

# Vrijednosti kobalamina i holotranskobalamina kod pretilih

---

Oreški, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:896674>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Elena Oreški**

**Vrijednosti kobalamina i holotranskobalamina  
kod pretilih**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb pod stručnim vodstvom prof.dr.sc. Dunje Rogić i dr.sc. Saše Kralik-Oguić.

*Zahvaljujem se prof.dr.sc. Dunji Rogić i dr.sc. Saši Kralik Oguić na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvale dugujem i svojim sestrama, roditeljima te baki i djedu bez kojih ne bi bila tu gdje jesam.*

*Puno hvala mojim kolegicama i kolegama te svim prijateljima na prekrasnom iskustvu studiranja, na svakoj pomoći i udijeljenom savjetu, na svakoj šali i smijehu, ali i podršci kad god je zapelo.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. PRETILOST.....	1
1.1.1. Etiologija pretilosti.....	2
1.1.2. Patofiziologija pretilosti i komplikacije.....	3
1.2. KOBALAMIN I HOLOTRANSKOBALAMIN.....	4
1.2.1. Struktura kobalamina .....	4
1.2.2. Apsorpcija, transport, metabolizam i ekskrecija .....	5
1.2.3. Uloge vitamina B <sub>12</sub> .....	6
1.2.4. Deficit vitamina B <sub>12</sub> .....	9
1.3. LABORATORIJSKO ODREĐIVANJE .....	11
1.3.1. Metode određivanja.....	11
1.3.2. Referentni intervali.....	13
1.3.3. Predanalitički čimbenici.....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. ISPITANICI .....	16
3.2. METODE.....	16
3.2.1. Određivanje koncentracije kobalamina .....	16
3.2.2. Određivanje koncentracije holotranskobalamina.....	17
3.3. STATISTIČKE METODE.....	18
4. REZULTATI.....	19
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK .....	26
7. POPIS KRATICA .....	27
8. LITERATURA .....	28
9. SAŽETAK.....	31
9.1. SAŽETAK.....	31
9.2. SUMMARY .....	32

# 1. UVOD

## 1.1. PRETILOST

Pretilost se definira kao nenormalno ili prekomjerno nakupljanje masti koje može narušiti zdravlje. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO, prema engl. *World Health Organization*) pretilost definira kao bolest. Smatra se jednom od najčešćih bolesti modernog društva te kao takva predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih izazova 21. stoljeća ([www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight)).

Kako struktura tijela i koštano-mišićne građe može značajno varirati od osobe do osobe, pretilost nije jednostavno definirati. Za mjerenje masnog tkiva u tijelu te klasifikaciju pretilosti najčešće se koristi indeks tjelesne mase – ITM (engl. *Body mass indeks – BMI*) koji se izračunava dijeljenjem tjelesne mase izražene u kilogramima i kvadrata tjelesne visine izražene u metrima. Klasifikacija pretilosti SZO pomoću ITM prikazana je na Slika 1. Klasifikacija pretilosti ovisno o ITM prema SZO, preuzeto i prilagođeno: Soldo i sur., 2020a(Soldo i sur., 2020a).

<b>ITM 21 – 25 kg/m<sup>2</sup></b>	normalna tjelesna masa
<b>ITM 25 – 29,9 kg/m<sup>2</sup></b>	prekomjerna tjelesna masa
<b>ITM 30 – 34,9 kg/m<sup>2</sup></b>	pretilost I. stupnja
<b>ITM 35 – 39,9 kg/m<sup>2</sup></b>	pretilost II. stupnja
<b>ITM &gt; 40 kg/m<sup>2</sup></b>	pretilost III. stupnja – bolesna pretilost
<b>ITM &gt; 50 kg/m<sup>2</sup></b>	pretilost IV. stupnja - superpretilost

*Slika 1. Klasifikacija pretilosti ovisno o ITM prema SZO, preuzeto i prilagođeno: Soldo i sur., 2020a*

Osim indeksa tjelesne mase, prilikom procjene pretilosti, poželjno je znati i parametre poput baznog metaboličkog indeksa (engl. *Basal Metabolic Rate – BMR*). BMR predstavlja minimalni dnevni iznos energije u kalorijama potreban tijelu koje se odmara, ima normalnu tjelesnu temperaturu te je u postapsorptivnom stanju. BMR ovisi o mnogim čimbenicima, no za čak 90% varijacije BMR-a između jedinki zaslužna je tjelesna masa (Soldo i sur., 2020a; White i Kearney, 2013).

### 1.1.1. Etiologija pretilosti

Iako postoje razne teorije njihovog nastanka, sve se uglavnom slažu da prekomjerna tjelesna masa i pretilost imaju kompleksnu etiologiju koja osim fizioloških mehanizama uključuje i psihološki i kulturni utjecaj. Pretilost se razvija zbog neravnoteže unosa i potrošnje energije pri čemu je dominacija na strani unosa te nastaje uzajamnim djelovanjem gena i okoliša (Soldo i sur., 2020a).

Nagli porast broja pretilih u zadnjih 20 do 30 godina ističe važnost životnih navika i okolišnih čimbenika jer do genskih promjena ne bi moglo doći tako brzo. Smanjena tjelesna aktivnost tako je jedan od važnijih uzroka pretilosti kao i navika prekomjernog uzimanja hrane. Ipak genetski čimbenici mogu predodrediti jaču osjetljivost mnogih ljudi na okolišna djelovanja. Polimorfizmom određenih gena određuje se apetit i metabolizam pojedinca čime neki imaju veću predispoziciju za razvoj pretilosti. Geni mogu pridonijeti pojavi pretilosti uzrokujući poremećaje puteva koji reguliraju funkciju centara za hranjenje ili pak utroška energije i pohrane masti. Najčešći dosad poznati genski uzrok pretilosti su mutacije gena MC4R (engl. *melanocortin-4-receptor*), dok su rjeđe to nasljedna nedostatnost leptina uzrokovana mutacijom leptinskog gena te mutacije leptinskih receptora. Također, pronađena je poveznica između više od 41 mjesta u ljudskom genomu i povećanog rizika od pretilosti. Tako primjerice ljudi koji posjeduju dva alela FTO gena (engl. *Fat mass and obesity associated gene*) imaju 1,67 puta veći rizik od razvoja pretilosti. Ovisno o istraživanoj populaciji, postotak pretilosti koji se može pripisati genetici varira od 6 do 85% (Soldo i sur., 2020a; Guyton i Fall, 2017).

Određene bolesti te neki psihički poremećaji, kao i lijekovi kojima se ti poremećaji liječe također povećavaju rizik razvoja pretilosti. Neke od njih su hipotireoza, Cushingov sindrom, nedostatak hormona rasta te poremećaji apetita poput *night eating* sindroma (NES) ili *binge eating* sindroma (BED). Kod nekih rijetkih poremećaja poput Prader-Willijevog sindroma, Bardet-Biedlov sindroma, Cohen sindroma i MOMO sindroma, pretilost je jedna od glavnih obilježja. Lijekovi koji mogu povećati rizik od pretilosti su inzulin, sulfonilureja, tiazolindioni, atipični antipsihotici, antidepresivi, steroidi, neki antikonvulzivi te neki hormonalni kontraceptivi. (Soldo i sur., 2020a).

### 1.1.2. Patofiziologija pretilosti i komplikacije

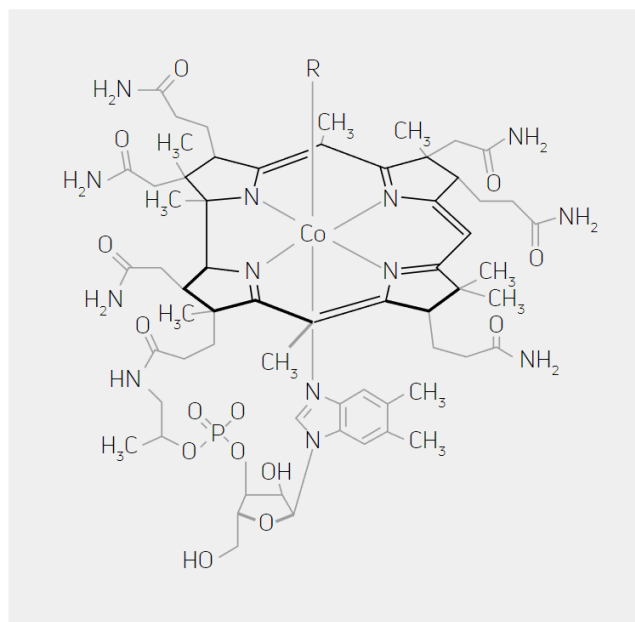
Pretilost predstavlja kroničnu bolest sa širokom paletom mogućih komplikacija. Raspored masnog tkiva u organizmu igra važnu ulogu u razvoju komplikacija kod pretilih osoba pa tako razlikujemo dva tipa masnog tkiva: potkožno i visceralno (abdominalno). Visceralno masno tkivo izlučuje razne citokine (adipokine) izravno u portalni krvotok čime utječe na jetrene funkcije, a samim time i na funkcije drugih organskih sustava. Veći udio visceralnog masnog tkiva povezan je s većim rizikom od razvoja komplikacija nego potkožni tip masnog tkiva. Mjerenjem opsega struka procjenjuje se količina visceralnog masnog tkiva, a sam opseg struka povezuje se s rizikom od razvoja metaboličkog sindroma. Žene s opsegom struka od 88cm ili više te muškarci s opsegom struka 102cm ili više imaju visok rizik od nastanka metaboličkog sindroma. Pretilost se također može podijeliti prema veličini i broju masnih stanica na hipertrofičnu kod koje je povećana veličina masnih stanica te hiperplastičnu kod koje je povećan broj masnih stanica. Kod ekstremno pretilih osoba zastupljen je i hipertrofični i hiperplastični tip debljine. Gubitkom tjelesne mase smanjuje se veličina masnih stanica ali ne i njihov broj (Soldo i sur., 2020b).

