANSKOBALAMINA U ISPITIVANJU STATUSA B12 VITAMINA

Darko Vuk

Rad je izrađen: u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek
Mentorica: doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem.

Broj slika: 9
Broj tablica: 2
Broj literaturnih navoda: 17
Jezik izvornika: hrvatski

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem.
2. prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac – redovita profesorica
3. doc. dr. sc. Vatroslav Šerić - docent

Zahvala

Zahvaljujem se, u prvom redu svojoj mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić, prije svega na pruženom vremenu, nesebičnosti, strpljenju, razumijevanju, savjetima i predanosti ovome radu.

Jedno veliko hvala svima na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku na pomoći oko izrade rada, ali prvenstveno na kolegijalnosti.

Zahvalu dugujem svojim kolegicama i kolegama na ove prekrasne tri godine studiranja, koji su uvijek bili kada bi zapelo i sve to olakšali i učinili studiranje još ljepšim.

Posebnu zahvalu dugujem svojim roditeljima, bratu, djevojci i svima bliskima koji su mi u sve ove dane studiranja bili jedna velika podrška.

Rad je izrađen: u Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek

Sadržaj

1. **Uvod**……...1

1.1.Vitamin B12.....1

1.1.1. Svojstva…….…….....1

1.1.2. Apsorpcija i distribucija…….…….....…..3

1.2.Uloga B12 vitamina u organizmu.....4

1.3.Kliničke manifestacije deficita vitamina B12.....5

1.3.1. Neurološke manifestacije.....6

1.4.Laboratorijsko ispitivanje statusa B12 vitamina.....6

1.4.1. Vitamin B12 i holotranskobalamin…….…….....6

1.4.2. Homocistein…….....…7

2. **Hipoteza**…….…….....9

3. **Ciljevi istraživanja**…….…….10

4. **Ispitanici i metode**.....11

4.1.Ispitanici…….....11

4.2.Metode.....11

4.2.1. Laboratorijski postupci.....11

4.2.2. Statističke metode.....12

5. **Rezultati**.....13

6. **Rasprava**.....18

7. **Zaključak**.....20

8. **Sažetak**.....21

9. **Summary**.....23

10. **Literatura**…….…….....…..25

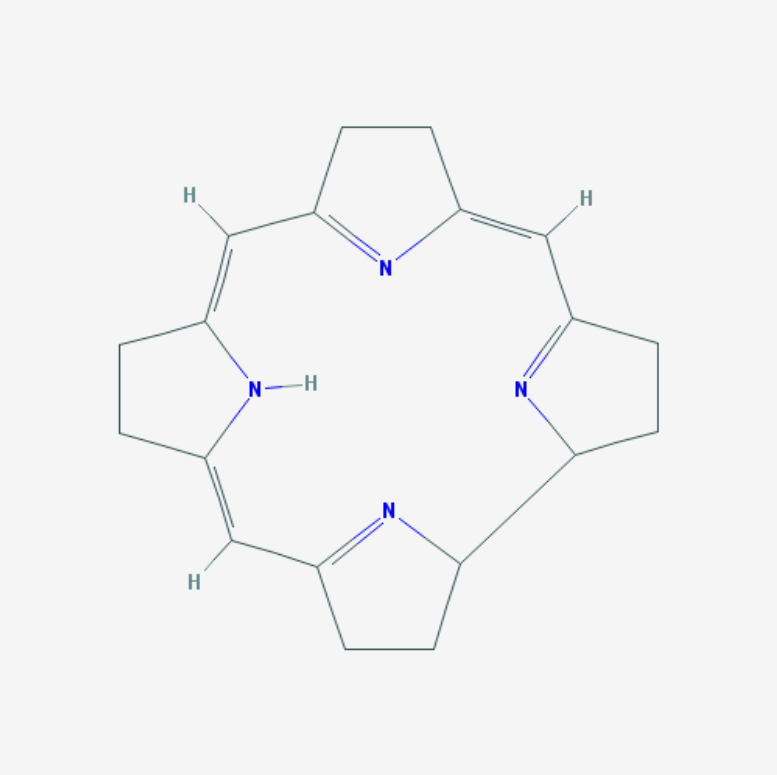
11. **Životopis**…….....…….....…27

1. UVOD

1.1. Vitamin B12

1.1.1. Svojstva

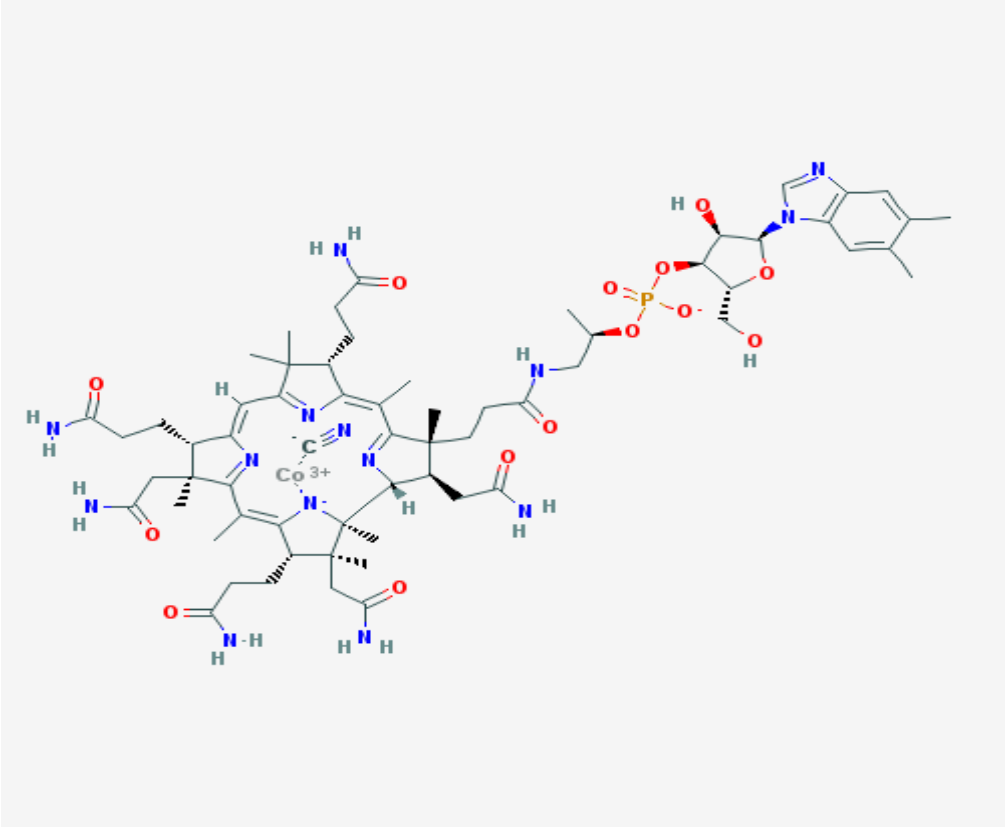
Vitamin B12 (kobalamin) je metalo-organska komponenta koja se sastoji od jezgre slične porfirinu, čiju osnovu čine četiri pirolska prstena (A, B, C, D) koja tvore korinski prsten.



