

## Úloha holotranskobalamínu v diferenciálnej diagnostike nedostatku B<sub>12</sub>

Eva Joppová

Hematológia a transfúziológia, Medirex, a. s., Košice

Vitamín B<sub>12</sub>, kobalamín, je esenciálny pre bunkový metabolizmus, syntézu DNA a myelinizáciu nervových vlákien. Najčastejšie neurologické prejavy deficitu kobalamínu sú nešpecifické a môžu byť ireverzibilné. Štandardným skríningovým testom pre hodnotenie nedostatku kobalamínu je stanovenie celkovej sérovej koncentrácie vitamínu B<sub>12</sub>. Vyšetrenie holotranskobalamínu – aktívnej frakcie B<sub>12</sub> je senzitívnejším a špecifickejšým ukazovateľom jeho včasného deficitu. Hlavnou klinickou výhodou testu je potvrdenie alebo vylúčenie diagnózy deficitu vitamínu B<sub>12</sub> u pacientov s celkovými hodnotami B<sub>12</sub> v sivej zóne, so selektívnymi fluktuáciami haptokorínu alebo pri poruchách metabolizmu kobalamínu na intracelulárnej úrovni.

**Kľúčové slová:** vitamín B<sub>12</sub>, kobalamín, holotranskobalamín, haptokorín

### *Role of holotranscobalamin in differential diagnostics of the deficiency of vitamin B<sub>12</sub>*

Vitamin B<sub>12</sub>, cobalamin is essential for the cell metabolism, DNA synthesis and myelination of nerve fibres. The most frequent neurological manifestations of cobalamin deficiency are non-specific and may be irreversible. A standard test for the screening of cobalamin deficiency is the assay of total serum vitamin B<sub>12</sub> concentration. Measurement of holotranscobalamin – the active form of vitamin B<sub>12</sub> has better sensitivity and specificity in the detection of its deficiency at early stages. Its key advantage for clinical practice is the ability of the test to confirm or rule out the diagnosis of vitamin B<sub>12</sub> deficiency in patients who present with borderline levels of total B<sub>12</sub>, with selective haptocorrin fluctuations or with cobalamin metabolism disorders at the intracellular level.

**Keywords:** vitamin B<sub>12</sub>, cobalamin, holotranscobalamin, haptocorrin

**NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 85 – 89**

### Úvod

Kobalamín je nevyhnutný pre transformáciu metyltetrahydrofolátu na tetrahydrofolát, a tým pre správnu syntézu deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), tvorbu erytrocytov a správnu funkciu nervového systému (predovšetkým tvorbu myelínových obalov). Nedostatok môže viesť k širokému spektru hematologických, neurologických či neuropsychiatrických zmien, ktoré sú včasnou diagnostikou a liečbou reverzibilné. Kobalamín (cobalamin, Cbl) alebo vitamín B<sub>12</sub> je jeden z vitamínov rozpustných vo vode, obsiahnutý hlavne v živočíšnych produktoch. Denný príjem tvorí približne 3 – 30 µg a potrebné denné množstvo 2 – 4 µg. Zvýšená spotreba je v období rastu, tehotenstva, dojčenia a pri hojení rán<sup>(1)</sup>. Kobalamín je syntetizovaný iba mikroorganizmami, rastliny a vyššie živočíchy túto schopnosť nemajú. Najväčším zdrojom Cbl sú baktérie v hrubom čreve živočíchov vrátane človeka, kde sa však Cbl už nevstrebáva, aj keď denná produkcia by stačila na liečbu klinicky deficientných pacientov, ako to vo svojej štúdii potvrdila Callenderová. Deficit Cbl u vegánov s klinickými prejavmi nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> nahradila vodným extraktom ich vlastnej stolice. Najviac Cbl obsahujú živočíšne proteíny. Mäso z parenchýmových orgánov je najbohatším zdrojom, ďalej ryby, mlieko, mliečne produkty a vaječný žĺtok. Cbl v potrave je odolný proti vareniu pri vysokej teplote, ale ľahko konvertuje do inaktívnych analógov pôsobením kyseliny askorbovej. Cbl je výnimočne dobre uskladňovaný v koenzýmovej forme v tkanivách. Celkové množstvo v tele je približne 2 – 5 mg u dospelých, z čoho asi 1 mg je v pečeni<sup>(1,2)</sup>.

Perorálne prijatý kobalamín sa vstrebáva z prijatej potravy veľmi zložitým a ľahko narušiteľným mechanizmom, čo môže byť zdrojom mnohých porúch vstrebávania. Kobalamín je v živočíšnych bielkovinách viazaný peptidickou väzbou, z ktorej je uvoľňovaný v kyslom prostredí žalúdka kyselinou chlorovodíkovou a proteolytickými enzýmami. Kyslé prostredie je nevyhnutné pre tvorbu vnútorného faktora (intrinsic factor, IF), bez ktorého dochádza k neefektívnej proteolyze, odkiaľ pochádza deficit vitamínu B<sub>12</sub> pri hypochlórhdyrii a pravidelnom užívaní inhibítorov protónovej pumpy.