Ekstremna pretilost ( $ITM > 35 \text{ kg/m}^2$ ) povezana je s višom smrtnošću i raznim komplikacijama. Pretilost ne znači nužno da će se komplikacije razviti, već vjerojatnost razvoja komplikacija ovisi i o dobi kada je nastupila pretilost, fizičkoj aktivnosti i formi pacijenta, distribuciji masnog tkiva te o prisutnosti inzulinske rezistencije. Komplikacije koje se povezuju uz pretilost su: dijabetes melitus tipa 2, hipertenzija, dislipidemija, razne bolesti srca (koronarna arterijska bolest, zastoj srca, atrijska fibrilacija), cerebrovaskularne bolesti, respiratorne bolesti (astma i opstruktivna apneja) komplikacije u gastrointestinalnom sustavu (žučni kamenci, nealkoholna masna jetra, gastrointestinalni refluks), razne ginekološke i opstetičke komplikacije (gestacijski dijabetes, hipertenzija uzrokovana trudnoćom, policistični jajnici, neplodnost), karcinomi (dojka, endometrij, kolon), osteoartritis i razne psihosocijalne disfunkcije (Marshall i Ayling, 2018).

## 1.2. KOBALAMIN I HOLOTRANSKOBALAMIN

### 1.2.1. Struktura kobalamina

Vitamin B<sub>12</sub> je vitamin topljiv u vodi ključan u eritropoezi, procesu metilacije te je kofaktor raznih enzima, posebice onih uključenih u metabolizam metilamalonске kiseline (MMA, engl. *methylmalonic acid*) i homocisteina (Hcy, engl. *homocysteine*). Pojam vitamin B<sub>12</sub> obuhvaća grupu fiziološki aktivnih tvari koje se kemijski klasificiraju kao kobalamini. Građeni su od tetrapirolskog prstena koji se naziva korin, zbog čega se ova skupina molekula naziva i korinoidima. Kada je korin u kompleksu s centralnim atomom kobalta, tada se taj kompleks naziva kobamid (Slika 2). Na atom kobalta također mogu biti vezani razni nukleotidni bočni lanci prema čemu razlikujemo nekoliko oblika kobalamina: metilkobalamin s metilom kao bočnom skupinom, deoksiadenozilkobalamin (odnosno koenzim B<sub>12</sub>) s 5'-deoksiadenozinom kao bočnom skupinom, hidroskobalamin s hidrosilnom bočnom skupinom te cijanokobalamin s vezanim cijanidom. Najdominantniji oblik kobalamina u serumu je metilkobalamin dok je u citosolu to adenzilkobalamin (Roberts i sur., 2018).



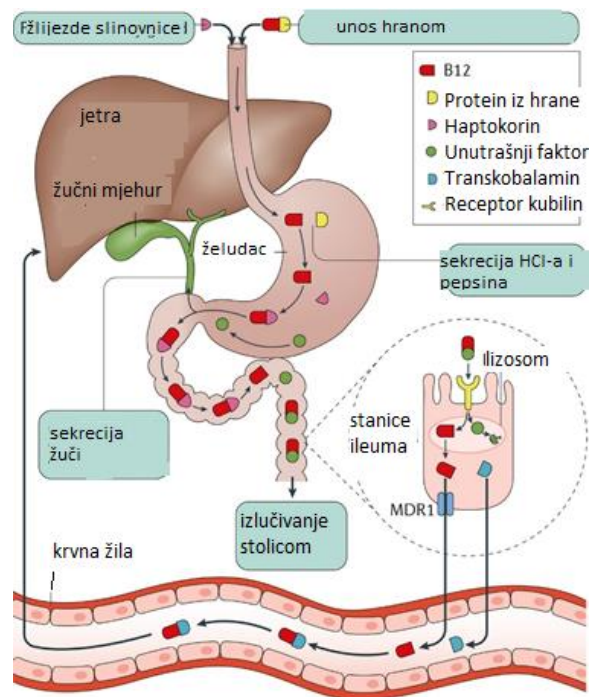
Slika 2. Osnovna struktura kobalamina, preuzeto s [www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html](http://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html)



### 1.2.2. Apsorpcija, transport, metabolizam i ekskrecija

Vitamin B<sub>12</sub>, čvrsto je vezan na proteine te je za njegovo otpuštanje iz hrane ključno djelovanje želučane kiseline i pepsina zbog čega neki lijekovi koji smanjuju kiselost želuca poput inhibitora protonske pumpe mogu uzrokovati deficit. Molekula B<sub>12</sub> vezana je za haptokorin (engl. *haptocorin*, HC) te tako vezana putuje u duodenum gdje HC probavljaju enzimi gušterače, a slobodni vitamin B<sub>12</sub> veže se na unutrašnji faktor (IF, engl. *Intrinsic factor*). IF je glikoprotein koji luče parijetalne stanice želuca u fundusu i korpusu želuca. Hrana, histamin i gastrin stimuliraju gastrično lučenje IF-a dok nervus vagus inhibira njegovo lučenje. Kompleks B<sub>12</sub>-IF zatim putuje do distalnog ileuma gdje se veže za receptor kubilin koji se nalazi na površini mukoznih stanica epitela te B<sub>12</sub>-IF kompleks pinocitozom ulazi u stanice. Lizosomi unutar stanica disociraju B<sub>12</sub>-IF kompleks nakon čega se vitamin B<sub>12</sub> otpušta u krv (*Slika 3*). U cirkulaciji vitamin B<sub>12</sub> može biti vezan na protein haptokorin i transkobalamin (TC, engl. *transcobalamin*). Kada je na transkobalamin vezan vitamin B<sub>12</sub> taj se kompleks naziva holotranskobalamin (holoTC). Jedino frakcija vitamina B<sub>12</sub> u obliku holotranskobalamina ima sposobnost ulaska u stanice putem receptora te kao takva posjeduje bioaktivnost. Holohaptokorin luče granulociti te mu je funkcija zasad nepoznata, no niske serumske koncentracije HC vrlo su česte kod osoba sa sniženim koncentracijama vitamina B<sub>12</sub>. Na HC vezana frakcija vitamina B<sub>12</sub> čini 80-94% ukupnog plazmatskog vitamina B<sub>12</sub> dok ostatak čini holotranskobalamin. Iako je prisutan u daleko manjem udjelu od HC, transkobalamin je važniji transportni protein kobalamina od haptokorina (Marshall i Ayling, 2018; Roberts i sur., 2018).

Transkobalamin je β-protein s molekularnom masom od 43kDa koji se sintetizira u jetri. Na jednoj molekuli transkobalamina postoji jedno vezno mjesto za molekulu kobalamina. TC transportira vitamin B<sub>12</sub> do receptora na stanicama u čitavom tijelu. Vitamin B<sub>12</sub> može i samostalno ući u stanice, no taj je proces neučinkovit pa ukoliko dođe do malapsorpcije TC-vezanog vitamina B<sub>12</sub> u velikom broju slučajeva dolazi do deficijencije kobalamina. Gotovo sav vitamin B<sub>12</sub> vezan na TC prilikom prolaska krvi kroz jetru ulazi u hepatocite gdje se pohranjuje, a zatim i otpušta ovisno o fiziološkim potrebama. Otprilike 1mg vitamina B<sub>12</sub> uskladišteno je u jetri što odgovara dnevnim metaboličkim potrebama za 2000 dana, dok je u tijelu ukupno uskladišteno 2-5mg. Kako je ovako velika količina vitamina B<sub>12</sub> uskladištena u tijelu, ukoliko dođe do smanjenog unosa hranom ili poremećaja mehanizma unosa, deficijencija B<sub>12</sub> može proći nezamijećena godinama (Roberts i sur., 2018).



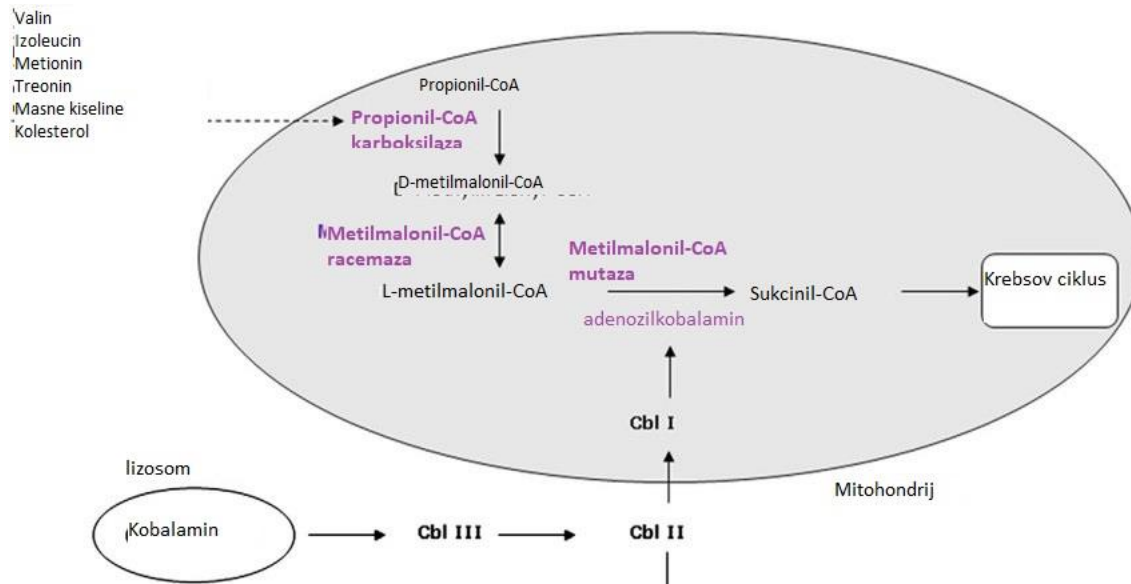
Slika 3. Apsorpcija, transport, metabolizam i ekskrecija vitamina B<sub>12</sub>, preuzeto i prilagođeno iz Green i sur., (2017)

Vitamin B<sub>12</sub> se kontinuirano izlučuje u žuč, no većina ga se ponovno reapsorbira te je dostupan za metaboličke funkcije. Ukoliko količina vitamina premaši vezne kapacitete krvi, višak se izlučuje urinom, no najviše se izlučuje stolicom (Roberts i sur., 2018).