Slika 1. Struktura prstena korina

Pirolski prstenovi povezani su preko četiri atoma dušika s pozitivno nabijenim ionom kobalta u sredini te posjeduju sedam amino postraničnih lanaca od kojih su tri acetoamidna (a-g) i četiri propionamidna (b,d,e,f). Peti, dušikov atom veže kobaltov donji aksijalni (α-strana) ligand, 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB) ribonukleinski dio. Šesti ili gornji aksijalni (β -strana)

ligand je izmjenjiv (8). Korinski prsten također nastaje iz delta-amino-levulinske kiseline (9). Na kobalt je vezana i jedna od četiriju anionskih skupina prema kojima se razlikuju pojedini oblici vitamina: cijanokobalamin, hidroksikobalamin, metil-kobalamin i 5-dezioksiadenozil-kobalamin (12).



Slika 2. Strukturna formula kobalamina

Naziv kobalamin označava molekulu bez anionske skupine (12). Kobalamin je vezan za dva proteina: transkobalamin (TC) i haptokorin (HC). TC-vitamin B12-kompleks naziva se holotranskobalamin (holoTC), sadržava biološki aktivan kobalamin koji je dostupan svim stanicama organizma, preko specifičnih receptora. Veća frakcija (oko 80 %) kobalamina je vezana za haptokorin i smatra se metabolički inertnom zbog nedostatka receptora.

Cijanokobalamin (CNCB) posjeduje cijano-skupinu kao gornji aksijalni ligand i on je najvažnija sintetička forma kobalamina. Unatoč nedostatku izravne fiziološke funkcije, koristi se u mnogim lijekovima i aditivima u hrani zbog svoje stabilnosti i niže cijene. Samo su AdoCbl

i MeCbl aktivni kofaktori, kobalamini s drugačijim gornjim aksijalnim ligandom. Osim strukturne razlike gornje osi liganda, značajni su tzv. Cbl analozi, koji tipično imaju supstituiran ili odsutan nukleotidni dio. Kod ljudi su ovi analozi neaktivni, za razliku od bakterija, gdje mnogi od njih kataliziraju kobalamin ovisne reakcije (13).

1.1.2. Apsorpcija i distribucija

Vitamin B12 je vezan za proteine u hrani i dostupan je za apsorpciju nakon što se odvoji od proteina uz pomoć klorovodične kiseline koju luči želučana sluznica. Oslobođeni se kobalamin zatim veže za R-protein i prolazi u duodenum gdje se R-protein odstrani, a slobodni kobalamin se veže za unutarnji faktor (IF) (11). IF je glikoprotein molekularne mase 45 000 Da i veže vitamin B12 u omjeru 1 : 1. U želucu postoje bjelančevine koje vežu vitamin B12, ali nijedna od njih nema sposobnost predati ga organizmu u daljnjem tijeku probave. Unutrašnji faktor stvaraju parijetalne stanice želučane sluznice. Kompleks IF-B12 prolazi do terminalnog ileuma. Molekula IF se u nazočnosti kalcija veže za intestinalini receptor mikrovila ilealnih stanica, što omogućava apsorpciju vitamina B12 kroz sluznicu. Nakon apsorpcije kroz intestinalnu sluznicu, vitamin B12 ulazi u cirkulaciju. U portalnoj ga cirkulaciji nalazimo oko 2 do 6 sata nakon uzimanja *per os* vezanog na transkobalamin II (TC-II), beta-globulin molekularne mase 43 000 Da koji se stvara u jetri, makrofagima i ileumu. IF se ne apsorbira. TC-II prenosi vitamin B12 do koštane srži i drugih tkiva procesom receptorom posredovane endocitoze. Iako je TC-II glavni protein plazme koji prenosi vitamin B12 do koštane srži i ostalih stanica, količina vitamina B12 vezana za TC-II je vrlo mala (< 50 ng/L). Manjak TC-II uzrokuje megaloblastičnu anemiju zbog nedostatnog unosa vitamina u eritrocite. Međutim, u tih je bolesnika razina vitamina B12 u normalnim granicama jer je većina vitamina u plazmi vezana za drugi protein transkobalamin I (TC-I). TC-I je glikoprotein koji stvaraju granulociti. Razine vitamina B12 i TC-I izrazito su povećane u stanjima intezivne hiperplazije granulocitne loze, prvenstveno mijeloproliferativnih bolesti. Vitamin B12 na TC-I ne prenosi se u stanice koštane srži pa je funkcionalno „inertan“. Protein plazme gotovo istovjetan TC-I- ju (razlikuje se u ugljikohidratnim skupinama) nazvan je transkobalaminom III (TC-III). Oba ta proteina prenose vitamin B12 do jetre, odakle se vitamin izlučuje u žuč i reapsorbira se preko enterohepatične cirkulacije od strane crijevnih receptora kojima je potreban unutarnji faktor, tako da će se nedostatak vitamina B12 brže razvijati u pacijenata s pernicioznom anemijom zbog nedostatka IF. Vitamin B12 se izlučuje stolicom, koja se sastoji od neapsorbiranog žučnog vitamina B12,

gastrointestinalnih stanica i sluzi te vitamina B12 sintetiziranog od strane bakterija u debelom crijevu (9, 11). Povišene koncentracije B12 vitamina u cirkulaciji, na primjer, nakon injekcije, obično prelaze kapacitete vezanja za TC te se samim time izlučuju mokraćom. Poznato je da se ukupna količina vitamina B12 koja se apsorbira povećava unosom vitamina B12, ali se smanjuje apsorpcija povećanjem doze. 50 % vitamina se apsorbira u dozi od 1 μg, 20 % u dozi od 5 μg i 5 % u dozi od 25 mg, što ukazuje na zasićenost apsorpcijskim mehanizmima (10, 11, 14, 17).

Schillingov test je klasična procedura za procjenu apsorpcije vitamina B12, ali danas se rijetko primjenjuje. Schillingov test je koristan samo ako je utvrđivanje manjka unutarnjeg čimbenika važno, kao kod klasične perniciozne anemije. Ovaj test nije nužan u većine starijih bolesnika. Schillingov test mjeri apsorpciju slobodnog, na usta uzetog, radioaktivnom tvari obilježenog vitamina B12. Obilježeni vitamin B12 se daje na usta, a nakon 1 do 6 h se primjenjuje parenteralno 1000 μg (1 mg) vitamina B12, koji smanjuje preuzimanje obilježenog vitamina B12 od strane jetre. Apsorbirani obilježeni vitamin B12 se potom izlučuje mokraćom, koja se skuplja tijekom 24 h. Mjeri se postotak ukupno obilježenog vitamina B12. Ako je apsorpcija normalna, u mokraći se pojavljuje ≥ 9 % primijenjene doze. Smanjeno izlučivanje mokraćom (< 5 % ako je funkcija bubrega normalna) ukazuje na neodgovarajuću apsorpciju vitamina B12. Test je često teško učiniti ili protumačiti zbog nepotpunog sakupljanja mokraće ili bubrežne insuficijencije. Osim toga, budući da Schillingov test ne mjeri apsorpciju za bjelančevine vezanog vitamina B12, on ne otkriva poremećeno oslobađanje vitamina B12 iz hrane, što je u starijih osoba često. Schillingov test nadopunjava količinu vitamina B12 i može prikriti manjak, tako da ga treba izvoditi tek nakon drugih dijagnostičkih pretraga i terapijskih pokušaja.