Po uvoľnení Cbl z peptidickej väzby sú pre správnu reabsorpciu Cbl potrebné väzbové proteíny:

a) haptokoríny (HC, kódované TCN1 génom), ktoré majú vysokú afinitu ku Cbl pri nízkom pH v žalúdku, okrem žalúdočnej šťavy sú tiež v slinách a ďalších telesných tekutinách a ich funkcia okrem väzby Cbl je ochranná – pred denaturáciou Cbl v žalúdku;

b) vnútorný faktor – Cbl viažuci glykoproteín (kódovaný génom GIF), produkovaný parietálnymi bunkami fundu žalúdka, ktorý má vysokú afinitu k Cbl pri vyššom pH, v alkalickom prostredí v tenkom čreve a duodéne. IF viaže len aktívnu formu kobalamínu – metylkobalamín, adenosylkobalamín, kyanokobalamín, akvakobalamín<sup>(3,4,5)</sup>.

Haptokoríny majú silnú väzbovú afinitu ku kobalamínu pri nízkom pH v žalúdku, a preto žalúdok opúšťa hlavne kobalamín naviazaný na HC (HC-Cbl), odtiaľ postupuje do duodéna a horných častí jejunu. Tu vplyvom alkalického pH a pankreatických proteáz dochádza k parciálnemu uvoľneniu Cbl z HC

a môže sa tak vo zvýšenej miere viazať na IF (možná príčina deficitu B<sub>12</sub> pri pankreatickej a črevnej insuficiencii). V zásaditom prostredí duodéna teda vzniká prevažne komplex Cbl-IF<sup>(4)</sup>. Kobalamín môže byť absorbovaný aktívnym transportom alebo pasívnou difúziou. Aktívnym transportom je absorbovaná väčšina Cbl. Komplex Cbl-IF je vychytávaný špecifickými kubilínovými receptormi na povrchu buniek tenkého čreva za prítomnosti Ca<sup>2+</sup> a neutrálneho pH. Kubilínový receptor (kódovaný CUBN génom) viaže iba komplex Cbl-IF; voľný Cbl, ani IF nie sú schopné väzby na tento receptor. Kubilín tvoria α-podjednotky a hydrofóbne β-podjednotky a na to, aby Cbl prešiel do bunky, musí vytvoriť funkčný komplex s amnionless proteínom, ktorý umožní prechod ligandu do bunky. Pre správnu funkciu a prenos ligandu do bunky je potrebný aj ďalší receptor – megalínový. Kubilín a megalín sú prítomné v tenkom čreve, v obličkách a v žltkovom vaku okolo vyvíjajúceho sa embrya. Kubilín bez megalínu nie je schopný reabsorbovať proteíny, i keď megalín má túto schopnosť<sup>(4,6,7)</sup>. Pasívnou difúziou prechádza len okolo 1 – 3 % prijatého Cbl a uplatňuje sa hlavne pri vyšších dávkach Cbl (nad desiatky až stovky mikrogramov). Týmto spôsobom absorbovaný vitamín sa objavuje v krvi za niekoľko minút a je to mechanizmus využívaný hlavne u pacientov s pernicióznou anémiou<sup>(4,5)</sup>.

Transport kobalamínu v plazme riadia R proteíny (transkobalamíny), v literatúre tiež označované R binders, „R viazače“, aby sa odlíšili od R proteínov, ktoré viažu kobalamín v žalúdku<sup>(3)</sup>. Pred naviazaním kobalamínu na transkobalamín dochádza k jeho premene na metylové a adenosylové formy. Metylová forma tvorí 60 – 80 % celkového kobalamínu v plazme a adenosylová forma do 20 %. V malom množstve sú zastúpené aj iné formy kobalamínu, kyanokobalamín a hydroxykobalamín<sup>(8)</sup>. Hlavným transportným proteínom aktívnej formy Cbl v plazme je transkobalamín II. Transkobalamín II je tvorený rôznymi tkanivami, hlavne endotelovými bunkami, má biologický polčas 90 minút a viaže len funkčné analógy kobalamínu. Komplex Cbl-IF prechádza endocytózou do cytoplazmy enterocyty, kde je vplyvom lyzozómov vnútorný faktor degradovaný a Cbl sa viaže na transkobalamín, čím vzniká aktívna forma vitamínu B<sub>12</sub> – holotranskobalamín (holoTC). HoloTC opúšťa enterocyt cez bazolaterálnu membránu a vstupuje do portálnej krvi. Absorpcia aktívnym transportom prebieha v terminálnej časti ilea a trvá okolo 3-4 hodín. HoloTC tvorí len 10 – 30 % celkového vitamínu B<sub>12</sub>, je to však aktívna, biologicky dostupná forma vitamínu B<sub>12</sub>. HoloTC má biologický polčas 5-6 minút<sup>(5,8)</sup>. Druhým transportným proteínom je haptokorín (HC), transkobalamín I. HC je α-glykoproteín tvorený v špecifických granulách granulocytov. Vo veľkom množstve je prítomný v slinách, materskom mlieku a slzách. Biologický polčas má 9-10 dní. HC naviazaním Cbl tvorí holohaptokorín (holoHC), ktorý tvorí 70 – 90 % cirkulujúceho Cbl, odtiaľ vysoké hodnoty vyšetřovaného B<sub>12</sub> v sére. HC viaže všetky formy Cbl, aj nefunkčné, avšak komplex holoHC nedokáže prestupovať do buniek, pretože na bunke nie sú špecifické receptory, ktoré by rozpoznali tento komplex. HoloHC môže vstupovať do buniek vďaka nešpecifickým receptorom (asiaglykoproteínom) v pečeni po desialyzácii molekuly haptokorínu<sup>(3,9)</sup>. Holohaptokorín predstavuje tzv. zásobnú formu, ktorej funkcia nie je presne známa, avšak Cbl v tejto forme je viazaný veľmi pevne, uvoľňuje sa pomaly a môže trvať aj