### 1.2.3. Uloge vitamina B<sub>12</sub>

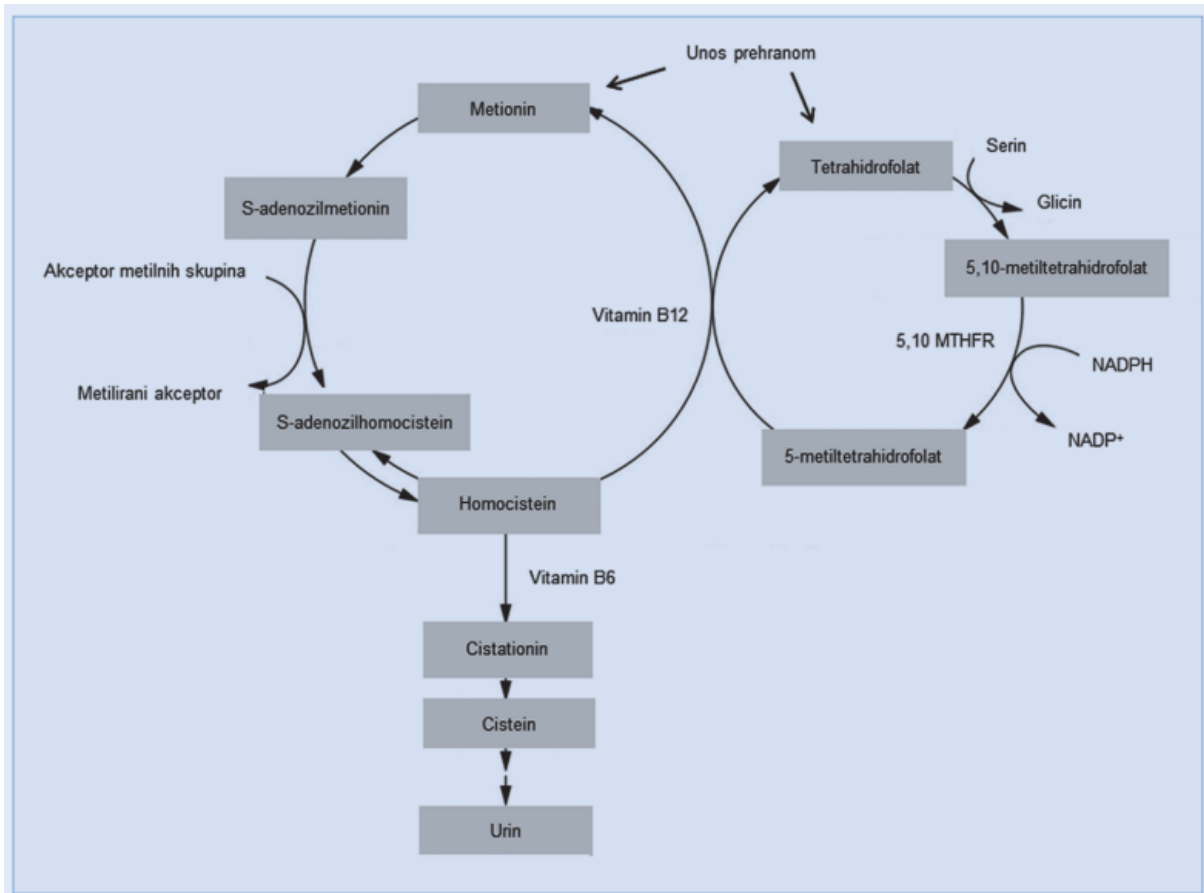
Vitamin B<sub>12</sub> kofaktor je i koenzim za mnoge enzimske sustave. Dio je koenzima adenzilkobalamina (koenzim B<sub>12</sub>) za enzim L-metilmalonil-CoA mutazu u reakciji konverzije L-metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA (Slika 4). U ovoj reakciji propionil-CoA se karboksilira na račun hidrolize molekule ATP-a pri čemu nastaje D-metilmalonil-CoA. Ovu reakciju karboksilacije katalizira propionil-CoA karboksilaza. D-metilmalonil-CoA se zatim uz metilmalonil-CoA racemazu izomerizira u L-izomer koji je supstrat metilmalonil-CoA mutaze. Metilmalonil mutaza intramolekularnim rearanžiranjem molekule prevodi metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA pri čemu -CO-S-CoA skupina migrira s C-2 metilne skupine u zamjenu za atom vodika. Ukoliko je prisutan urođeni defekt mutaze ili nemogućnost sinteze adenzilkobalamina

može doći do po život opasne metilmalonske acidurije i metaboličke ketoacidoze (Roberts i sur., 2018).



Slika 4. Uloga kobalamina u reakciji enzima metilmaloniil-CoA mutaze (preuzeto i prilagođeno iz Scolamiero i sur., 2014)

Vitamin B<sub>12</sub> u obliku metilkobalamina kao koenzim metionin sintaze važan je u reakciji pretvorbe homocisteina u metionin. Metilkobalamin u ovoj reakciji služi kao intermedijar prilikom prijenosa metilne skupine s 5-metiltetrahidrofolata (5-MTHF) na Hcy kako bi nastao metionin. Kao produkt ove reakcije nastaje tetrahidrofolat iz kojeg dalje nastaje metiltetrahidrofolat potreban za *de novo* sintezu timidina ključnog za replikaciju i popravak DNA. Sintaza metionina iz homocisteina i 5-MTHF tako povezuje metabolizam kobalamina i folne kiseline (vitamin B<sub>9</sub>) (Slika 5). Ukoliko dođe do defekta bilo kojeg od ova dva vitamina može doći do defekta replikacije DNA. Kod deficita kobalamina, smanjuje se transmetiliranje s 5-MTHF zbog čega dolazi do njegova nakupljanja i povećanja koncentracije u serumu. Urođeni defekt metionin sintaze tako može dovesti do hiperhomocistinemije (Roberts i sur., 2018; Štraus i Petlevski, 2009; Green R i sur., 2017).



Slika 5. Uloga kobalamina u metabolizmu homocisteina (preuzeto iz Babić Božović i Vraneković, 2014)

#### 1.2.4. Deficit vitamina B<sub>12</sub>

Najčešći uzrok deficita vitamina B<sub>12</sub> je perniciozna anemija. Perniciozna anemija je autoimuna bolest kod koje nastaju antitijela na H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-azu želučanih parijetalnih stanica koja u želucu luči H<sup>+</sup> u zamjenu za kalij (K<sup>+</sup>). Posljedično dolazi do kroničnog atrofičnog gastritisa želuca i gubitka parijetalnih stanica želuca. Zbog gubitka parijetalnih stanica dolazi do smanjenja proizvodnje IF-a koji je potreban za apsorpciju vitamina B<sub>12</sub>. Osim kod perniciozne anemije, deficit vitamina B<sub>12</sub> često se javlja kod osoba starijih od 65 godina, vegana i vegetarijanaca, novorođenčadi s metaboličkim poremećajima te kod osoba koje uzimaju lijekove koji interferiraju s apsorpcijom ili metabolizmom vitamina B<sub>12</sub> (fenitoin, inhibitori dihidrofolat reduktaze, metformin, inhibitori protonske pumpe). Do deficita također može doći zbog intestinalne malapsorpcije koju uzrokuju resekcija ileuma ili gastrektomija, tropske spru, upalne bolesti crijeva, intestinalne staze te kod infekcije HIV-om. Kod djece, deficit vitamina B<sub>12</sub> povezuje se s nekoliko poremećaja. Najčešći je Imerslund-Grasbeck sindrom kod kojeg je zbog mutacija u proteinima receptora za kompleks vitamin B<sub>12</sub>-IF spriječena apsorpcija vitamina B<sub>12</sub> uz prisutnu proteinuriju. Do deficijencije također može doći zbog urođene deficijencije želučane sekrecije IF-a te kod dojenčadi čije majke imaju nedijagnosticiranu pernicioznu anemiju uslijed deficita B<sub>12</sub> u majčinom mlijeku. Ovakvi slučajevi su ipak rijetki jer su žene s nedijagnosticiranom pernicioznom anemijom koja se ne liječi najčešće neplodne (Roberts i sur., 2018).

Vitamin B<sub>12</sub> važan je za proces eritropoeze. Kod nedostatka vitamina B<sub>12</sub> dolazi do makrocitoze za koju je karakterističan povećani MCV (engl. *mean corpuscular volume*) s vrijednostima većim od 98 fl te megaloblastična anemija uz nezrele, velike eritrocite koji posjeduju jezgru kao rezultat defektne sinteze DNA za koju su ključne adekvatne koncentracije vitamina B<sub>12</sub> kao i folata (vitamin B<sub>9</sub>). Hematološke posljedice deficita uključuju razne morfološke promjene krvnih stanica poput hipersegmentacije neutrofila, makrocitoze, anemije, leukopenije i trombocitopenije uz megaloblastične promjene u koštanoj srži koje prate promjene u perifernoj krvi. Mnogo nezrelih stanica umire već u koštanoj srži apoptozom što se naziva inefektivnom eritropoezom. Ovaj proces uzrokuje otpuštanje bilirubina i laktat dehidrogenaze u krv (Roberts i sur., 2018).