Schillingov test se može ponoviti nakon pokusne oralne primjene antibiotika tijekom dva tjedna. Ako antibiotsko liječenje popravi malapsorpciju, vjerojatni je uzrok prerastanje crijevnih bakterija (npr. sindrom slijepe vijuge) (14).

1.2. Uloga B12 vitamina u organizmu

Vitamin B12 je jedan od 8 vitamina B. Svi vitamini B-kompleksa pomažu tijelu da izvrši konverziju ugljikohidrata iz hrane u energiju potrebnu organizmu, glukozu, te pomažu organizmu da iskoristi masti i proteine. Vitamini B-kompleksa su potrebni za održavanje

zdravlja kože, kose, očiju, jetre i normalne funkcije živčanog sustava. Svi vitamini B su topivi u vodi (tijelo ih ne pohranjuje).

Vitamin B12 je važan vitamin za održavanje zdravlja živčanih stanica i pomaže u sintezi DNA i RNA. Vitamin B12 je u uskoj suradnji s vitaminom B9, koji se još naziva folat ili folna kiselina, te zajedno sudjeluju u diferencijaciji eritrocita. Folat i B12 zajedno sintetiziraju S-adenozilmetionin (SAMe), spoj koji ima ulogu u imunološkom sustavu.

Vitamin B12 je kofaktor metilacije homocisteina u metionin, a davatelj metilne skupine je metil-tetrahidrofolat (metil-THF), pri čemu se stvorena THF kiselina koristi u sintezi DNA. Vitamin B12, B6, i B9 zajedno kontroliraju razinu aminokiseline homocistein u krvi. Velike razine homocisteina su povezane sa srčanim bolestima. Međutim, znanstvenici nisu sigurni je li je homocistein uzrok srčanih bolesti ili je samo marker koji ukazuje na prisutnost srčane bolesti.

Deoksiadenozil-B12 sudjeluje u pretvorbi metil-malonil-CoA u sukcinil CoA (9, 15).

1.3. Kliničke manifestacije deficita vitamina B12

Nedostatak B12 vitamina uzrokuje široki spektar hematoloških, gastrointestinalnih, psihijatrijskih i neuroloških poremećaja. Niske razine vitamina B12 uključuju razne simptome kao što su umor, dijareja, nervoza, utrnulost, dok kod težih oblika nedostatak B12 uzrokuje oštećenje živaca.

Osobe koje su pod rizikom od nedostatka su:

- vegani i vegetarijanci koji ne jedu mliječne proizvode ili jaja, jer vitamin B12 se nalazi samo u proizvodima životinjskog podrijetla
- osobe koje imaju problema s apsorpcijom nutrijenata zbog Chronove bolesti, bolesti gušterače ili bolesti povezanih s uzimanjem lijekova
- osobe koje su inficirane virusom *Helicobacter pylori*, mikroorganizam koji može stvoriti ulceracije na crijevima. *Helicobacter pylori* oštećuje želučane stanice koje proizvode unutarnji faktor, glikoprotein koji je potreban da bi se apsorbirao vitamin B12
- osobe s poremećajem u prehrani
- osobe koje su HIV pozitivne

- dijabetičari
- starije osobe (7, 15)

1.3.1. Neurološke manifestacije

U živčanom sustavu, vitamin B12 ima ulogu koenzima u reakciji metil-malonil-CoA mutaze, koja je potrebna za sintezu mijelina. Stoga nedostatak vitamina B12 rezultira poremećajem stvaranja mijelina te samim time dovodi do nekoliko poremećaja središnjeg i perifernog živčanog sustava. Nedostatak adenozil-kobalamina (potreban kofaktor za pretvorbu metil-malonil-CoA u sukcinil-CoA) dovodi do nakupljanja metil-malonil-CoA, uzrokujući smanjenje normalne sinteze mijelina i ugradnju abnormalnih masnih kiselina u neuralne lipide. Neurološki simptomi povezani s nedostatkom vitamina B12 uključuju mijelopatiju, neuropatiju, neuropsihijatrijske abnormalnosti i, rjeđe, atrofiju očnog živca. Manjak vitamina B12 uzrokuje i subakutnu kombiniranu degeneraciju kralježnične moždine, na što folna kiselina ne djeluje.

1.4. Laboratorijsko ispitivanje statusa vitamina B12

1.4.1. Vitamin B12 i holotranskobalamin

Plazmatski vitamin B12 je vezan za dva proteina: transkobalamin i haptokorin. Transkobalamin nosi manji dio cirkulirajućeg vitamina B12, a samo 10% proteina je zasićeno vitaminom B12. Transkobalamin transportira vitamin B12 u sve stanice organizma i odgovoran je za transport 4 nmol-a vitamina B12 svakog dana.

Haptokorin je gotovo uvijek zasićen vitaminom B12, vezavši glikoprotein nepoznate funkcije koji nosi veći dio cirkulirajućeg vitamina B12, ali se smatra metabolički inertnim jer nema staničnih receptora osim u jetri (4). Genetska odsutnost haptokorina, iako rijetka, nije ozbiljno stanje. Međutim, nedostatak ili abnormalnosti vezane za transkobalamin uzrokuju hematološke, neurološke i metaboličke poremećaje te zahtijevaju odgovarajuću terapiju čak i kada je koncentracija kobalamina u serumu normalna. Kraći poluživot holoTC u odnosu na holoHC, rezultira snižavanjem vrijednosti holoTc kao jednog od ranih markera deficita