niekoľko rokov, kým absorpcia v čreve ustane a začne sa manifestný deficit aktívnej formy kobalamínu. Môže trvať 3 – 6 rokov, kým sa množstvo holoHC (celkového B<sub>12</sub>) zníži pod 200 pmol/l. Len holoTC, ktorý je rýchlo vychytávaný bunkami, predstavuje aktuálne hladiny aktívnej formy B<sub>12</sub> s poklesom hneď po zhoršení intestinálnej absorpcie. Hodnoty vitamínu B<sub>12</sub> v sére 150 – 300 pmol/l považujeme za sivú zónu, keď je diagnosticky výhodnejšie stanovenie aktívnej formy vitamínu B<sub>12</sub> – holoTC<sup>(4,5,8)</sup>. Receptory pre holotranskobalamín sú prítomné na všetkých bunkách, aj keď prednostne je holoTC vychytávaný hlavne v pečeni, kostnej dreni a ďalších tkanivách. Tým sa kobalamín stáva dostupným pre všetky bunky v tele, ktoré syntetizujú DNA alebo ribonukleovú kyselinu (RNA). HoloTC prechádza do buniek endocytózou. Metabolický obrat komplexu s aktívnym Cbl dosahuje maximálne 6 nmol/deň, holohaptokorínu 0,1 nmol/deň. Receptor pre holotranskobalamín v obličkách využíva na absorpciu vitamínu megalín, v iných tkanivách nie je megalín súčasťou receptora pre holoTC. V obličkách je holoTC reabsorbovaný z glomerulového filtrátu a nepatrné množstvo je cez bazálnu membránu tubulárnych buniek vylúčené do moču<sup>(8,10)</sup>. Úloha transkobalamínu III zatiaľ nie je úplne známa, pravdepodobne plní transportnú funkciu pre Cbl z periférnych tkanív späť do pečene. Podobne ako transkobalamín I viaže všetky formy vitamínu aj nefunkčné analógy<sup>(8)</sup>.

Približne 60 – 70 % kobalamínu prijatého z potravy je vylučované z organizmu žlčou a močom, v podobe voľného vitamínu, aktívne formy si telo necháva. U pacientov s narušenou absorpciou vitamínu sú tieto straty až 100 %, v závislosti od množstva funkčného IF. V pečeni je Cbl naviazaný na HC, prechádza do žlče, následne do čreva a tu je spracovaný ako Cbl prijatý z potravy. Veľká časť Cbl je vylučovaná žlčou, 0,5 – 5 µg Cbl za deň je zo žlče vylučované do čreva, no okolo troch štvrtín sa späť reabsorbuje prostredníctvom enterohepatálneho cyklu, čo prispieva k udržiavaniu vysokých telesných zásob vitamínu. Zvyšná štvrtina je vylúčená stolícou. Glomerulovou filtráciou vylúčené množstvo Cbl nie je až také výrazné (< 0,25 µg/deň), predsa je niekedy považovaná za hlavnú cestu exkrécie vitamínu. V obličkách sú receptory pre komplex holoTC, ktoré bránia nadmernému úniku vitamínu močom. Stopové množstvo Cbl je vylučované kožou<sup>(6,8,11)</sup>.