Osim hematoloških abnormalnosti, deficit može dovesti i do demijelinizacije središnjeg živčanog sustava. Deficit vitamina B<sub>12</sub> tako može dovesti do ozbiljnih i često nepovratnih neuroloških poremećaja poput žareće boli ili gubitka osjeta u ekstremitetima, slabosti, grčenja

i paralize, zbunjenosti, dezorijentacije te demencije. Odgovor neuroloških simptoma na nadomjesnu terapiju vitaminom B<sub>12</sub> često ovisi o trajanju simptoma. Uslijed deficita, također može doći do pojave gastrointestinalnih poremećaja poput glostitisa jezika, gubitka apetita i mršavljenja, nadutosti i konstipacije, raznih mentalnih promjena te neplodnosti (Roberts i sur., 2018).

Deficijencija vitamina B<sub>12</sub> prolazi nekoliko stadija. Prvo dolazi do pražnjena skladišta vitamina B<sub>12</sub> što se reflektira sniženim koncentracijama holoTC. Zbog praznih rezervi vitamina, on se ne dostavlja u adekvatnoj količini do stanica i u stanicama se više ne mogu ispravno odvijati reakcije ovisne o vitaminu B<sub>12</sub>. U ovom stadiju, koji se naziva funkcionalnom deficijencijom vitamina B<sub>12</sub>, osim sniženih serumskih koncentracija holoTC, prisutne su i povišene vrijednosti Hcy i MMA. Stadij kliničke manifestacije obilježen je makrocitnom anemijom s povišenim MCV-om, sniženim MCHC-om te neutrofilnom hipersegmentacijom. U ovom stadiju također može doći do neuroloških manifestacija bez hematoloških abnormalnosti ([www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html](http://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html)).

Preporučeni dnevni unos (RDA) temelji se na količini potrebnoj za održavanje hematološkog statusa i normalne serumске koncentracije vitamina B<sub>12</sub>. Za odrasle on iznosi 2,4 µg/dan. Tijekom trudnoće preporuča se povećati dnevni unos na 2,6 µg/dan, a kod dojenja na 2,8 µg/dan. Kod 10-30% osoba starijih od 50 godina, smanjena je apsorpcija vitamina B<sub>12</sub> pa se kod njih preporuča prehrana hranom obogaćenom vitaminom B<sub>12</sub> ili korištenje nadomjesnih suplemenata (Roberts i sur., 2018).

## 1.3. LABORATORIJSKO ODREĐIVANJE

### 1.3.1. Metode određivanja

Za određivanje koncentracije vitamina B<sub>12</sub> razvijene su razne metode koje uključuju mikrobiološke metode, metode kompetitivnog vezanja proteina te imunokemijske metode. Kod većine metoda, potrebno je prethodno obraditi uzorak kako bi se vitamin B<sub>12</sub> oslobodio s veznih proteina. U mikrobiološkim metodama određuje se rast mikroorganizama koji za to trebaju kobalamin. Najosjetljiviji je *Euglena gracilis*, a najveću specifičnost pokazuje *Ochromonas malhanesis*. Mikrobiološke metode danas se rjeđe koriste i zamijenjene su preciznijim metodama (Roberts i sur., 2018; Štraus i Petlevski, 2009).

Jedna od metoda određivanja je RIA (engl. *radioimmunoassay*). To je imunokompetitivna metoda kod koje se kobalamin iz uzorka pacijenta natječe s radioaktivno obilježenim kobalaminom (npr. tirozin-metil ester vitamina B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>-TME-<sup>125</sup>I)) za anti- B<sub>12</sub> antitijela u reakcijskoj posudi. Radioaktivnost izmjerena nakon ispiranja reakcijske posude obrnuto je proporcionalna koncentraciji vitamina B<sub>12</sub>. Slično RIA metodi, moguće je određivanje koncentracije vitamina B<sub>12</sub> kemiluminiscentnom imunometodom. Kod nje se slobodan vitamin B<sub>12</sub> iz uzorka natječe s poznatom koncentracijom označenog vitamina B<sub>12</sub> (npr. akridinijumesterom) za vezna mjesta na unutrašnjem faktoru poznate koncentracije. IF je vezan na paramagnetske čestice u čvrstoj fazi. Nakon magnetske separacije, potiče se kemiluminiscentna reakcija. Izmjerena luminiscencija obrnuto je proporcionalna koncentraciji vitamina B<sub>12</sub> iz uzorka pacijenta ([www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html](http://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html)).

Kao marker biološki dostupnog vitamina B<sub>12</sub> također se može koristiti mjerenje vrijednosti holotranskobalamina. Jedino je taj oblik vitamina B<sub>12</sub> dostupan za unos svim stanicama te kao takav ima najbolju dijagnostičku točnost prilikom dijagnostike deficijencije vitamina B<sub>12</sub>. Jedna od metoda određivanja koncentracije holoTC je enzimska imunometoda. Koristi mikročestice obložene monoklonskim anti-holoTC antitijelima. HoloTC iz uzorka veže se na antitijela na mikročesticama formirajući kompleks antigen-antitijelo. Dodaje se konjugat obilježen alkalnom fosfatazom (ALP), a nakon koraka ispiranja dodaje se supstrat, primjerice 4-metilumbeliferil-fosfat. ALP-om obilježen konjugat katalizira kidanje fosfata sa supstrata čime nastaje fluorescentni produkt 5-metilumbeliferon koji se mjeri optički. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji holoTC u uzorku. HoloTC također se može odrediti metodom koja koristi magnetske čestice obložene vitaminom B<sub>12</sub> koje precipitiraju apo-transkobalamin

iz plazme. HoloTC prisutan u supernatantu mjeri se zatim ELISA metodom koja koristi imobilizirana anti-TC antitijela. Anti-TC antitijela vežu holoTC iz plazme nakon čega se na njega vežu biotinizirana antitijela. Za obojenje koristi se peroksidaza iz hrena pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan koncentraciji holoTC u uzorku ([www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html](http://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html)).

Rezultati testova određivanja holotranskobalamina teško se interpretiraju, te su upitne njihova osjetljivost i specifičnost pa testiranje zasad nije široko rasprostranjeno i rijetko se koristi (Roberts i sur., 2018).

Određivanje koncentracije metilmalonske kiseline (MMA) također se može koristiti kao indikator deficita vitamina B<sub>12</sub>. Osim MMA, u dijagnostičke svrhe može se koristiti i mjerenje koncentracije homocisteina, no MMA je specifičnija za deficit vitamina B<sub>12</sub> jer do porasta koncentracije Hcy dolazi i uslijed deficita folata i kobalamina. Za određivanje MMA koristi se plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS, engl. *gas-liquid chromatography-mass spectrometry*). Za dijagnostiku deficita kobalamina trenutno ne postoji „zlatni standard“, no on se najčešće definira kao koncentracija kobalamina u plazmi < 150 pmol/L, Hcy > 13 μmol/L i MMA u plazmi > 0,40 μmol/L (Hvas i Neco, 2006; [www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html](http://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html)).

Koncentracija MMA i Hcy povišena je kod više od 98% pacijenata s kliničkim deficitom vitamina B<sub>12</sub> (Stabler, 2012). Kako mjerenje koncentracije vitamina B<sub>12</sub> pokazuje slabu specifičnost u potvrdi dijagnoze deficijencije vitamina B<sub>12</sub>, dijagnozu je potrebno potvrditi i mjerenjem koncentracije MMA i Hcy koje pokazuju veću specifičnost prilikom dijagnostike deficita kobalamina. Pokazano je da se povišene razine MMA i Hcy uzrokovane deficitom kobalamina, smanjuju odmah nakon nadomjesne terapije vitaminom B<sub>12</sub> (Stabler i sur., 1990). Iako je MMA dobar pokazatelj deficijencije vitamina B<sub>12</sub>, potreban je oprez kod pacijenata s renalnim oštećenjima kod kojih može doći do blagog povišenja vrijednosti (300-700 nmol/L) (Rasmussen i sur., 1990).



### 1.3.2. Referentni intervali

Prvi korak u određivanju statusa vitamina B<sub>12</sub> jest određivanje koncentracije ukupnog serumskog vitamina B<sub>12</sub>. Testovi koji se koriste u ovu svrhu kvantificiraju i inaktivnu frakciju vitamina B<sub>12</sub> u obliku holohaptokorina te aktivnu frakciju u obliku holotranskobalamina. Nije u potpunosti razjašnjeno koja je koncentracija kobalamina klinički normalna, no vrijednost manja od 148 pmol/L (200 ng/L) ima 97%-tnu dijagnostičku osjetljivost deficijencije kobalamina (Snow, 1999; Carmel i Sarrai, 2006). Dodatni problem prilikom definiranja referentnih intervala i uspoređivanja međulaboratorijskih rezultata jest upotreba različitih mjernih jedinica pa se tako kod nekih koriste pmol/L, a kod drugih ng/L pri čemu je 1 pmol/L jednak 1,355 ng/L (Devalia i sur., 2014). Prilikom dijagnostike deficijencije vitamina B<sub>12</sub> jednu od prepreka predstavlja i izbor donje cut-off vrijednosti koje se za kobalamin u raznim izvorima kreću od 100 pmol/L do 350 pmol/L (Eussen i sur., 2005; Eussen i sur., 2007; Zappacosta i sur., 2013). Tehnička konzultacija SZO o deficijenciji folata i vitamina B<sub>12</sub> (engl. *WHO Technical Consultation on folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies*) iz 2008. donosi preporuku za definiranje deficita vitamina B<sub>12</sub> koji se temelji na koncentracijama vitamina B<sub>12</sub> ispod kojih se u plazmi pronalaze povišene koncentracije homocisteina i MMA. Za vitamin B<sub>12</sub> preporučena cut-off vrijednost tako iznosi 150 pmol/L (de Benoist, 2008).