vitamina B12 (1). Metabolizam proteina je spor, uz promet od 0,1 nmol vitamina B12 svaki dan. Činjenica da je samo vitamin B12 koji je vezan za transkobalamin dostupan stanicama potaknula je koncept da bi mjerenje holoTC bilo klinički značajnije od mjerenja ukupnog vitamina B12. Koncentracija vitamina B12 i transkobalamina u plazmi mogu se koristiti kao mjera količine vitamina B12 dostupne stanicama organizma; metaboliti tHcy (homocistein) i MMA (metilmalonska kiselina) upućuju na svaki nedostatak vitamina B12 unutar stanica. tHcy i MMA, nakupljaju se u pacijenata s nedostatkom B12. Općenito, tHcy ima nisku specifičnost zato što je također povišen u pacijenata koji imaju nedostatak folata i eventualno nedostatak tiamina i vitamina B6 (4). U inače zdravih pojedinaca, sva četiri testa (vitamin B12, holoTc, tHcy i MMA) imaju snažnu vezu s unosom vitamina B12, te mogu biti korisni u praćenju statusa vitamina B12 u populaciji. Mjerenje ukupnog vitamina B12 ima nekoliko nedostataka, posebno to što je većina izmjerenoga kobalamina vezana za haptokorin. Brojna istraživanja koja se obavljaju ukazuju na to da bi holoTC trebao biti bolji indikator statusa vitamina B12 za razliku od mjerenja ukupnog vitamina B12. Dostupne su nove metode temeljene na specifičnim anti-TC protutijelima koje potvrđuju korisnost mjerenja holoTC u dijagnostici deficita vitamina B12. Osim toga, vrijednosti holoTC odražavaju se na vrijednosti vitamina B12, neovisno o prethodnoj apsorpciji vitamina, i preporučaju se kao bolji indikator statusa B12 tijekom trudnoće. Serumski vitamin B12 vezan za holoTC predstavlja frakciju ukupnog vitamina B12 koji je dostupan tkivima (1, 2, 3, 5).

1.4.2. Homocistein

Homocistein je aminokiselina koja nastaje u metaboličkom putu esencijalne aminokiseline metionina, istodobno i jedinog izvora u organizmu. Metionin se aktivira djelovanjem L-metionin-S-adenoziltransferaze. U reakciji koja je ovisna u magenzijevim i kalijevim ionima nastaje S-adenozilmetionin, u ljudskom organizmu najznačajniji donor metilne skupine potrebne za niz reakcija metilacije. Demetilacijom ovog spoja nastaje S-adenozilhomocistein koji brzo uz djelovanje S-adenozilhomocistein hidrolaze prelazi u adenozin i homocistein. Nastali homocistein može se djelovanjem odgovarajućih enzima dalje remetilacijom metabolizirati natrag u metionin ili trassulfuracijom, preko dviju enzimski kataliziranih reakcija, u α-ketoglutarat i cistein. Kojim putem će se homocistein metabolizirati, ovisi o trenutačnoj raspoloživosti metionina. U metabolizmu homocisteina sudjeluju i neki vitamini kao koenzimi ili prostetičke skupine među kojima je i vitamin B12. Biološka je funkcija kobalamina služiti kao koenzim u sintezi metionina iz homocisteina i metiltetrahidrofolata. Sinteza metionina iz homocisteina i metiltetrahidrofolata povezuje metabolizam kobalamina i

folne kiseline. Pri manjku kobalamina smanjuje se transmetiliranje s metilfolata, pa se on nakuplja i njegova koncentracija u serumu se povećava (17). U plazmi se nalazi u reduciranom sulfhidrilnom (1 %) i oksidiranom obliku (98 – 99 %) kao homocistein-disulfid i miješani disulfid. Od 80 do 90 % homocisteina vezano je na albumin, a 5 - l0 % za cistein. Svi oblici homocisteina, osim onog vezanog za protein, normalno se filtriraju, reapsorbiraju i razgrađuju u bubrezima pa se homocistein mokraćom ne izlučuje značajno. No, smanjeni stupanj pretvorbe u cistationin (uz cistationin-β-sintazu) ili vraćanje u metionin (uz MTHFR) može uzrokovati homocistinuriju. Normalno se akumulira u plazmi, jer je nestabilan, a kada je u višku, podliježe oksidaciji u homocistin. Na vrijednosti homocisteina u plazmi utječu nasljedni čimbenici (npr. manjak cistation- β- sintaze), životna dob i spol, prehrana s nedostatnim količinama folata, vitamina B6 i B12, bolesti bubrega i zloćudne bolesti, poremećaj vezivnoga tkiva, hipotireoidizam te lijekovi (12).

Metode za određivanje homocisteina uključuju redukcijski stupanj kojim se cijepaju disulfidne veze. Mjeri se ukupni homocistein što, međutim, ne uključuje homocistein inkorporiran u proteine putem disulfidnih veza. Tehnika za mjerenje uključuje GC-MS, HPLC ili imunokemijske metode (12).

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja je da je holotranskobalamin bolji i osjetljiviji pokazatelj deficita vitamina B12 od kobalamina jer čini aktivnu frakciju tog vitamina.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj: ispitati je li holotranskobalamin osjetljiviji pokazatelj deficita vitamina B12 u odnosu na kobalamin.

Specifični ciljevi:

1. ispitati dijagnostičku osjetljivost i specifičnost kobalamina i holotranskobalamina kada se homocistein koristi kao biljeg deficita vitamina B12
2. ispitati povezanost razine holotranskobalamina s kobalaminom
3. ispitati povezanost razine holotranskobalamina s homocisteinom
4. ispitati povezanost razine kobalamina s homocisteinom.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. ISPITANICI

Za ispitivanje statusa holotranskobalamina koristili su se preostali uzorci venske krvi prikupljene venepunkcijom u epruvetu bez antikoagulansa pacijenata s dijagnozom neuroloških simptoma koji mogu biti uzrokovani deficitom vitamina B12 zaprimljenih na Kliniku za neurologiju ili u Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, kojima je zatražena analiza kobalamina i homocisteina. U istraživanje su bili uključeni ispitanici u periodu od 1. lipnja do 1. rujna 2016. koji su imali koncentracije kobalamina od 138 do 300 pmol/L. Ispitanici su temeljem nalaza koncentracije homocisteina bili podijeljeni u dvije skupine:

1. ispitanici čije su koncentracije homocisteina iznad gornje granice referentnog intervala (>15 μmol/L) te se očekuje deficit vitamina B12

2. ispitanici koji imaju normalne koncentracije homocisteina i ne očekuje se deficit vitamina B12

Iz ispitivanja su bili isključeni ispitanici sa smanjenom bubrežnom funkcijom i oni koji imaju snižene vrijednosti koncentracije folne kiseline.

4.2. METODE

4.2.1. Laboratorijski postupci

Za analizu kobalamina i homocisteina koristili su se uzorci seruma dobiveni nakon centrifugiranja venske krvi uzorkovane u epruvetu bez antikoagulansa na 3500 rpm tijekom 10 minuta. Holotranskobalamin se analizirao iz ostatnih uzoraka seruma nakon analize kobalamina i homocisteina, a koji su se do analize pohranili u hladnjak na -20°C. Koncentracije kobalamina, holotranskobalamina i homocisteina izmjerile su se kemiluminiscentnom mikročestičnom imunoanalizom (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*, CMIA) (Abbot Laboratories) na Arhitect i1000SR imunokemijskom analizatoru (Abbott Diagnostics, Lake Forest, SAD).

CMIA metoda je nekompetitivna sendvič-enzimimunokemijska metoda koja se temelji na izolaciji kompleksa antigena s antitijelom na površinu mikročestica lateksa, koje se zatim ireverzibilno adheriraju na staklene niti, dok se nevezani reaktanti uklanjaju ispiranjem. Dodavanjem detekcijskog antitijela obilježenog luminescentnim spojem stvara se signal proporcionalan koncentraciji antigena.