Holotranskobalamín – aktívna forma vitamínu B<sub>12</sub> prechádza do buniek periférnych tkanív endocytózou sprostredkovanou receptormi. Kobalamín v metabolických procesoch ľudského organizmu plní funkciu koenzýmov v týchto formách: metylkobalamín a adenosylkobalamín. Cbl je koenzýmom pre tieto enzýmy: metionínsyntázu a L-metylmalonyl-koenzým A (CoA) mutázu. Metylkobalamín je kofaktorom pre metionínsyntázu (alebo tiež homocysteínmetyltransferázu), katalyzuje premenu homocysteínu (Hcy) na metionín prostredníctvom cyklov metylácie a demetylácie Cbl. Pre správny priebeh metylácie je nevyhnutná spolupráca vitamínu B<sub>12</sub> a kyseliny listovej. Deficit jedného vitamínu tak môže maskovať deficit druhého<sup>(8)</sup>. Vzniknutý metionín je esenciálnou aminokyselinou pre metyláciu proteínov, DNA a RNA; ďalej je donorom metylovej skupiny pri syntéze kreatínu, fosfolipidov a acetylcholínu. Deficit Cbl vedie k zablokovaniu aktivity enzýmu, zníženej tvorbe aminokyseliny metionínu a hromadeniu homocysteínu. Adenosylkobalamín je kofaktorom pre L-metylmalonyl-CoA mutázu v mitochondriách.

Podieľa sa hlavne na metabolizme mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov dôležitých pre správnu syntézu myelínových obalov nervovej bunky. Pri deficite Cbl dochádza k hromadeniu metylmalonátu CoA a metylmalónovej kyseliny. Typickým znakom je metylmalónová acidúria, hlavne po zvýšenom príjme mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov. Hromadenie metylmalónovej kyseliny sa negatívne odrazí v metabolizme glukózy, glutámovej kyseliny a inhibícií cyklu dikarboxylových kyselín. Zvýšená tvorba metylmalonylu CoA narúša tvorbu mastných kyselín, čoho následkom vznikajú vetvené mastné kyseliny. Nedostatok adenozylkobalamínu prispieva k tvorbe patologického myelínu, ktorý svojou fragilitou priamo podmieňuje demyelinizáciu nervových vlákien<sup>(4,5,11)</sup>.

Príčinou vzniku a rozvoja klinických prejavov a laboratórnych známk deficitu Cbl je porušená funkcia enzýmov, ktorých funkcia je závislá od Cbl. Ako bolo spomenuté, je to metionínsyntáza a metylmalonyl-CoA mutáza. Hlavným znakom je narušené delenie buniek, pre chybnú syntézu DNA, aj keď reakcie, pre ktoré je Cbl nevyhnutný, priamo neovplyvňujú syntézu DNA. Tento patomechanizmus objasnila až po rokoch hypotéza folátovej pasce. Princíp folátovej pasce spočíva v tom, že pri nedostatku Cbl sa hromadí nevyužitý N5-metyltetrahydrofolát, ktorý sa nepremieňa na aktívnu formu. Nedostatok tetrahydrofolátu naruší syntézu purínových báz, tým tvorbu DNA, a teda aj základnú funkciu bunky – delenie. Zmeny v koncentrácii folátu súvisia pravdepodobne s neschopnosťou udržať si folát, pretože bunky nie sú schopné udržať N5-metyltetrahydrofolát, ktorý sa nepremenil na aktívnu formu – tetrahydrofolát<sup>(5)</sup>. Folátová pasca je problémom pri diferenciálnej diagnostike megaloblastovej anémie, pretože príčinou tejto anémie môže byť deficit aj Cbl, aj kyseliny listovej. Kontroverzná preto bola fortifikácia potravín, pretože kyselina listová zlepšuje megaloblastovú anémiu (cez obnovu syntézy DNA a delenie buniek), no môže maskovať deficit Cbl. Folátová pasca je teda tiež dôvodom, prečo sa nedá spoliehať len na zmenené hematologické parametre v rámci diagnostiky príčiny makrocytovej anémie. Obraz megaloblastovej anémie sa dá vysvetliť folátovou pascou a hoci za príčinu neurologických ťažkostí sa považuje kobalamínový deficit, patomechanizmus vzniku týchto ťažkostí zatiaľ nie je úplne objasnený<sup>(5,10)</sup>.

Poruchy metabolizmu Cbl môžeme rozdeliť do dvoch veľkých skupín, a to: 1. deficit Cbl v organizme a 2. deficit enzýmov, ktoré sa podieľajú na intracelulárnom metabolizme Cbl. Deficit Cbl v organizme vzniká v dôsledku: nedostatočného príjmu Cbl v potrave, porušeným vstrebávaním alebo transportom Cbl. Zdrojmi vitamínu B<sub>12</sub> v strave sú primárne mäsové a mliečne výrobky. V typickej strave západného typu je jeho denný príjem obvykle vyšší než odporúčaný denný príjem. Nedostatkom Cbl sú ohrození hlavne starší ľudia s jednostrannou stravou aj chronickí alkoholici a striktní vegáni<sup>(11)</sup>. Absorpciu Cbl negatívne ovplyvňuje nedostatočná sekrécia pankreatickej šťavy, Zollingerov-Ellisonov syndróm, Immerlundov-Gräsbeckov syndróm, zápalové ochorenia žalúdočnej alebo črevnej sliznice, parazitárne a bakteriálne ochorenia gastrointestinálneho traktu, chirurgické zásahy v oblasti žalúdka a čreva, dlhodobé užívanie antacid, autoimunitné ochorenia s tvorbou protilátok proti IF alebo proti komplexu IF-Cbl a ďalšie. V porušenom transporte Cbl v organizme

zohrávajú úlohu mutácie génu pre holoTC, vrodený deficit transkobalamínu, poškodenie štruktúry holoTC či vrodené poruchy funkcie lyzozómov, ktoré vedú k nadmernému hromadeniu Cbl v lyzozómoch<sup>(1,3)</sup>.