Koncentracija serumskog vitamina B<sub>12</sub> unutar referentnog intervala ne mora značiti adekvatan status vitamina, pa tako ni niska serumska koncentracija vitamina B<sub>12</sub> ne mora nužno značiti deficijenciju. Kako je većina vitamina B<sub>12</sub> u serumu vezana na transkobalamin, niska serumska koncentracija kobalamina može nastati kao posljedica smanjene koncentracije transkobalamina do koje dolazi u nekim stanjima poput benigne neutropenije, multiplog mijeloma i leukemijske retikuloendotelioze. Niske vrijednosti holoTC tako se mogu pronaći kod pacijenata s normalnim serumskim koncentracijama vitamina B<sub>12</sub> zbog čega je holoTC bolji prediktor količine vitamina B<sub>12</sub> od ukupne koncentracije vitamina B<sub>12</sub> (Roberts i sur., 2018). Referentni intervali za holoTC također se razlikuju kod različitih autora pa tako gornja i donja granica referentnog intervala za holoTC variraju od 19-42 pmol/L do 134-157 pmol/L (Refsum i sur., 2006; Brady i sur., 2008; Sobczynska-Malefora i sur., 2014).

Najraniji marker deficijencije vitamina B<sub>12</sub> jest snižena koncentracija holoTC. Ona ukazuje na nisku opskrbu vitaminom B<sub>12</sub> te da su rezerve vitamina pri kraju. Kod metabolički manifestirane (funkcionalne) deficijencije vitamina B<sub>12</sub> moguće je da još nije došlo do kliničke manifestacije. Nalaz sniženih koncentracija holoTC, povišene MMA i homocisteina upućuje na metabolički

manifestiranu deficijenciju. Dijagnostička upotreba holoTC omogućuje raniji početak terapije, prije nego što dođe do težih oštećenja. HoloTC kao metabolički aktivna forma vitamina B<sub>12</sub> značajno korelira s MMA. Zbog tog su razloga holoTC i MMA pogodniji za određivanje vrijednosti vitamina B<sub>12</sub> nego ukupne koncentracije vitamina B<sub>12</sub>. Ipak za pouzdanu dijagnozu deficijencije nije dovoljno pojedinačno koristiti navedene markere već ih je potrebno određivati zajedno kako bi se pacijentu pružila adekvatna dijagnoza ([www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html](http://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html)).

### 1.3.3. Predanalitički čimbenici

Kod pacijenata s pernicioznom anemijom moguće su lažno povišene koncentracije vitamina B<sub>12</sub> kada se za analizu koriste automatski analizatori koji koriste metodu kompetitivnog vezanja serumskog vitamina B<sub>12</sub> na IF. Kod 70% pacijenata s pernicioznom anemijom prisutne su visoke koncentracije antitijela koja blokiraju IF što interferira s metodom. Alternativne metode i načini uklanjanja ove interferencije postoje, no zasad još nije potvrđena njihova točnost te se trebaju koristiti s oprezom. Uzorak izbora za analizu je serum, no potrebno je konzultirati se s laboratorijem u kojem se analiza izvodi kako bi se potvrdilo slaže li se to s njihovom analitičkom metodom. Idealno uzimanje uzorka je natašte, posebice kod osoba na nadomjesnoj terapiji vitaminom B<sub>12</sub>. Vitamin B<sub>12</sub> pokazuje stabilnost do 72 sata na sobnoj temperaturi (Roberts i sur., 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ovim radom želi se ispitati postoji li statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama kobalamina i holotranskobalamina kod ispitanika s pretilošću u usporedbi s ispitanicima iz kontrolne skupine, odnosno ispitanicima s normalnim ITM.

Hipoteza ovog rada je da pacijenti s pretilošću imaju statistički značajno snižene koncentracije kobalamina i holotranskobalamina u odnosu na pacijente s normalnim ITM.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. ISPITANICI

Ispitivanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku. U ispitivanje je uključeno 195 ispitanika. Za analizu su se koristili uzorci seruma dobiveni nakon centrifugiranja venske krvi uzorkovane u epruvetu bez antiokagulansa na 3500 rpm tijekom 10 minuta.

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Određivanje koncentracije kobalamina

Koncentracija kobalamina se određuje kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom s mikročesticama (engl. CMLIA, *Chemiluminescent microparticle immunoassay*) na automatskom analizatoru Abbott Alinity i. Analizator određuje koncentraciju kobalamina u dva koraka. U prvom koraku miješaju se uzorak i reagens 1, 2 i 3 za predobradu uzorka. Nakon toga se tako priređeni alikvot miješa s paramagnetskim mikročesticama obloženim unutarnjim faktorom te tekućinom za razrjeđivanje reagensa i inkubira. Mikročestice obložene unutarnjim faktorom vežu se s vitaminom B<sub>12</sub> iz uzorka nakon čega se smjesa ispire. Dodatkom B<sub>12</sub> konjugata obilježenog akridinom nastaje reakcijska smjesa koja se inkubira te potom ispire. Dodatkom predaktivacijske i aktivacijske otopine aktivira se kemiluminiscentna reakcija. Nastali kemiluminiscentni signal mjeri se kao relativne svjetlosne jedinice (RLU, engl. *relative light units*) i obrnuto je proporcionalan koncentraciji vitamina B<sub>12</sub> u uzorku.

##### 3.2.1.1. Reagensi

Reagensi potrebni za izvođenje metode:

- Alinity B<sub>12</sub> reagens kit koji se sastoji od:
- Alinity B<sub>12</sub> kalibratori

- Technopath Multichem IA Plus Level 1-3
- Alinity i Multi-Assay manualni diluent
- Alinity aktivacijska otopina
- Alinity predaktivacijska otopina
- Alinity i koncentrirani pufer za ispiranje

### 3.2.2. Određivanje koncentracije holotranskobalamina

Holotranskobalamin se kvantitativno određuje kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom s mikročesticama (CMIA) na automatskom analizatoru Architect u 2 koraka. U prvom koraku miješaju se uzorak i paramagnetske mikročestice obložene anti-holotranskobalamin antitijelima. U ovom se koraku holotranskobalamin iz uzorka veže na paramagnetske mikročestice prekrivene anti-holotranskobalamin antitijelima. Nakon ispiranja, u reakcijsku se smjesu dodaje anti-transkobalamin konjugat obilježen akridinijem. Nakon još jednog ciklusa pranja, dodatkom predaktivacijske i aktivacijske otopine aktivira se kemiluminiscentna reakcija. Nastali kemiluminiscentni signal mjeri se kao relativne svjetlosne jedinice. Optičkim sustavom detektirane relativne svjetlosne mjerne jedinice direktno su proporcionalne količini holotranskobalamina u uzorku.

#### 3.2.2.1. Reagensi

Reagensi potrebni za izvođenje metode:

- Architect reagens kit koji se sastoji od:
  - Mikročestica obloženih anti-holotranskobalamin antitijelima u HEPES puferu sa surfaktantima
  - Anti-transkobalamin antitijela (monoklonska, mišjeg porijekla) obilježena akridinijem u MES puferu sa surfaktantima
- Architect holotranskobalamin kalibratori
- Architect holotranskobalamin kontrole
- Architect Multi-Assay manualni diluent
- Architect aktivacijska otopina

- Architect predaktivacijska otopina
- Architect pufer za ispiranje

### 3.3. STATISTIČKE METODE

Podaci su prikazani i statistički obrađeni koristeći računalni program Excel za Office 365 MSO, Microsoft Office (Microsoft, USA) i statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.109 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022). Za prikaz podataka korištena je deskriptivna statistika uz odgovarajuće medijane i interkvartilne raspone. Raspodjela podataka i razlika između grupa ispitane su vodeći se preporukama koje se odnose na veličinu uzorka te na njihovu raspodjelu (Šimundić, 2012.). Raspodjela je tako ispitana Shapiro-Wilk testom dok se razlika između grupa ispitivala Mann-Whitney testom. Dob je bez obzira na raspodjelu, prikazana medijanom i rasponom (minimum i maksimum). Svi rezultati ispitivani su na razini statističke značajnosti  $P < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

Analizom su obuhvaćeni uzorci ukupno 195 ispitanika podijeljenih u 2 skupine. Kontrolna skupina obuhvaća 103 uzorka ispitanika s normalnim ITM (18,5-24). Druga skupina obuhvaća 92 uzorka ispitanika s ITM većim od normalnog (>24). Kao uzorak koristio se ljudski serum, odnosno krv uzorkovana u epruvetu bez antikoagulansa i/ili bez gela, s crvenim čepom.

Od ukupnog broja pacijenata s ITM većim od normalnog, 27 je muškog spola, a 66 ženskog spola (*Slika 6*). Dob ispitanika s ITM većim od normalnog bila je između 19 i 73, s medijanom od 44 godine.