4.2.2. Statističke metode

Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc, verzija 12.4.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Deskriptivna statistika uz odgovarajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije ili medijane i interkvartilne raspone (ovisno o normalnosti raspodjele) koristila se za prikaz podataka. Kolmorogov-Smirnovljevim testom se ispitala raspodjela podataka. Razlika između grupa se testirala Mann-Whitney testom. Usporedba kvalitativnih podataka se testirala Fisher egzaktnim testom. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost holotranskobalamina i kobalamina se ispitala pomoću ROC analize, a na način da se homocistein koristio kao biljeg deficita vitamina B12. Ispitivanje povezanosti varijabli testiralo se izračunavanjem koeficijenta korelacije. $P<0,05$ je predstavljao razinu značajnosti koja se koristila za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

5. REZULTATI

Demografski i klinički parametri ispitivanih skupina prikazani su u Tablici 1. Iz tablice je vidljivo da nema statistički značajne razlike u koncentraciji holotranskobalamina između skupina.

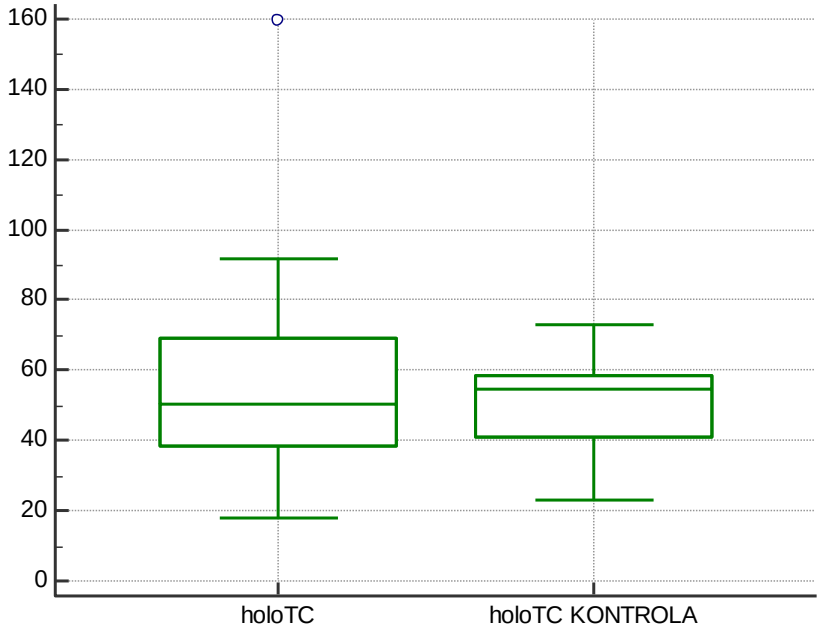
Tablica 1: Demografski i klinički parametri ispitivanih skupina.

	Ispitanici s hiperhomocistinemijom **Medijan (interkvartilni raspon)**	**Kontrola** **Medijan (interkvartilni raspon)**	**p-Vrijednost***
Kobalamin pmol/L	161 (148.5-193.2)	175 (165.7-197.7)	0.2308
Folna kiselina nmol/L	10.9 (8.6-14.6)	13.9 (9.3-27.5)	0.1001
Homocistein µmol/L	18.1 (15.7-19.8)	11.1 (9.7-12.4)	< 0.0001
Holotranskobalmin pmol/L	50.4 (38.6-69)	54.6 (41.1-58.3)	0.8956
Dob, mjesec	70 (59.2-78)	48 (44-60.7)	0.0003
Spol ž/m (n)	9/22	15/8	0.0178˚

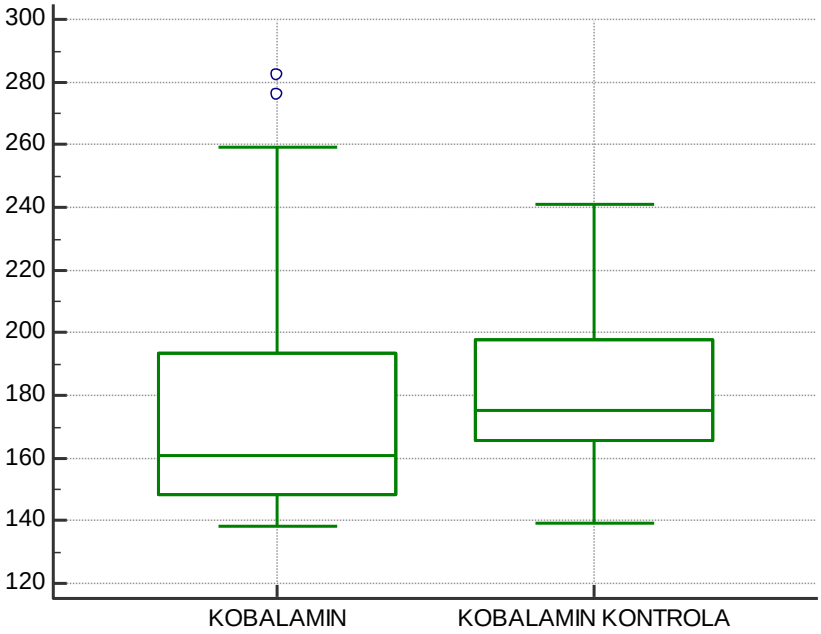
*Mann-Whitney test; ˚Fisher egzaktni test

Usporedbe vrijednosti za holotranskobalamin, kobalamin i homocistein među ispitivanim skupinama prikazane su i grafički (slike 3, 4, 5).

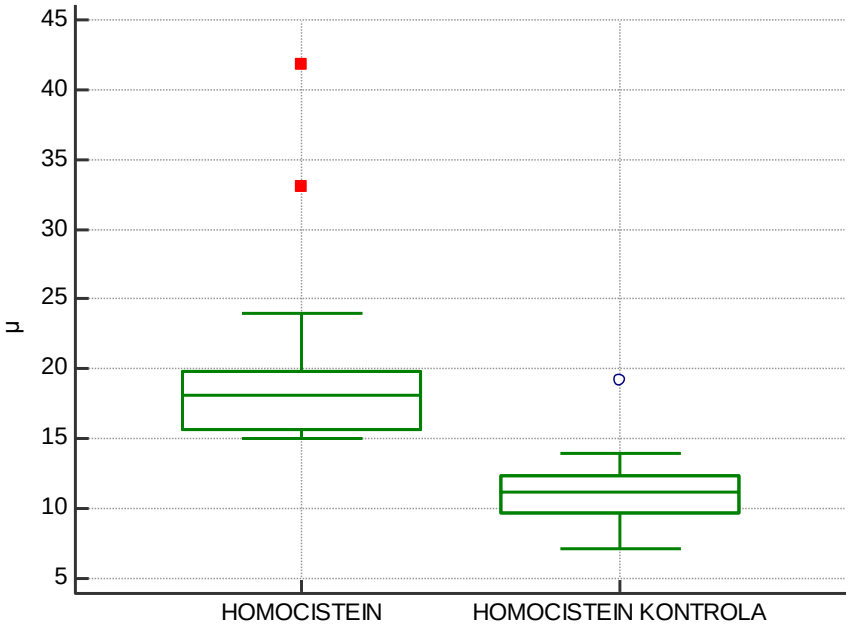
Slika 3. Usporedba koncentracija holotranskobalamina između ispitanika s hiperhomocisteinemijom i kontrola.