Klinické prejavy nedostatku či porušeného metabolizmu kobalamínu závisia od príčiny, dĺžky trvania a veku pacienta, kedy porucha vznikne. V detskom veku sa neurologické prejavy manifestujú väčšinou pred hematologickými, čo platí aj u starších pacientov, u ktorých často až psychiatrické príznaky môžu predbehnúť zmeny v krvnom obraze. U dospelých pacientov s poruchou vstrebávania Cbl býva často prvým rozpoznaným príznakom makrocytová anémia<sup>(12,13)</sup>. Pri poruchách metabolizmu kobalamínu na intracelulárnej úrovni v enzýmoch CblA, CblB a čiastočne aj CblD k rozvoju makrocytovej anémie nedochádza z dôvodu neprítomnosti deficitu metylkobalamínu. Uvádza sa, že až 40 % pacientov má prítomné neurologické prejavy nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> skôr ako zmeny v hematologických parametroch. Tzv. neuroanemický syndróm okrem obrazu anémie dotvárajú rôzne neurologické prejavy, ako parestézie, poruchy hlbokaj citlivosti, zníženie reflexov, závraty. U starších pacientov sú častejšie psychiatrické prejavy: apatia, spavosť, emočná nestálosť, dezorientácia, zmätenosť, demencia a v niektorých prípadoch až depresívna psychóza. U pediatrických pacientov sa najčastejšie vyskytujú zmeny svalového tonusu – hypotonický syndróm, zaostávanie v psychomotorickom vývine, extrapyramídové príznaky, myoklonické kŕče či atrofia zrakového nervu. U časti pacientov sa môžu objaviť aj gastrointestinálne ťažkosti: nechutenstvo, nauzea, vracanie, hnačka a typické zmeny na jazyku – tzv. Hunterov jazyk (vyhladenie papíl jazyka s pálením na hrote a na okrajoch). Nedostatok kobalamínu môže byť príčinou infertility a hypothyroidizmu<sup>(13,14)</sup>. Hematologické zmeny, ktoré nás upozornia na možný nedostatok kobalamínu sú: makrocytová anémia, leukopénia, hypersegmentácia neutrofilov a trombocytopenia. Z biochemických markerov: znížená alebo normálna koncentrácia celkového vitamínu B<sub>12</sub>, pokles holotranskobalamínu, zvýšená kyselina metylmalónová v moči, zvýšený homocysteín, zvýšený konjugovaný bilirubín. Avšak ani normálne koncentrácie vitamínu B<sub>12</sub> a holoTC nevyklúčujú porušený metabolizmus Cbl pri súčasne zvýšenej koncentrácii Hcy v plazme a/alebo kyseliny metylmalónovej v moči, je potrebné diferenciálne diagnosticky vylúčiť poruchu metabolizmu Cbl na intracelulárnej úrovni<sup>(15)</sup>. Na základe výsledkov môžeme predpokladať príčinu deficitu Cbl a určiť ďalší diagnostický postup (**tabuľka 1**).

### Selektívne fluktuácie vitamínu B<sub>12</sub>

Štandardné metódy stanovujú zároveň neaktívnu a aktívnu frakciu vitamínu B<sub>12</sub>. To znižuje ich senzitivitu a špecifitu pri diagnostike deficitu kobalamínu, pretože selektívne fluktuácie holoHC môžu skresliť reálny stav aktívnej frakcie vitamínu. Tieto fluktuácie sú pozorované pri dedičných deficitoch haptokorínu, v tehotenstve a neutropenických stavoch, keď pacienti majú celkové množstvo B<sub>12</sub> znížené, ale netrpia deficitom B<sub>12</sub>. Naopak, selektívne zvýšenie holoHC s funkčným deficitom Cbl sa vyskytuje pri ochoreniach pečene, zlyhaní obličiek a niektorých malígnych ochoreniach. Stanovenie holoTC, ktorý nie je ovplyvnený fluktuáciami holoHC, je teda senzitívnejším a špecifickejším ukazovateľom funkčného