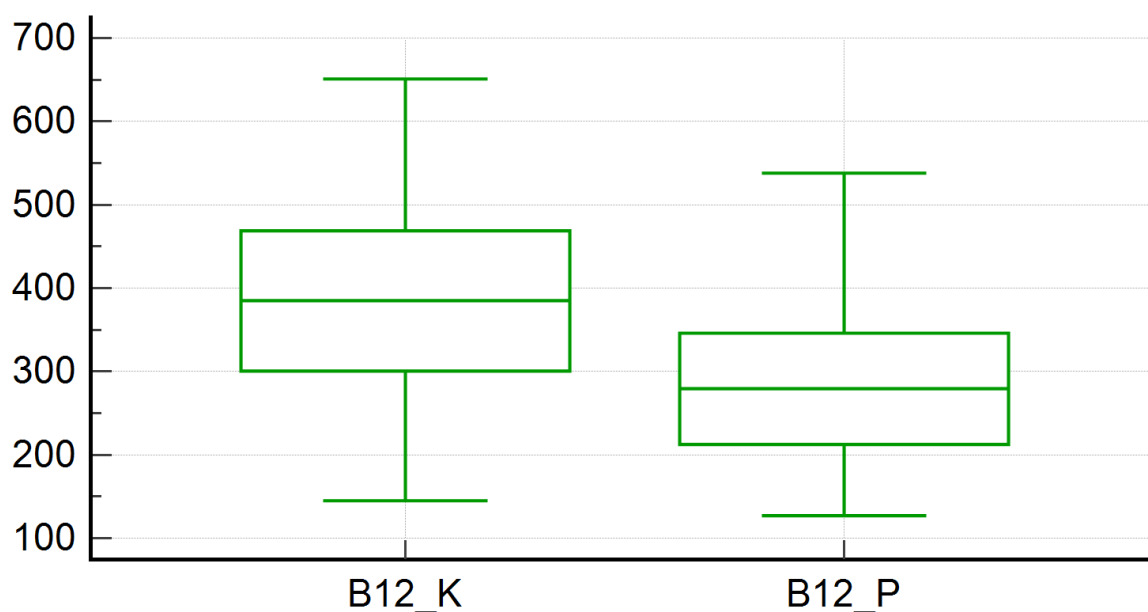
*Slika 6. Raspodjela ispitanika po spolu*

U *Tablica 1*, prikazane su izmjerene koncentracije vitamina B<sub>12</sub> u kontrolnoj skupini ispitanika te kod skupine pretilih ispitanika, uz prikaz najniže i najviše vrijednosti, medijana te interkvartilnog raspona. Raspon koncentracija vitamina B<sub>12</sub> kod obje skupine ispitanika vidljiv je na *Slika 7*. Mann-Whitneyevim testom za nezavisne uzorke utvrđena je statistički značajna razlika u koncentracijama vitamina B<sub>12</sub> između kontrolne skupine ispitanika te skupine ispitanika s pretilošću uz vrijednost  $P < 0,0001$ . U skupini ispitanika s pretilošću, tako su zamijećene statistički značajno niže koncentracije vitamina B<sub>12</sub> u odnosu na ispitanike s normalnim ITM (538 vs. 651 pmol/L,  $P < 0,0001$ ).

Tablica 1. Prikaz koncentracije vitamina B12 u kontrolnoj skupini i u skupini pretilih ispitanika

	<b>B<sub>12</sub>K</b> (pmol/l)	<b>B<sub>12</sub>P</b> (pmol/l)
<b>NAJNIŽA VRIJEDNOST</b>	145	127
<b>NAJVIŠA VRIJEDNOST</b>	651	538
<b>MEDIJAN (INTERKVARTILNI RASPON)</b>	385 (300 – 469)	279 (212 – 346)

B<sub>12\_K</sub> – koncentracija vitamina B<sub>12</sub> kod kontrolne skupine ispitanika, B<sub>12\_P</sub> – koncentracija vitamina B<sub>12</sub> u skupini pretilih ispitanika



Slika 7. Grafički prikaz koncentracije vitamina B12 u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanika s pretilošću. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama.

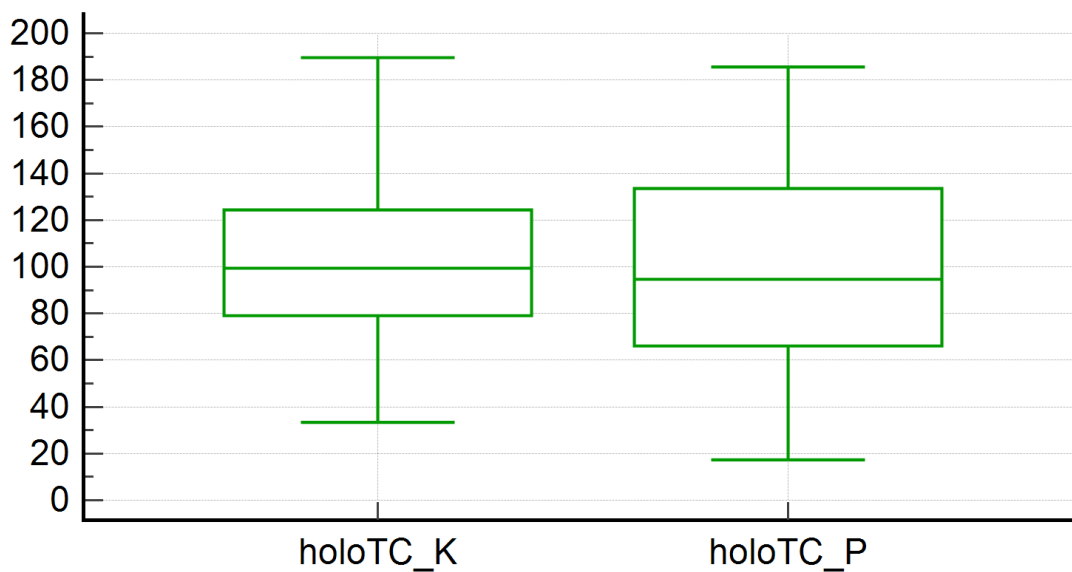
B<sub>12\_K</sub> – koncentracija vitamina B<sub>12</sub> kod kontrolne skupine ispitanika, B<sub>12\_P</sub> – koncentracija vitamina B<sub>12</sub> u skupini pretilih ispitanika



S druge strane, mjerenjem koncentracije holotranskobalamina kod skupine pretilih ispitanika te u kontrolnoj skupini pokazan je drugačiji trend. U *Tablica 2.* prikazane su izmjerene koncentracije holotranskobalamina u kontrolnoj skupini ispitanika te kod skupine ispitanika s pretilošću. Tablicom je prikazana najniža i najviša vrijednost te medijan uz interkvartilni raspon. Razlika u koncentracijama grafički je prikazana na *Slika 8.* Mann-Whitneyevim testom za nezavisne uzorke utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ( $P=0,3253$ ) između koncentracije holotranskobalamina u kontrolnoj skupini i u skupini pretilih ispitanika. Skupina ispitanika s pretilošću nema statistički značajno niže serumske koncentracije holotranskobalamina od ispitanika s normalnim ITM (94,7 vs. 99,4 pmol/L,  $P=0,3253$ ).

*Tablica 2. Prikaz koncentracije holotranskobalamina u kontrolnoj skupini i u skupini pretilih ispitanika*

	<b>holoTC<sub>k</sub></b> <b>(pmol/l)</b>	<b>holoTC<sub>p</sub></b> <b>(pmol/l)</b>
<b>NAJNIŽA VRIJEDNOST</b>	33,4	17,3
<b>NAJVIŠA VRIJEDNOST</b>	189,6	165,6
<b>MEDIJAN (INTERKVARTILNI RASPON)</b>	99,4 (79,1 – 124,4)	94,7 (66,1 – 133,6)



*Slika 8. Grafički prikaz koncentracije holotranskobalamina u kontrolnoj skupini i u skupini pretilih ispitanika. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama.*

*holoTC<sub>K</sub> – koncentracija holotranskobalamina u kontrolnoj skupini, holoTC<sub>P</sub> – koncentracija holotranskobalamina u skupini ispitanika s pretilošću*

## 5. RASPRAVA

U ovome radu prikazani su rezultati mjerenja vrijednosti kobalamina i holotranskobalamina u serumu kod skupine pretilih ispitanika u usporedbi s ispitanicima iz kontrolne skupine, odnosno s ispitanicima s normalnim ITM kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između navedenih skupina. Istraživanje je provedeno na 195 ispitanika od čega su 92 pretila (ITM > 24), a 103 ima normalan ITM (18,5-24). U skupini pretilih ispitanika, 66 je bilo ženskog, a 27 muškog spola. Kako su ispitanici većinom žene, ne možemo zaključivati o spolno uvjetovanim razlikama u koncentracijama kobalamina i holotranskobalamina (*Slika 6*). Dob ispitanika je između 19 i 73 godine s medijanom od 44 godine.

Mjerenjem koncentracije kobalamina u serumu u obje skupine, zamijećene su statistički značajno niže vrijednosti u skupini pretilih ispitanika s medijanom od 279 pmol/L u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika kod koje medijan izmjerenih koncentracija iznosi 385 pmol/L. Iako je prisutna statistički značajna razlika između izmjerenih vrijednosti, u skupini pretilih ispitanika, medijan izmjerenih koncentracija nije ispod preporučene cut-off vrijednosti (de Benoist, 2008) koja iznosi 150 pmol/L. Kod 3 ispitanika izmjerene su koncentracije vitamina B<sub>12</sub> ispod preporučene cut-off vrijednosti.

U nekoliko se istraživanja mjerila koncentracija kobalamina, kako samo kod pretilih ispitanika tako i u usporedbi s ispitanicima normalne tjelesne mase. Baltaci D i sur. (2013) tako su u svome istraživanju na uzorku od 976 pacijenata od kojih je 414 bilo pretilo, 212 s prekomjernom tjelesnom težinom te 351 s normalnom tjelesnom masom, utvrdili da su razine vitamina B<sub>12</sub> bile statistički značajno snižene kod pacijenata s pretilošću i prekomjernom tjelesnom težinom u odnosu na pacijente s normalnom tjelesnom masom. Medijani su iznosili 132 pmol/L ( $\pm 19$  pmol/L) za skupinu pretilih ispitanika, 162 pmol/L ( $\pm 58$  pmol/L) za skupinu ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom te 242 ( $\pm 89$  pmol/L) u skupini ispitanika s normalnom tjelesnom masom. Sun i sur. (2019) su u svojoj studiji koja je uključivala čak 9075 ispitanika starijih od 20 godina također uočili niže vrijednosti vitamina B<sub>12</sub> kod pretilih ispitanika u usporedbi s ispitanicima s normalnim ITM. U ovom je istraživanju zaključeno da su ispitanici s višim serumskim koncentracijama vitamina B<sub>12</sub> manje vjerojatno pretili, odnosno pronađena je značajna i inverzna povezanost serumskih koncentracija vitamina B<sub>12</sub> i pretilosti. Goyal R i sur. (2013) također su u retrospektivnoj studiji koja je obuhvatila 65 morbidno pretilih pacijenata (ITM > 35) utvrdili medijan koncentracije kobalamina od 147 pmol/L ( $\pm 45$  pmol/L),

pri čemu je kod ukupno 42 ispitanika izmjerena koncentracija kobalamina ispod cut-off vrijednosti koja je u ovom istraživanju iznosila 156 pmol/L. Iako u ovome radu izmjerene vrijednosti kobalamina nisu uspoređivane s kontrolnom skupinom, ipak su izmjerene koncentracije vitamina B<sub>12</sub> ispod donje granice referentnog intervala koji je u ovom istraživanju bio nešto viši od preporučenog (150 pmol/L).