Slika 4. Usporedba koncentracija kobalamina između ispitanika s hiperhomocisteinemijom i kontrola.

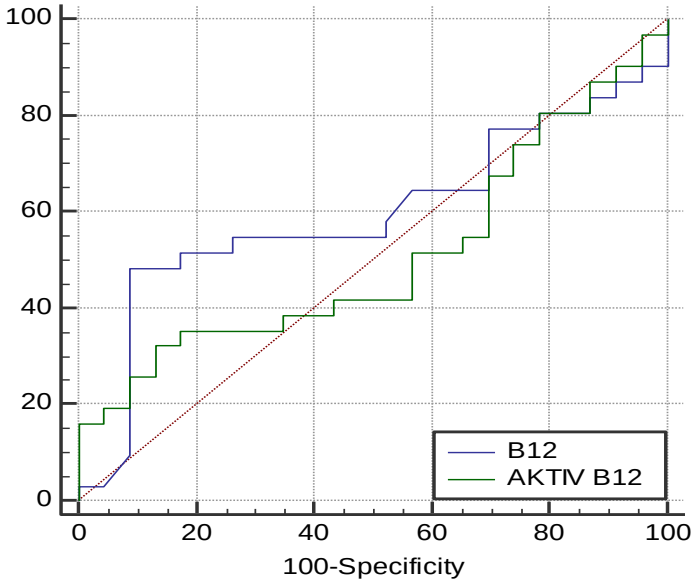


Slika 5. Usporedba koncentracija homocisteina između ispitivanih skupina.



Na Slici 6 prikazane su osjetljivosti i specifičnosti kobalamina i holotranskobalamina kada se homocistein koristi kao biljeg deficita vitamina B12.

Slika 6. ROC usporedna analiza kobalamina (B12) i holotranskobalamina (aktiv B12).



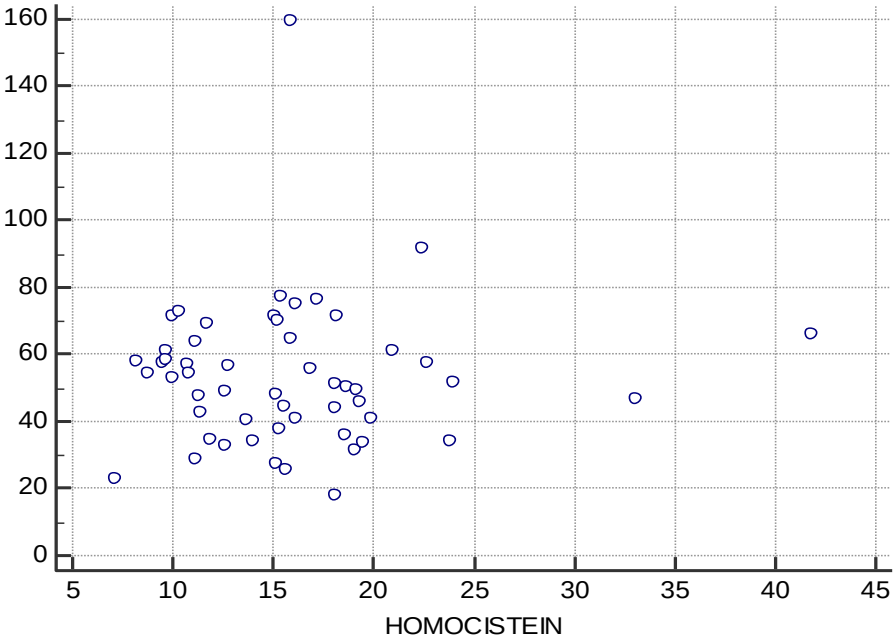
Osjetljivost, specifičnost i AUC za navedene parametre prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2: Osjetljivost, specifičnost i AUC kobalamina i holotranskobalamina

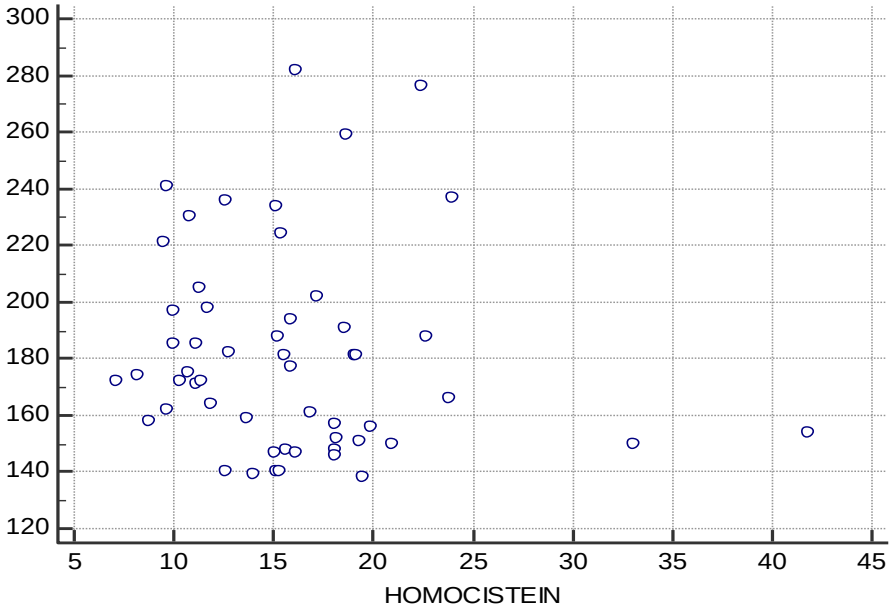
	Osjetljivost	Specifičnost	AUC	Granična vrijednost	p-Vrijednost
Kobalamin	48.39	91.30	0.596	157	0.2304
Holotranskobalmin	32.26	86.96	0.511	63.9	0.8961

Analizom korelacije utvrđeno je da nema povezanosti između holotranskobalamina i kobalamina s homocisteinom (r= 0.032, vs. r= -0.103) (slike 7, 8). Međutim, između kobalamina i holotranskobalamina postoji linearna pozitivna povezanost, iako slaba (r=0.333) (slika 9).