**Tabuľka 1.** Diferenciálna diagnostika porúch metabolizmu B<sub>12</sub><sup>(14)</sup>

	Celkové B <sub>12</sub>	HoloTC	Hcy	MMA	Makrocytová anémia	Test vstrebávania
Deficit v strave	↓	↓	↑	↑	áno	N
Porucha vstrebávania	↓	↓	↑	↑	áno	patol
Deficit CubR	↓	↓	↑	↑	áno	patol
Deficit TCII	N, ↓	↓	↑	↑	áno	N
DMP Cbl A, B, D1	N	N	N	↑	nie	N
DMP Cbl E, G, D2	N	N	↑	N	áno	N
DMP Cbl C, F, D	N	N	↑	↑	áno	N

**CubR** – kubilínový receptor; **TCII** – transkobalamín; **DMP** – dedičná metabolická porucha; **HoloTC** – holotranskobalamín; **Hcy** – homocysteín; **MMA** – kyselina metylmalónová; **N** – norma; **patol.** – patologický

deficitu vitamínu B<sub>12</sub><sup>(16,17,18)</sup>. Očakávané hodnoty pre holoTC u zdravých jedincov sú 35 – 171 pmol/l. Dolná a horná hranica pre referenčné rozmedzie holoTC v plazme sa pohybuje od 19 do 42 pmol/l, resp. 134 – 157 pmol/l<sup>(19)</sup>. Súčasné multicentrické štúdie navrhujú hraničnú hodnotu pre holoTC 32 pmol/l pre skrining deficitu kobalamínu založený na hodnote kyseliny metylmalónovej > 0,45 μmol/l. Pracovná skupina tvoriaca odporúčania (Guidelines Writing Group) odporúča, aby si jednotlivé laboratória zadefinovali ich vlastné referenčné hodnoty v závislosti od používaného konkrétneho testu pre holoTC alebo implementuje výrobcom odporúčané referenčné rozhranie podľa štúdie, na ktorej bol test vykonaný<sup>(20)</sup>. V laboratórnej spoločnosti Medirex je hraničnou hodnotou pre holoTC vyšetřovaný v sére 35 pmol/l<sup>(21)</sup>. Fyziologické referenčné rozhranie koncentrácie vitamínu B<sub>12</sub> v sére je 156 – 672 pmol/l, hodnoty 150 – 300 pmol/l považujeme za tzv. sivú zónu<sup>(22)</sup>. Za vysokú koncentráciu sérového vitamínu B<sub>12</sub> považujeme hodnoty nad 701 pmol/l, čo podľa biologických štandardov zodpovedá hornej hranici biologickej normality pri neprítomnosti akéhokoľvek príznaku alebo klinickej anomálie. Vysoké koncentrácie kobalamínu môžu byť vysvetlené týmito patofyziologickými mechanizmami<sup>(16)</sup>: priamy vzostup Cbl v plazme nadbytočným príjmom alebo podaním, uvoľnením zo zásob organizmu, vzostupom transkobalamínov nadbytočnou produkciou alebo nedostatočným klírensom, kvantitatívnym nedostatkom alebo absenciou afinity Cbl k transkobalamínu. Na rozdiel od deficitu kobalamínu patofyziologické pozadie a klinické dôsledky vysokých koncentrácií Cbl v sére boli doteraz veľmi málo študované. V súčasnosti sa predpokladá, že vysoké koncentrácie Cbl môžu byť indikátorom funkčného deficitu s klinickými dôsledkami paradoxne podobnými nedostatku Cbl. Zvýšená väzbovosť Cbl k haptokorínu (holoHC tvorí hlavnú časť cirkulujúceho Cbl) vedie k sekundárne zvýšenej koncentrácii Cbl, má však za následok potenciálne nižšiu väzbovú schopnosť Cbl k transkobalamínu, a tým aj znížený prísun aktívnej formy do buniek. Tento funkčný deficit Cbl so zvýšením homocysteínu a/alebo kyseliny metylmalónovej sa môže objaviť, aj keď počiatočná príčina tohto stavu nie je v deficite Cbl<sup>(16,18)</sup>. Okrem tohto mechanizmu funkčný deficit Cbl môže byť zapríčinený zlyhaním vychytávania Cbl zo séra poškodenou pečeňou a/alebo unikaním holoHC z pečeneho tkaniva do plazmy<sup>(23)</sup>. Vysoké koncentrácie Cbl sú významne spojené s hematologickými malignitami, alkoholizmom, u pacientov s obličkovými, autoimunitnými a bronchopulmonálnymi ochoreniami<sup>(16,17,18,24)</sup>. Pri chronickej myelocytovej leukémii je deficit Cbl maskovaný, pretože granulocyty vo zvýšenej miere produkujú haptokorín, a tak zostáva hladina Cbl navonok