Utvrđivanjem koncentracije holotranskobalamina u serumu ispitanika obje skupine, nije zamijećena statistički značajna razlika između vrijednosti holotranskobalamina u skupini pretilih ispitanika u kojoj medijan vrijednosti iznosi 94,7 pmol/L dok kod kontrolne skupine ispitanika medijan izmjerenih koncentracija iznosi 99,4 pmol/L. Donja granica referentnog intervala za holoTC nije točno definirana te varira između 19 i 42 pmol/L, no medijan izmjerenih vrijednosti u nijednoj od skupina nije manji od cut-off vrijednosti.

Samavat i sur. (2019) u svojem su radu usporedbom vrijednosti kobalamina i holotranskobalamina kod 47 morbidno pretilih ispitanika i 21 ispitanika s normalnom tjelesnom masom pokazali da su serumske vrijednosti i holoTC i kobalamina niže kod pretilih ispitanika. Medijan izmjerenih vrijednosti kobalamina kod pretilih iznosio je 233,5 pmol/L a kod ispitanika s normalnom tjelesnom masom 328 pmol/L. Medijan izmjerenih vrijednosti holoTC iznosio je 64,5 pmol/L kod pretilih, a u kontrolnoj skupini 95,1 pmol/L. Ni u ovome radu nije zamijećena statistički značajna razlika vrijednosti holoTC između skupina. Vigna i sur. (2011) također su u svom radu kod 118 pretilih ispitanika (ITM > 26,5) određivali vrijednosti vitamina B<sub>12</sub> i holoTC u serumu. Kod jedne trećine ispitanika pronađene su koncentracije holoTC ispod cut-off vrijednosti koja je u ovom radu iznosila 40 pmol/L. Kod 10% ispitanika pronađene su vrijednosti vitamina B<sub>12</sub> ispod cut-off vrijednosti koja je u ovome istraživanju iznosila 164 pmol/L. U ovome je istraživanju medijan za vitamin B<sub>12</sub> iznosio 280 pmol/L, a za holoTC 50.6 pmol/L.

Usporedbom rezultata dobivenih u ovome istraživanju vidljivo je kako su oni komplementarni rezultatima ostalih sličnih istraživanja.

Ograničenje ovog rada, kao i ostalih sličnih istraživanja predstavlja nedostatak točno definiranih referentnih intervala, odnosno cut-off vrijednosti te definiranih mjernih jedinica, posebice prilikom uspoređivanja rezultata različitih studija. Također, zbog širokog raspona godina ispitanika te većeg udjela ženskih ispitanika, ne može se zaključivati o dobno i spolno uvjetovanim razlikama u izmjerenim koncentracijama vitamina B<sub>12</sub> i holotranskobalamina.

Kako se za utvrđivanje deficita vitamina B<sub>12</sub> može koristiti i mjerenje vrijednosti MMA te Hcy, jedno od ograničenja ovog istraživanja jest to što se kod ispitanika nije određivala i njihova vrijednost. Povišene vrijednosti MMA i Hcy mogu se pronaći kod pacijenata s vrijednostima kobalamina unutar referentnih intervala što može ukazivati na deficienciju kobalamina.

## 6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li statistički značajna razlika u vrijednostima kobalamina i holotranskobalamina između skupine pretilih ispitanika te ispitanika s normalnom tjelesnom masom. Analizom uzoraka i rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Koncentracija vitamina B<sub>12</sub> statistički je značajno niža kod osoba s pretilošću u usporedbi s osobama s normalnim ITM ( $P < 0,001$ )
- Koncentracija holotranskobalamina nije statistički značajno niža kod osoba s pretilošću u usporedbi s osobama s normalnim ITM ( $P=0,3253$ )
- Medijan koncentracija kobalamina i holotranskobalamina u obje skupine ispitanika unutar je referentnih vrijednosti

## 7. POPIS KRATICA

SZO – Svjetska Zdravstvena Organizacija

ITM – indeks tjelesne mase

BMR – bazni metabolički indeks

MC4R – melanokortin-4-receptor

FTO – engl. *fat mass and obesity associated gene*

NES – engl. *night eating syndrome*

BED – engl. *binge eating syndrome*

MMA – metilmalonska kiselina

Hcy – homocistein

HC – haptokorin

IF – unutrašnji faktor

TC – transkobalamin

holoTC – holotranskobalamin

5-MTHF – 5-metiltetrahidrofolat

MCV – engl. *mean corpuscular volume*

RDA – preporučeni dnevni unos

RIA – engl. *radioimmunoassay*

CMIA – kemiluminiscentna imunokemijska metoda s mikročesticama

RLU – relativne svjetlosne jedinice

## 8. LITERATURA

- 1) Babić Božović I, Vraneković J. Folati i folna kiselina: dosadašnje spoznaje. *Med Flum*, 2017, 50 (2), 169-175.
- 2) Baltaci D, Kutlucan A, Turker Y, Yilmaz A, Karacam S, Deler H, Ucgun T, Kara IH. Association of vitamin B<sub>12</sub> with obesity, overweight, insulin resistance and metabolic syndrome, and body fat composition; primary care-based study. *Med Glas (Zenica)*, 2013, 10 (2), 203 – 210
- 3) Brady J, Wilson L, McGregor L, Valente E, Orning L. Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem*. 2008, 54(3), 567-73
- 4) Carmel R i Sarrai M. Diagnosis and Management of Clinical and Subclinical Cobalamin Deficiency: Advances and Controversies. *Curr Hematol Rep*. 2006, 5, 23-33.
- 5) Clinical Laboratory Diagnostics 2020, <https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/k13.html>, pristupljeno 5.4.2022.
- 6) de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull*. 2008, 29, 238-244.
- 7) Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol*. 2014, 166(4), 496-513.
- 8) Eussen SJ, de Groot LC, Clarke R, Schneede J, Ueland PM, Hoefnagels WH, van Staveren WA. Oral Cyanocobalamin Supplementation in Older People With Vitamin B12 Deficiency: a Dose-finding Trial. *Arch Intern Med*. 2005, 165 (10), 1167-1172.
- 9) Eussen SJ, Ueland PM, Clarke R, Blom HJ, Hoefnagels WH, Van Staveren WA, De Groot LC. The association of betaine, homocysteine and related metabolites with cognitive function in Dutch elderly people. *Br J Nutr*. 2007, 98(5), 960-968.
- 10) Goyal R, Dhanuka S, Mehta V, Khasgiwale M, Shivhare R. To Study the Vitamin B12 Status in Morbidly Obese Patients. *IJFANS*. 2013, 2 (2), 73
- 11) Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Stabler S, Toh B, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3 (1), 1-20
- 12) Guyton AC, Hall JE. Ravnoteža u prehrani; regulacija unosa hrane; pretilost i gladovanje; vitamini i minerali. U: Medicinska fiziologija. Andreis I, Kukulja Taradi S, Taradi M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 894-896.
- 13) Hvas AM, Neco E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency – an update. *Haematologica*. 2006, 91 (11), 1506-1512.
- 14) Marshall WJ, Ayling RM. Nutrition: Laboratory and Clinical Aspects. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Rifai N, Horvath A, Wittwer C, St. Louis, Missouri, *Elsevier sci* 2018, str.1159.e16 – 1159.e17, 1159.e35-.e40.



- 15) Obesity and overweight, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> , pristupljeno 29.3.2022.
- 16) Rasmussen K, Vyberg B, Pedersen KO, Brochner-Mortensen J. Methylmalonic acid in renal insufficiency: evidence of accumulation and implications for diagnosis of cobalamin deficiency. *Clin Chem.* 1990, 36, 1523-1524.
- 17) Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexø E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clin Chem.* 2006, 52(1), 129-137.
- 18) Roberts NB, Taylor A, Sodi R. Vitamins and Trace Elements, U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Rifai N., Horvath A, Wittwer C, St. Louis, Missouri, *Elsevier sci* 2018, str. 669 – 674.
- 19) Samavat J, Cantini G, Lorubbio M, Degl'Innocenti S, Adaikalakoteswari A, Facchiano E, Lucchese M, Maggi M, Saracanan P, Ognibene A, Luconi M. Seminal but not Serum Levels of Holotranscobalamin are Altered in Morbid Obesity and Correlate with Semen Quality: A Pilot Single Centre Study. *Nutrients.* 2019, 11 (7), 1540
- 20) Scolamiero E, Villani GR, Ingenito L, Pecce R, Albano L, Caterino M, di Girolamo MG, Di Stefano C, Franzese I, Gallo G, Ruoppolo M. Maternal vitamin B12 deficiency detected in expanded newborn screening. *Clinic biochem.* 2014, 47(18), 312-317.
- 21) Snow CF. Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency: a Guide for the Primary Care Physician. *Arch Intern Med.* 1999, 159, str. 1289-1298.
- 22) Sobczyńska-Malefora A, Gorska R, Pelisser M, Ruwona P, Witchlow B, Harrington DJ. An audit of holotranscobalamin (“Active” B12) and methylmalonic acid assays for the assessment of vitamin B12 status: application in a mixed patient population. *Clin Biochem.* 2014, 47(1-2), str. 82-86.
- 23) Soldo I, Kolak T, Adžić L. Pretilost. U: Pretilost i liječenje, Soldo I, Kolak T i sur., Zagreb, Medicinska naklada 2020a, str. 7-21.
- 24) Soldo I, Žarković N, Jaganjac M i sur. Patofiziologija pretilosti, U: Pretilost i liječenje, Soldo I, Kolak T i sur., Zagreb, Medicinska naklada 2020b, str. 47-81.
- 25) Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood.* 1990, 76, 871-881.
- 26) Stabler SP, Vitamin B12. U: Present knowledge in nutrition, Erdman JW, MacDonald IA, Ziesel SH i sur., New York, Wiley-Blackwell, 2012, str. 343-358.
- 27) Sun Y, Sun M, Liu B, Du Y, Rong S, Xu G, Snetselaar LG, Bao W. Inverse Association Between Serum Vitamin B12 Concentration and Obesity Among Adults in the United States. *Front Endocrinol.* 2019, 10, 414
- 28) Šimundić AM. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in Biochemia Medica journal. *Biochem Med.* 2012, 22, 15–23.