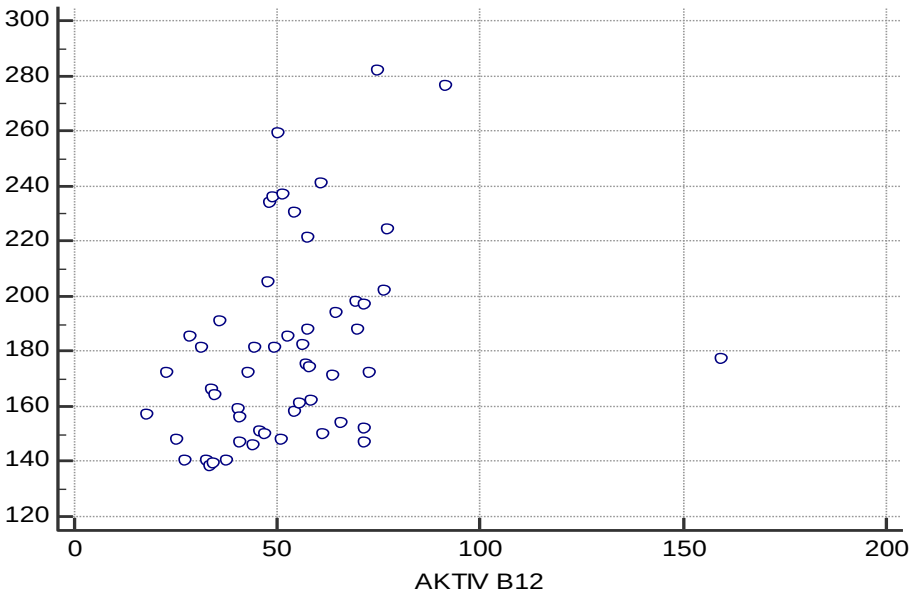
Slika 7. Povezanost razine holotranskobalamina i homocisteina



Slika 8. Povezanost razine kobalamina i homocisteina.



Slika 9 . Povezanost razine holotranskobalamina i kobalamina



6. RASPRAVA

Značaj određivanja vitamina B12 kod neuroloških pacijenata nedvojben je obzirom da neurološke manifestacije mogu biti posljedica deficita istoga. Te su promjene ireverzibilne ukoliko se kasno počne s terapijom. Kobalamin koji se rutinski mjeri u svrhu otkrivanja deficita vitamina B12 smatra se nepouzdanim pokazateljem zbog toga što njegova koncentracija u tkivima može biti niska unatoč normalnoj razini u krvi.

Oko 80 % kobalamina vezano je za haptokorin koji predstavlja metabolički inertan oblik zbog nedostatka receptora. S druge strane metabolički aktivan oblik vitamina B12, holotranskobalamin za kojeg postoje receptori, predstavlja oko 20 % ukupne frakcije vitamina B12 i ima kraći poluživot u cirkulaciji pa bi mogao biti osjetljiviji, specifičniji i klinički značajniji biljeg deficita vitamina B12. Međutim, rezultati prethodnih istraživanja određivanja holotranskobalamina u procjeni deficita vitamina B12 nisu jednoznačni, pa taj parametar još uvijek nema svoje jasno mjesto u laboratorijskim algoritmima. Suprotno postavljenoj hipotezi rezultati ovog istraživanja su pokazali da holotranskobalamin nije osjetljiviji biljeg i raniji pokazatelj deficita vitamina B12 u odnosu na ukupnu frakciju. Štoviše, ako se homocistein koristi kao diskriminirajući čimbenik među skupinama, vitamin B12 imao je veću AUC vrijednost u odnosu na holotranskobalamin (0.596 vs 0.511). Slične su rezultate dobili Al Aisari i suradnici (1). Oni su pokazali da holotranskobalamin i kobalamin imaju gotovo jednaku dijagnostičku učinkovitost u probiru i dijagnostici deficita vitamina B12 kod većine pacijenata. Samo je kod malog broja pacijenata holotranskobalamin bio bolji pokazatelj statusa vitamina B12. Suprotno tome u nekim istraživanjima holotranskobalamin se pokazao boljim i osjetljivijim pokazateljem deficita vitamina B12 u odnosu na ukupnu frakciju (6). Međutim, u ispitivanju je bio uključen veći broj ispitanika, te je prisutna razlika u ustroju studije u odnosu na ovu. Nepostojanje korelacije između B12 i homocisteina te holotranskobalamina i homocisteina govori u prilog nedovoljne specifičnosti homocisteina u procijeni statusa vitamina B12. Na nivo homocisteina utječe više čimbenika, među ostalima i folna kiselina. Iako su iz ispitivanja bili isključeni svi pacijenti s deficitom folne kiseline, to nije bilo dovoljno da bi se postigla dovoljna specifičnost, što je vjerojatno utjecalo na rezultate ispitivanja. Moguće da značajan problem u tome predstavlja i dob ispitanika jer je homocistein prosječno nešto viši kod starijih ispitanika.

Nasuprot tome, između holotranskobalamina i ukupne frakcije vitamina B12 prisutna je slaba povezanost što znači da je udio aktivnog oblika vitamina B12 donekle varijabilan, te ovisi o nizu čimbenika koje je teško predvidjeti. To ujedno upućuje na moguću potrebu istovremenog mjerenja obje frakcije tog vitamina kod sumnje na deficit što je u skladu s preporukom Al Aisari i suradnika (1).

Nedostatak ovog istraživanja je mali broj ispitanika, koji nisu bili usklađeni po spolu i dobi. Moguće je da bi ustroj studije s većim brojem ispitanika i s homogenijim skupinama, obzirom na demografske karakteristike te korištenje MMA uz homocistein prilikom grupiranja skupina, imali drugačije rezultate i zaključak.

7. ZAKLJUČAK

Holotranskobalamin se nije pokazao boljim pokazateljem deficita vitamina B12 u odnosu na ukupnu frakciju. Nije vidljiva korelacija između holotranskobalamina i kobalamina s homocisteinom, dok je između holotranskobalamina i kobalamina ta povezanost bila slaba. Iz toga proizlazi da vitamin B12, holotranskobalamin i homocistein, iako međusobno povezani, predstavljaju parametre koje treba pratiti istovremeno u procjeni statusa pacijenata sa sumnjom na deficit vitamina B12.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je ispitati je li holotranskobalamin osjetljiviji pokazatelj deficita vitamina B12 u odnosu na kobalamin, te postoji li povezanost između kobalamina i holotranskobalamina s homocisteinom.

Ispitanici i metode

U istraživanje je bilo uključeno 54 ispitanika koji su na temelju nalaza koncentracije homocisteina podjeljeni u dvije skupine. U prvoj skupini je bio 31 ispitanik s povišenom razinom homocisteina te neurološkim simptomima, a u drugoj 23 ispitanika s normalnim vrijednostima homocisteina i različitim uputnim dijagnozama. Koncentracije kobalamina, holotranskobalamina i homocisteina izmjerene su u uzorcima seruma kemiluminiscentnom mikročestičnom imunoanalizom (CMIA) (Abbot Laboratories) na Arhitect i1000SR imunokemijskom analizatoru (Abbott Diagnostics, Lake Forest, SAD). Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Za ispitivanje osjetljivosti i specifičnosti koristila se ROC analiza, za usporedbu među skupinama Mann-Whitney test i Fisher egzaktni test, a za ispitivanje povezanosti koeficijent korelacije.