v norme. Z ďalších hematologických ochorení je to primárny hypereozinofilný syndróm a akútna promyelocytová leukémia. Lymfoproliferatívne ochorenia sú zriedka príčinou vysokého Cbl, okrem mnohopočetného myelómu, kde môžu byť pozorované aj vysoké, aj nízke koncentrácie Cbl<sup>(18)</sup>. Vysoké koncentrácie Cbl v sére môžu byť sprievodným nálezom pri týchto nádoroch: hepatocelulárny karcinóm, sekundárne pečenevé nádory, nádory prsníka, žalúdka, pankreasu. V prípadoch metastatického postihnutia pečene sú to až extrémne vysoké hodnoty Cbl. Primárnym mechanizmom v procese zvýšenia sérového Cbl v prípade pečenevého nádoru je znížený hepatálny klírens holohaptokorínu a zvýšené plazmatické koncentrácie transkobalamínov v dôsledku zvýšeného rozpadu hepatocytov. Zdá sa, že pokles hepatálneho klírnsu je spôsobený slabou vaskularizáciou pečene a redukciami počtu haptokorínových receptorov na povrchu nádorových hepatocytov. V prípade iných solídnych nádorov by mohli vysoké koncentrácie Cbl súvisieť s nadmernou syntézou transkobalamínov alebo so zvýšením haptokorínu v dôsledku indukcie hyperleukocytózy<sup>(18,24)</sup>. Vysoké koncentrácie Cbl môžu byť v dôsledku akútnej, chronickej hepatitídy či cirhózy pečene, kde hodnoty Cbl môžu byť až päťkrát vyššie ako horná hranica referenčného rozhrania, pričom stupeň zvýšenia Cbl koreluje so stupňom závažnosti cirhózy<sup>(16,24)</sup>. Renálna insuficiencia predstavuje bežnú a veľmi dôležitú výnimku v interpretácii ukazovateľov stavu kobalamínu. Napriek normálnym či vysokým koncentraciám celkového vitamínu B<sub>12</sub> a/alebo holoTC títo pacienti majú často zvýšené sérové koncentrácie kyseliny metylmalónovej a homocysteínu. Pravdepodobnou príčinou je narušená bunková absorpcia holoTC, ktorá vedie k vnútrobunkovému deficitu B<sub>12</sub>. Možným vysvetlením je úloha obličiek vo filtrácii transkobalamínu a vo výslednej sekundárnej akumulácii holoTC<sup>(25)</sup>. Falošne zvýšené sérové koncentrácie kyseliny metylmalónovej a homocysteínu v rámci rôznych klinických stavov sú hlavným obmedzením týchto parametrov. Oba parametre totiž korelujú so sérovými koncentraciami kreatinínu a stúpajú už pri miernej stupni renálnej insuficiencie. Táto dôležitá výnimka vnáša určitú neistotu do využitia holoTC ako markera stavu Cbl u obličkových pacientov a starších ľudí so subklinickým stupňom obličkového poškodenia. Laboratórna diagnostika deficitu Cbl u obličkových pacientov vyžaduje väčšiu pozornosť pri súčasnom vzostupe kyseliny metylmalónovej a holoTC. Hermann a Obeid vo svojej štúdiu u pacientov s obličkovou dysfunkciou a u starších pacientov so stredným stupňom obličkového poškodenia odporúčajú vylúčenie deficitu Cbl jedine po substitučnej liečbe Cbl. Ak sa predpokladá deficit Cbl u obličkového pacienta a po liečbe Cbl dôjde k signifikantnému

poklesu kyseliny metylmalónovej (približne o 250 nmol/l), poukazuje to na deficit Cbl. Zvyšný vzostup kyseliny metylmalónovej je dôsledkom obličkovej dysfunkcie<sup>(26)</sup>. V tehotenstve je pozorovaný pokles Cbl v sére. Počas fyziologického tehotenstva dochádza k tomuto poklesu o 30 % hlavne v treťom trimestri. V niektorých longitudinálnych štúdiách zdravé ženy vykazovali mierny vzostup v biochemických parametroch nedostatku Cbl (kyselina metylmalónová a homocysteín) v treťom trimestri poukazujúci na funkčný vnútrobunkový deficit Cbl. Koncentrácia holoTC však ostala nezmenená. Pokles v Cbl je vysvetľovaný hlavne poklesom haptokorínu, čo podporuje názor, že holoTC je lepším markerom na hodnotenie kobalamínového statusu u tehotných. Hodnoty Cbl v sére v rozhraní 110 – 148 pmol/l počas tehotenstva môžu byť fyziologické, no sú potrebné ďalšie biochemické testy na potvrdenie jeho deficitu<sup>(27)</sup>.