- 29) Štraus B, Petlevski R. Vitamini. U: Štrausova medicinska biokemija, Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada 2009, str. 380-381.
- 30) Vigna L, Novembrino C, De Giuseppe R, De Liso F, Sommaruga D, Agnelli G, Belluigi V, Riboldi L, Bamonti F. Nutritional and oxidative status in occupational obese subjects. *Mediterr J Nutr Metab.* 2011, 4 (1), 69-74.
- 31) White CR, Kearney MR. Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *J Comp Physiol B*, 2013, 183(1), 1–26.
- 32) Zappacosta B, Persichilli S, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Graziano M, Gervasoni J, Leoncini E, Cimino G, Mastroiacovo P. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in an Italian blood donor population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013, 23(5), 473-80.

## 9. SAŽETAK

### 9.1. SAŽETAK

Pretilost se smatra jednom od najčešćih bolesti modernog društva s kompleksnom etiologijom koja se razvija zbog neuravnoteženog unosa i potrošnje energije pri čemu je dominacija na strani unosa. Pretilost uzrokuje brojne komplikacije vezane uz razne organske sustave. Vitamin B12 ključan je u eritropoezi, procesu metilacije te je kofaktor raznih enzima. 80-94% ukupnog kobalamina vezano je za haptokorin i taj dio čini neaktivnu frakciju, dok je ostatak vezan za aktivni oblik, holotranskobalamin. Deficit vitamina B12 može dovesti do hematoloških abnormalnosti te demijelinizacije središnjeg živčanog sustava, zbog čega ga je važno na vrijeme uočiti. Koncentracija kobalamina unutar referentnog intervala ne mora značiti adekvatan status vitamina B12 zbog čega on ne predstavlja dobar marker deficita vitamina B12. Holotranskobalamin kao aktivni oblik vitamina B12 predstavlja bolji izbor kao marker deficijencije.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoji li statistički značajna razlika u koncentracijama kobalamina i holotranskobalamina kod pretilih ispitanika ( $ITM > 25 \text{ kg/m}^2$ ) u usporedbi s ispitanicima normalne tjelesne mase.

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, na 195 ispitanika od čega je 103 normalne tjelesne mase, a 92 pretilo. Koncentracije analita određene su kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom s mikročesticama (CMIA) na analizatoru Abbott Alinity i za kobalamin, a za holotranskobalamin na analizatoru Architect. Utvrđivanje statistički značajnih razlika ispitano je Mann-Whitney testom.

Rezultati su pokazali statistički značajno nižu koncentraciju kobalamina kod pretilih ispitanika u usporedbi s ispitanicima normalne tjelesne mase. Medijan izmjerenih koncentracija nije ispod preporučene cut-off vrijednosti ( $150 \text{ pmol/L}$ ). Iako je kod pretilih ispitanika izmjerena niža koncentracija holotranskobalamina, nije pronađena statistički značajna razlika između skupina.

## 9.2. SUMMARY

Obesity is considered to be one of the most prevalent diseases in modern-day society. It is an illness with complex etiology that occurs due to an imbalanced input and usage of energy where the input of energy is larger than the usage. Obesity is the cause of many complications related to different organ systems. Vitamin B12 is a key vitamin in erythropoiesis, and methylation, and it is a cofactor of different enzymes. 80-94% of total cobalamin is an inactive fraction bonded to haptocorrin while the rest is bonded in holotranscobalamin. Vitamin B12 deficiency can lead to hematological abnormalities and demyelination of the central nervous system which is why early detection is important. Cobalamin concentration within the reference range does not equate to an adequate status of vitamin B12 which is why this assay is not the best marker of vitamin B12 deficiency. As an active form of cobalamin, the holotranscobalamin assay represents a better choice in detecting deficiency.

The goal of this research was to determine whether there is a statistically significant difference in cobalamin and holotranscobalamin concentrations between a group of obese subjects (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>) and a group of subjects with a normal body mass index.

The research was conducted at the Department of Laboratory Diagnostics at the University Hospital Centre in Zagreb on 195 subjects, of which 103 had normal body mass index, and 92 were obese. Analytes concentrations were measured using the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) on the Abbott Alinity analyzer for cobalamin, and on the Architect analyzer for holotranscobalamin. The Mann-Whitney test was used to determine whether there was a statistically significant difference in the concentrations.

The results show statistically significant lower cobalamin concentration in obese subjects compared to subjects with a normal body mass index. The median of measured cobalamin concentrations was not below the recommended cut-off value (150 pmol/L). Even though holotranscobalamin concentration measured in obese subjects was lower, there was not a statistically significant difference between the two groups of subjects.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## VRIJEDNOSTI KOBALAMINA I HOLOTRANSKOBALAMINA KOD PRETILIH

Elena Oreški

### SAŽETAK

Pretilost se smatra jednom od najčešćih bolesti modernog društva s kompleksnom etiologijom koja se razvija zbog neuravnoteženog unosa i potrošnje energije pri čemu je dominacija na strani unosa. Pretilost uzrokuje brojne komplikacije vezane uz razne organske sustave. Vitamin B12 ključan je u eritropoezi, procesu metilacije te je kofaktor raznih enzima. 80-94% ukupnog kobalamina vezano je za haptokorin i taj dio čini neaktivnu frakciju, dok je ostatak vezan za aktivni oblik, holotranskobalamin. Deficit vitamina B12 može dovesti do hematoloških abnormalnosti te demijelinizacije središnjeg živčanog sustava, zbog čega ga je važno na vrijeme uočiti. Koncentracija kobalamina unutar referentnog intervala ne mora značiti adekvatan status vitamina B12 zbog čega on ne predstavlja dobar marker deficita vitamina B12. Holotranskobalamin kao aktivni oblik vitamina B12 predstavlja bolji izbor kao marker deficijencije. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoji li statistički značajna razlika u koncentracijama kobalamina i holotranskobalamina kod pretilih ispitanika (ITM > 25 kg/m<sup>2</sup>) u usporedbi s ispitanicima normalne tjelesne mase. Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, na 195 ispitanika od čega je 103 normalne tjelesne mase, a 92 pretilo. Koncentracije analita određene su kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom s mikročesticama (CMIA) na analizatoru Abbott Alinity i za kobalamin, a za holotranskobalamin na analizatoru Architect. Utvrđivanje statistički značajnih razlika ispitano je Mann-Whitney testom. Rezultati su pokazali statistički značajno nižu koncentraciju kobalamina kod pretilih ispitanika u usporedbi s ispitanicima normalne tjelesne mase. Medijan izmjerenih koncentracija nije ispod preporučene cut-off vrijednosti (150 pmol/L). Iako je kod pretilih ispitanika izmjerena niža koncentracija holotranskobalamina, nije pronađena statistički značajna razlika između skupina.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Kobalamin, holotranskobalamin, pretilost

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Saša Kralik Oguić**, spec.med.biochem., Klinički bolnički centar Zagreb  
**Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Saša Kralik Oguić**, spec.med.biochem., Klinički bolnički centar Zagreb

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Cobalamin and holotranscobalamin measurements in the obese

Elena Oreški

#### SUMMARY

Obesity is considered to be one of the most prevalent diseases in modern-day society. It is an illness with complex etiology that occurs due to an imbalanced input and usage of energy where the input of energy is larger than the usage. Obesity is the cause of many complications related to different organ systems. Vitamin B12 is a key vitamin in erythropoiesis, and methylation, and it is a cofactor of different enzymes. 80-94% of total cobalamin is an inactive fraction bonded to haptocorrin while the rest is bonded in holotranscobalamin. Vitamin B12 deficiency can lead to hematological abnormalities and demyelination of the central nervous system which is why early detection is important. Cobalamin concentration within the reference range does not equate to an adequate status of vitamin B12 which is why this assay is not the best marker of vitamin B12 deficiency. As an active form of cobalamin, the holotranscobalamin assay represents a better choice in detecting deficiency. The goal of this research was to determine whether there is a statistically significant difference in cobalamin and holotranscobalamin concentrations between a group of obese subjects (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>) and a group of subjects with a normal body mass index. The research was conducted at the Department of Laboratory Diagnostics at the University Hospital Centre in Zagreb on 195 subjects, of which 103 had normal body mass index, and 92 were obese. Analytes concentrations were measured using the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) on the Abbott Alinity analyzer for cobalamin, and on the Architect analyzer for holotranscobalamin. The Mann-Whitney test was used to determine whether there was a statistically significant difference in the concentrations. The results show statistically significant lower cobalamin concentration in obese subjects compared to subjects with a normal body mass index. The median of measured cobalamin concentrations was not below the recommended cut-off value (150 pmol/L). Even though holotranscobalamin concentration measured in obese subjects was lower, there was not a statistically significant difference between the two groups of subjects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 8 figures, 2 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cobalamin, holotranscobalamin, obesity

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Saša Kralik Oguić, Ph.D.** *European Specialist in Laboratory Medicine*, University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Saša Kralik Oguić, Ph.D.** *European Specialist in Laboratory Medicine*, University Hospital Centre Zagreb  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.