Rezultati

Ispitivanje je pokazalo da holotranskobalamin nije osjetljiviji pokazatelj deficita B12 vitamina od kobalamina (AUC=0.596 vs. AUC= 0.511), te da postoji vrlo slaba povezanost između holotranskobalamina i kobalamina (r=0.333). Međutim, između holotranksobalamina, te kobalamina i homocisteina nema povezanosti (r=0.032 vs r= -0.103).

Zaključak

Rezultati istraživanja su pokazali da holotranskobalamin nije osjetljiviji pokazatelj statusa vitamina B12 u odnosu na kobalamin. Može se reći da holotranskobalamin i kobalamin,

zasebno ili u kombinaciji imaju gotovo jednaku dijagnostičku učinkovitost u dijagnozi deficita B12 vitamina kao rani pokazatelji.

Ključne riječi: holotranskobalamin, kobalamin, homocistein.

9. SUMMARY

Objective

The aim of the study was to examine whether holotranscobalamin is a more sensitive indicator of vitamin B12 deficiency in relation to cobalamin, and whether there is a significant correlation between cobalamin, holotranscobalamin and homocysteine levels.

Patients and methods

The study included 54 subjects who were divided into two groups according to the findings of homocysteine. The first group included 31 patients with elevated homocysteine values and with neurological symptoms, whereas 23 patients with normal homocysteine values and different diagnoses which represented controls. The cocentrations of cobalamin, holotranscobalamin and homocysteine were measured in serum samples with chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) (Abott Laboratories) on the Architect i1000SR analyzer (Abbott Diagnostics , Lake Forest , United States). The results were processed using MedCalc Software (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). ROC curve was used to test sensitivity and specificity, while Mann-Whitney test and Fisher exact test were used for groups comparision. For testing the connection, correlation coefficient was used.

Results

The test showed that holotranscobalamin is not a more sensitive indicator of vitamin B 12 deficiency than cobalamin (AUC= 0.511 vs. AUC= 0.596), and that there is a weak connection between holotranscobalamin and cobalamin (r= 0.333). However, between holotranscobalamin, and cobalamin and homocysteine there is no correlation (r= 0.032 vs. r= -0.103).

Conclusion

Research shows that holotranscobalamin is not a more sensitive indicator of vitamin B 12 deficiency than cobalamin. It can be said that holotranscobalamin and cobalamin, separately or

in combination have almost equal diagnostic efficiency in the diagnosis of vitamin B12 deficiency as early indicators.

Keywords: holotranscobalamin, cobalamin, homocysteine

10. LITERATURA

1. Al Aisari, Al-Hashmi, Mula-Abed, et al. Comparison between Serum Holotranscobalamin and Total Vitamin B12 as Indicators of Vitamin B12 Status. OMJ. 2010; 25: 9–12.

2. Vinod D, Malcolm S Hamilton, Molloy A. Guidelines for the diagnosis and treatment of Cobalamin and Folate disorders. Br J Haematol 2014 Jun 18; 12959, doi: 10.1111/bjh.

3. Brady, J, Wilson L, McGregor L, et al. Active B12: A Rapid, Automated Assay for Holotranscobalamin on the Abbott AxSYM Analyzer. Clinical Chemistry 2008; 096784; 54/3: 567–573.

4. Nexo E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. Am J Clin Nutr 2011; PMCID: PMC3127504, doi: 10.3945/ajcn.111.013458; 94(1): 359S–365S

5. Bamonti F, Moscato G, Novembrino C, et al. Determination of serum holotranscobalamin concentrations with the AxSYM active B12 assay: cut-off point evaluation in the clinical laboratory. Clin Chem Lab Med 2010; doi: 10.1515/CCLM.2010.032; 48/2: 249–253.

6. Fragasso A, Mannarella C, Ciancio A, et al. Holotranscobalamin Is a Useful Marker of Vitamin B12 Deficiency in Alcoholics. The Scientific World Journal 2012; 128182, 4 pages, doi:10.1100/2012/128182

7. Fletcher A, Holding S. Guidelines for the investigation and management of Vitamin B12 and Folate deficiency. Blood Sciences Department. Hull & East Yorkshire Hospital NHS Trust Hull and East Riding Prescribing Committee. UI/H/22 B12 & Folate Guidelines.05/01/2015;
Dostupno na adresi:
http://www.hey.nhs.uk/wp/wp-content/uploads/2016/03/vitaminB12FolateDeficiency.pdf
Datum pristupa: 17.06.2016.

8. Furger E. Structural and Functional Characterisation of the Cobalamin Transport Protein Haptocorrin. ETH Zürich, 2012; Nr. 20838, doi: http://dx.doi.org/10.3929/ethz-a-007608480

9. Moss G P, The Nomenclature of Corrinoids. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Department of Chemistry, Queen Mary University of London 1975. Dostupno na adresi: http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/B12.html
Datum pristupa: 20.06.2016.

10. Schjønsby H. Vitamin B12 absorption and malabsorption. Medical Department. Aker University Hospital, Oslo 1989. Gut. PMCID: PMC1434458; 30(12): 1686–1691.

11. O'Leary F, Samman S. B vitamin status, dietary intake and length of stay in a sample of elderly rehabilitation patients. J Nutr Health Aging. 2011. PMID: 21623471; 15(6): 485-9.

12. Štraus B. Medicinska biokemija. Medicinska naklada. Zagreb, 2009.

13. Mariusz Jaskolski. Special Issue of Postepy Biochemii (Advances in Biochemistry). Centre of Excellence in Biocrystallography. July 14, 2016 (MJ). Dostupno na adresi: http://www.man.poznan.pl/CBB/

14. Nielsen M, Rasmussen M, Andersen C. Nexø E, Moestrup S. Vitamin B12 transport from food to the body's cells – a sophisticated, multistep pathway. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012 May 1; PMID: 22547309, doi: 10.1038/nrgastro.2012.76; 9(6):345-54.

15. Steven D. Vitamin B12 (Cobalamin). AZ. Review provided by VeriMed Healthcare Network. Phoenix. 10/19/2015; Dostupno na adresi:
http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-b12-cobalamin
Datum pristupa: 20.06.2016.

16. Harshman R, Aldoori M. Vitamin B12 and health. Can Fam Physician. 2008 Apr; PMID: 18411381; 54(4):536-41.

17. Robert C, Brown D. Vitamin B12 Deficiency. Am Fam Physician. 2003 Mar 1; PMID: 12643357; 67(5):979-86.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 16. listopada 1988. u Osijeku. Završio sam Osnovnu školu „Mladost“ u Osijeku, te nakon završene osnovne škole 2003. godine upisao sam Trgovačku i komercijalnu školu „Davor Milas“ u Osijeku. Maturirao sam 2007. s vrlo dobrim uspjehom. Godine 2013. upisao sam se na izvanredni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike pri Medicinskom fakultetu u Osijeku, te sam trenutno na 3. -oj godini studija.