## Záver

Štandardné metódy stanovujú súčasne neaktívnu a aktívnu frakciu vitamínu B<sub>12</sub> v sére. Holohaptokorín tvorí 70 – 90 % cirkulujúceho vitamínu B<sub>12</sub>, no predstavuje biologicky neaktívnu, inertnú formu. Len 10 – 30 % z celkového vitamínu B<sub>12</sub> tvorí

holotranskobalamín, biologicky dostupná aktívna forma kobalamínu. Vyšetrenie holotranskobalamínu je preto senzitivnejším a špecifickejším ukazovateľom reálneho deficitu kobalamínu v organizme, nielen v rámci diferenciálnej diagnostiky makrocytovej anémie z nedostatočného príjmu či absorpcie kobalamínu, neurologických prejavov bez známok makrocytovej anémie, či porušeného metabolizmu kobalamínu na intracelulárnej úrovni, ale tiež selektívnych zníženíach holohaptokorínu pri dedičných deficitoch haptokorínu, v tehotenstve, neutropenických stavoch, ale aj selektívnych zvýšeníach holohaptokorínu pri ochoreniach pečene a niektorých malígnych ochoreniach.

## Použité skratky:

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**Cbl** – kobalamín

**CoA** – koenzým A

**HC** – haptokorín

**Hcy** – homocysteín

**holoTC** – holotranskobalamín

**holoHC** – holohaptokorín

**IF** – vnútorný faktor

**RNA** – ribonukleová kyselina

## LITERATÚRA

- Oh R, Brown L. Vitamin B12 Deficiency. *Am Fam Physician* 2003; 67(5): 979-986.
- Callender ST, Denborough MA. A family study of pernicious anaemia. *Br J Haematol* 1957; 3(1): 88-106.
- Combs GF Jr., McClung JP. Vitamin B12. In: Combs GF, Jr., ed. *The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 5th ed. Academic Press 2017: 431-452.
- Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull* 2008; 29(2): 5-16.
- Shane B. Folate, vitamin B12 and vitamin B6. In: Stipanuk MH, ed. *Biochemical, physiological, molecular aspects of human nutrition*, 2nd ed. New York: Saunders 2006: 693-732.
- Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(4): F562-73.
- Verroust PJ, Christensen EI. Megalin and cubilin – the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(11): 1867-1871.
- Gropper SAS, Smith J.L, Groff, J.L. *Advanced nutrition and human metabolism*. 5th ed. Australia: Wadsworth/Cengage Learning, 2009.
- Hýánek, J. Aktivní vitamín B12 (holotranskobalamín) a diagnostický význam jeho stanovení [online]. *Výživa a potraviny*. 2011. <http://www.vyivaspol.cz/aktivni-vitamin-b12-holotranskobalamin-a-diagnosticky-vyznam-jeho-stanoveni/> [cit. 20. 04. 2019].
- Nečas, E. *Obecná patologická fyziologie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2009; 377.
- Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, et al. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 29; 3: 17040.
- Honzik T, Adamovicova M, Smolka V, et al. Clinical presentation and metabolic consequences in 40 breastfed infants with nutritional vitamin B(12) deficiency. What have we learned? *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14(6): 488-95.
- Dali-Youcef N, Andrès E. An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM* 2009; 102(1): 17-28.
- Fabriciová K., Behúlová D, Škodová J, et al. Poruchy metabolizmu vitamínu B<sub>12</sub>. *Pediatr Prax* 2012; 13(4): 166-170.
- Zwickler T, Lindner M, Aydin HI, et al. Diagnostic work-up and management of patients with isolated methylmalonic acidurias in European metabolic centres. *J Inher Metab Dis* 2008; 31(3): 361-367.
- Andrès E, Serraj J, Zhu J, et al. The pathophysiology of elevated vitamin B12 in clinical practice. *QJM: An International Journal of Medicine* 2013; 106(6): 505-515.
- Arendt JFB, Nexo E. Cobalamin related parameters and disease patterns in patients with increased serum cobalamin levels. *PLoS One* 2012; 7(9): e45979.
- Chiche L, Jean R, Romain F, et al. Clinical implications of high cobalamin blood levels for internal medicine. *Rev Med Interne* 2008; 29(3): 187-194.
- Sobczyńska-Malefora A, Gorska R, Pelisser M, et al. 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): 82-86.
- Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM, et al. 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.
- Nexo, E., Hoffmann- Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): 359-365.
- Axis-Shield. Clinical utility – correlation between active-B12 and total B12. [online]. Active-B12. 2014. Dostupné na: <https://www.active-b12.com/clinical-utility/>. [cit. 20. 04. 2019].
- Solomon, LR: Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 2007; 21(3): 113-130.
- Ermens AA, Vlasveld LT, Lindemans J. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clin Biochem* 2003; 36(8): 585-590.
- Obeid R, Kuhlmann M, Kirsch C, et al. Cellular uptake of vitamin B12 in patients with chronic renal failure. *Nephron Clin Pract* 2005; 99: 42-48.
- Herrmann W, Obeid R. Holotranscobalamin – An Early Marker for Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *European Haematology* 2009; 3(1): 7-11.
- Greibe E, Andreasen BH, Lildballe DL, et al. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11): 1877-1882.



**MUDr. Eva Joppová, PhD.**

Hematológia a transfúziológia, Medirex, a. s.  
Magnezitárska 2/C, 040 01 Košice  
e-mail: [eva.joppova@medirex.sk](mailto:eva.joppova@medirex.sk)